

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

Carbúnculo sintomático em bovinos no Mato Grosso do Sul: 59
casos

Rubiane Ferreira Heckler

CAMPO GRANDE, MS – 2016

2016	CARBÚNCULO SINTOMÁTICO EM BOVINOS NO MATO GROSSO DO SUL: 59 CASOS	HECKLER
------	--	---------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**Carbúnculo sintomático em bovinos no Mato Grosso do Sul: 59
casos**

Blackleg in cattle in Mato Grosso do Sul: 59 cases

Rubiane Ferreira Heckler

Orientador: Prof. Dr. Ricardo A. Amaral de Lemos

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS – 2016

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos aqueles que sempre confiaram em mim, desde sempre.

À Deus pela vida, proteção e por cuidar de mim e de minha família.

À minha família sempre. Sempre mesmo!

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar. A meu pai e minha mãe que nunca deixaram de me amar, nem de confiar em mim. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

Às minhas irmãs, Silvana e Grazielle, e cunhado, Luiz Henrique, pelo carinho, proteção e incentivo nesta caminhada. Amo vocês. Ao meu afilhado Luiz Carlos, pelas alegrias nos momentos de descontração.

Ao meu marido Rafael, por todo o incentivo desde o início até o último instante desta jornada, pela confiança e principalmente por ter acreditado tanto em mim, mais do que eu mesma.

À Suely, Eugênio e Karina pelo carinho e incentivo.

Ao Prof.^o Dr. Ricardo A. A. de Lemos, meu orientador e exemplo de profissional, pela confiança, incentivo... Palavras são poucas para expressar minha eterna gratidão.

Aos amigos de trabalho do LAP/Famez, Nickolly e Gerson, às residentes e pós-graduandas do LAP, Paulinha, Ray, Stéphanie, Gleice. Em especial à Paulinha e Ray pelas fotos do trabalho e sempre prontas para me ajudar no que precisasse, pessoas muito especiais que vou ser para sempre grata.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal que estarão para sempre em minha memória.

Aos professores Danilo, Cláudio, Carlos e Tessie, pela solicitude e solidariedade perante minhas dificuldades, em especial ao Professor Danilo e Professor Cláudio que aceitaram compor minha banca de qualificação e de defesa, pelas sugestões e análises significativas.

Resumo

HECKLER, R. F. Carbúnculo sintomático em bovinos no Mato Grosso do Sul: 59 casos. 2016. 35f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Esse estudo foi realizado com o objetivo de descrever casos de carbúnculo sintomático (infecção por *Clostridium chauvoei*) diagnosticado em bovinos do Mato Grosso do Sul de 1994-2014, para avaliar a epidemiologia, os sinais clínicos, os achados de necropsia e histopatologia e os seguintes testes laboratoriais para o diagnóstico de carbúnculo sintomático: cultura microbiológica e identificação do agente, cultura microbiológica e identificação do agente por reação em cadeia de polimerase (PCR) e identificação do agente em material fixado em formol e incluído em parafina (FFIP). Os critérios para o diagnóstico presuntivo de carbúnculo sintomático incluiu miosite necro-hemorrágica enfisematosa, associada a infiltrado inflamatório, necrose de coagulação de miofibras, edema intersticial, hemorragia e bolas de gás em meio às miofibras. Cinquenta e nove casos oriundos de 51 surtos foram encontrados, o que corresponde a 1,10% das 5.375 mortes de bovinos investigadas. Em cinco desses casos, amostras de músculo afetado foram cultivadas para clostrídios patogênicos. Outras três amostras de material semelhante foram cultivadas para clostrídios e identificação subsequente por PCR. Doze fragmentos de músculo afetado FFIP foram submetidos a PCR para identificação do agente etiológico. Com exceção de janeiro, os casos de carbúnculo sintomático foram observados em todos os meses do ano com uma maior incidência em junho-outubro. A faixa etária da maioria dos bovinos afetados era 7-12 anos de idade, mas bovinos mais jovens que 6 meses e mais velhos que 24 meses foram também afetados. Os históricos de vacinação eram escassos nesses surtos. Em 32 surtos havia alguma informação sobre a vacinação, mas em apenas dois casos a vacinação tinha sido realizada adequadamente. Cinquenta e seis casos de carbúnculo sintomático deste estudo eram casos clássicos afetando os músculos esqueléticos. Os músculos mais afetados foram os dos membros pélvicos. Em dez casos os músculos da língua, miocárdio e diafragma estavam também afetados. Apenas três dos casos apresentaram a forma visceral (cardíaca). Foi estimado que as mortes ocorreram com curso de 6-24 horas e, na maioria dos casos, os bovinos foram encontrados mortos. Em casos da forma visceral ocorreu morte súbita. *C. chauvoei* foi confirmado em cinco casos como etiologia pela cultura e identificação do agente e por PCR em amostras de músculo FFIP em oito casos.

Palavras-chave: Doenças de bovinos, miosite clostridial, *Clostridium chauvoei*.

Abstract

HECKLER, R. F. Blackleg in cattle in Mato Grosso do Sul: 59 cases. 2016. 35f. Dissertation (Master's Degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

This study was performed aiming to describe cases of blackleg (*Clostridium chauvoei* infection) diagnosed in cattle from Mato Grosso do Sul from 1994-2014 considering epidemiological, clinical, necropsy and histopathological findings and to evaluate the use of the following laboratory tests for the diagnosis of blackleg: microbiological culture and identification, of the agent, microbiological culture and identification of the agent by the polymerase chain reaction (PCR) and identification of the agent in formalin fixed paraffin embedded tissues (FFPE). Criteria for presumptive diagnosis of blackleg included necrohemorrhagic emphysematous myositis associated inflammatory infiltrate, coagulative necrosis of myofiber, interstitial edema, hemorrhage, and gas bubbles interspersed among myofibers. Fifty nine cases from 51 outbreaks of blackleg were found, which corresponded of 1,10% of 5,375 cattle deaths investigated. In five of those samples of affected muscles cultures for the identification of pathogenic clostridia were made. Another three samples of similar material were cultured for clostridia and subsequent identification by PCR. In twelve samples of FFPE affected muscle fragments were submitted to PCR for the identification of the etiological agent. Except for January, cases were observed in every month of the year, with higher numbers in July-October. Most affected cattle were in the age range of 7-12 year –old but calves younger than 6 month-old and older than 24–month-old were also observed. Vaccination histories were scarce in those outbreaks. In 32 outbreaks some vaccination history was available but only in two of those, vaccination was carried out properly. Fifty six cases of the disease were of classical blackleg affecting the skeletal muscle. Muscle of the pelvic members were the most affected. In ten cases muscles of the tongue, myocardium and diaphragm were also affected. Only three of the cases had the visceral (cardiac) form. It was estimated that deaths occurred within 6-24 hours and in most cases cattle was found death. In cases of visceral form there was sudden death. *C. chauvoei* was confirmed as the etiology by culture and identification in five cases and by PCR in FFPE samples in 8 cases.

Keywords: Diseases of cattle, clostridial myositis, *Clostridium chauvoei*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Carbúnculo sintomático..	7
2.1.1 Etiopatogenia	7
2.1.2 Epidemiologia	8
2.1.3 Sinais Clínicos	9
2.1.4 Patologia	9
2.1.5 Diagnóstico	10
2.1.6 Diagnóstico diferencial	12
2.1.7 Tratamento, profilaxia e controle	12
2.2 Edema Maligno e gangrena gasosa	13
2.2.1 Etiologia	13
2.2.2 Patogenia	14
2.2.3 Epidemiologia	15
2.2.4 Sinais clínicos	15
2.2.5 Patologia	15
2.2.6 Diagnóstico	15
2.2.7 Diagnóstico diferencial	16
2.2.8 Tratamento, profilaxia e controle	16
3. Referências Bibliográficas	17
4. ARTIGO – Carbúnculo sintomático em bovinos no Mato Grosso do Sul: 59 casos	22

1. INTRODUÇÃO

As miosites clostridiais são um conjunto de enfermidades que afetam de forma aguda, principalmente a musculatura esquelética, inclui-se nesse grupo: carbúnculo sintomático, edema maligno e gangrena gasosa. São causadas por várias espécies bacterias do gênero *Clostridium*, entre elas: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. novyi* e *C. perfringens* (Hatheway 1990, Heller 1920, Barros 2011, Radostits et al. 2007).

Os clostrídios são bacilos gram-positivos, estritamente anaeróbios, formadores de endosporos e produtores de endotoxinas, a maioria são móveis devido à presença de flagelos peritríquios, relacionados com a expressão da virulência da bactéria. A forma esporulada possui alta resistência em diversas condições ambientais (seca, calor, radiação, desinfetantes químicos), e, por isso, os animais se infectam facilmente por meio de lesões de pele, mucosas e ingestão dos esporos (Hatheway 1990, Tamura et al. 1995, Songer 1996, Sasaki et al. 2000, Barros 2011).

As miosites clostridias ocorrem por duas formas: exógena, compreendida pelo edema maligno e gangrena gasosa, e a forma endógena, conhecida como carbúnculo sintomático (Assis et al. 2010, Barros 2011). Essas enfermidades possuem distribuição mundial, sendo carbúnculo sintomático a forma mais frequente, afetando principalmente bovinos, ovinos (em menor escala), suínos (mais raramente) (Kriek & Odendaal 2004, Sterne 1981). Também podem afetar humanos, provocando mionecroses, enterocolite neutropênica, entre outras enfermidades, principalmente em pacientes debilitados e imunodeprimidos, sendo letal na maioria dos casos (Abella et al. 2002, Hermsen et al. 2008, Nagano et al. 2008, Weatherhead & Tweardy 2012).

Este trabalho tem como objetivo descrever os casos e surtos de carbúnculo sintomático diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) de janeiro de 1994 a dezembro de 2014, abordando aspectos epidemiológicos, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatológicos, e realizar diagnóstico laboratorial aplicando a técnica de isolamento e identificação microbiológica, isolamento microbiológico e identificação pela técnica da PCR em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, de casos de carbúnculo sintomático.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carbúnculo sintomático

2.1.1 Etiopatogenia

O microrganismo responsável pelo carbúnculo sintomático é o *C. chauvoei*, no entanto, outros clostrídios podem estar presentes nesta enfermidade juntamente com o *C. chauvoei* como *C. septicum*, *C. sordellii* e *C. novyi* (Hatheway 1990, Burke & Opeskin 1999, Barros 2011).

A doença é também conhecida como manqueira, doença da canela preta ou perna preta, pois é caracterizada pela formação de gangrena gasosa nos músculos afetados (Sterne & Batty 1975). Pode ocorrer de duas formas: a clássica, e, portanto, mais comum, que afeta os músculos esqueléticos, e a visceral, mais rara, que acomete coração, língua e diafragma (Uzal et al. 2003b, Harwood et al. 2007). Frequentemente se observa apenas um sítio de infecção, mas podem ocorrer diferentes focos em um único animal (Assis et al. 2010). É considerada endógena, pois é provocada pela ativação de esporos presentes no músculo, sem a inoculação do mesmo por uma ferida penetrante (Barros 2011).

A origem da infecção do carbúnculo sintomático não está totalmente esclarecida. A hipótese mais aceita é que a infecção ocorra através da ingestão de esporos pela alimentação, absorvidos na mucosa digestiva, ou até mesmo pela erupção dos dentes e são carreados por macrófagos para a circulação sanguínea. Esses microrganismos podem se alojar em diversos tecidos, principalmente para musculatura esquelética podendo ficar na forma latente por longos períodos. A doença se desenvolverá após lesões subsequentes, com pequenas hemorragias intramusculares, resultando um potencial redox baixo, levando à anaerobiose, diminuindo a concentração de íons de hidrogênio e consequente aumento do pH. Estas condições proporcionam um ambiente favorável à germinação de esporos latentes, replicação e produção de exotoxinas, responsáveis pela necrose local e extensão do processo necrosante muscular com evolução para toxemia sistêmica (Hatheway 1990, Useh et al. 2003, Kriek & Odendaal 2004, Useh et al. 2006c, Uzal 2012).

A principal toxina envolvida na patogenicidade da infecção é a *Clostridium chauvoei* toxina A (CctA), em que afeta a membrana das células alvo, produzindo poros, e com alta atividade hemolítica (Frey et al. 2012), há ainda outras toxinas com papel importante no desenvolvimento da doença: neuraminidase, DNase (beta-toxina), hialuronidase (gamma-toxina), hemolisina oxigênio-estável (alfa-toxina) e hemolisina oxigênio-instável (delta-

toxina) (Hang'ombe et al. 2006, Frey & Falquet 2015). Neuraminidase é uma enzima responsável pela propagação da doença nos tecidos do animal afetado (Useh et al. 2003, Useh et al. 2006a). DNase realiza a clivagem da estrutura do DNA (Quinn et al. 2005). Hialuronidase é responsável pela quebra do ácido hialurônico e assim intensifica a propagação das bactérias pelos tecidos, além da liberação de nutrientes (Hatheway 1990, Hynes & Walton 2000). As hemolisinas são responsáveis pela lise dos eritrócitos, e a hemolisina oxigênio-estável está relacionada também com produção de poros nas membranas, atividade letal e necrosante nos tecidos (Hatheway 1990, Hang'ombe et al. 2006, Idrees et al. 2014).

2.1.2 Epidemiologia

O carbúnculo sintomático ocorre em todo o mundo, causando significativas perdas econômicas, considerada enzoótica em áreas específicas (Useh et al. 2006c). No Rio Grande do Sul, é a clostridiose mais frequente em bovinos (Fiss et al. 2008) e uma das mais importantes doenças infecciosas desta espécie animal (Riet-Correa 2007).

Afeta predominantemente bovinos, com seis meses a dois anos de idade, em bom estado nutricional. Esta faixa etária é mais afetada provavelmente pelo declínio da imunidade colostrar a partir dos seis meses, pode ocorrer em bovinos adultos não vacinados ou vacinados há muito tempo, quando introduzidos em áreas contaminadas (Lemos 1998, Fiss et al. 2008).

Animais com alto padrão alimentar e crescimento rápido são mais susceptíveis ao carbúnculo sintomático (Riet-Correa & Lemos 2002, Gregory et al. 2006). Nesta enfermidade não ocorre transmissão direta de animal para animal, no entanto, os animais podem se infectar a partir do solo e água contaminados através de esporos presentes nas fezes. A principal fonte de infecção é a contaminação de pastagens, bebedouros, currais e galpões por carcaças dos animais que morreram desta doença. Sabe-se que os esporos podem resistir por anos no local e, portanto, é muito difícil eliminar o agente causador por completo em locais contaminados (Smith & Williams 1984).

Surtos desta doença ocorrem com maior frequência no verão e outono, principalmente após chuvas fortes (Riet-Correa 2007). A ocorrência de chuvas favorece a disseminação, germinação e multiplicação dos esporos no solo, aumentando a probabilidade de infecção. Além disso, o elevado padrão nutricional das pastagens, no período chuvoso, colabora com o crescimento dos animais, porém aumenta a susceptibilidade à infecção (Useh et al. 2006b). No Rio Grande do Sul, em um estudo realizado entre os anos de 1978 a 2007, observou-se que a maior frequência dos surtos ocorreu no inverno, seguido da primavera, outono e verão

(Fiss et al. 2008), esta característica, provavelmente, ocorreu devido ao fato de que nesta região os índices pluviométricos mensais são uniformes, podendo ocorrer índices máximos de precipitação pluvial nos meses de inverno (Britto et al. 2008). A época dos surtos também pode variar de acordo com manejo reprodutivo, nutricional e sanitário, em especial o calendário de vacinação contra carbúnculo sintomático (Lemos & Carvalho 2008).

A morbidade pode variar bastante, de menos de 1% a 57,14%, e a letalidade é de praticamente 100% (Uzal et al. 2003b, Assis et al. 2005a, Harwood et al. 2007, Fiss et al. 2008, Casagrande et al. 2015). As taxas de letalidade menores que 100%, provavelmente, se devem ao tratamento com antibióticos. Como em um surto, havia sete animais doentes, três receberam tratamento e um recuperou, resultando em uma taxa de letalidade de 85% (Harwood et al. 2007).

2.1.3 Sinais Clínicos

O carbúnculo sintomático é uma doença de curso rápido (12 a 36 horas) que apresenta rápida infecção muscular, toxemia sistêmica e choque, por isso muitas vezes os animais são encontrados mortos ou prostrados, dificultando a observação de sinais clínicos. Animais encontrados vivos apresentam depressão, febre (40 a 41°C), taquipneia, anorexia, claudicação em um ou mais membros, os quais estão edemaciados e crepitantes, o local apresenta-se quente e dolorido no estágio inicial da doença, com a evolução do quadro, estes sinais diminuem (Gregory et al. 2006, Groseth et al. 2001, Radostits et al. 2007).

Quando a doença acomete primariamente o coração, os animais podem ser encontrados mortos, mesmo que há poucos instantes tenham sido observados sem nenhum sinal clínico (Harwood et al. 2007, Lemos & Carvalho 2008, Casagrande et al. 2015).

2.1.4 Patologia

Logo após a morte, os animais incham e apresentam rápida putrefação, pode ocorrer perda de líquido sanguinolento pelas narinas e ânus. A coagulação sanguínea também é rápida. Na necropsia, é observado aumento de volume dos tecidos afetados com presença de crepitação das grandes massas musculares, podendo ocorrer em um ou mais membros, e ausência de feridas penetrantes. Ao corte, esses tecidos musculares apresentam-se vermelho enegrecido, desorganização das fibras, aspecto de desvitalização, distendidos por gás e com área central seca. Nas fâscias musculares e tecido subcutâneo pode ser observado presença de exsudato serosanguinolento. As cavidades geralmente apresentam líquido hemorrágico com fibrina (Sterne & Batty 1985, Assis et al. 2005a, Barros 2011). As áreas com lesão exalam

odor butírico, conhecido também como odor de manteiga rançosa, este odor não aparece na infecção por *C. septicum* e outros (Odendaal & Kriesk 2004). Nos casos em que o coração é afetado, observa-se pericárdio aderido à pleura parietal e epicárdio, deposição de fibrina, dilatação dos ventrículos e pequenas áreas multifocais de palidez, congestão e hemorragia. Os pulmões podem apresentar-se colapsados, de coloração avermelhada e ao corte extravasamento de líquido avermelhado (Casagrande et al. 2015).

Na coleta de material para análise histopatológica, os tecidos musculares afetados flutuam após serem colocados no formol, devido à presença de gás. Durante a necropsia é importante que todos os músculos sejam inspecionados, pois as lesões podem ocorrer ocasionalmente na língua, coração e diafragma. Frequentemente pode ser observado esplenomegalia (Lemos 1998).

Na histologia observam-se graus variáveis de miosite fibrino-hemorrágica, com presença de infiltrado inflamatório neutrofílico ou mononuclear, necrose de coagulação das fibras musculares, degeneração vacuolar e hialina, podendo apresentar-se fragmentadas e com perda das estriações, áreas de edema intersticial e hemorragia. As bactérias podem ser observadas em meio à lesão, em forma de bastonetes, pleomórficas, esporulados ou não, de característica basofílica (Lemos 1998, Assis et al. 2005a). Quando o coração é afetado, as lesões são semelhantes ao encontrado no músculo esquelético (Casagrande et al. 2015, Uzal et al. 2003b).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de carbúnculo sintomático baseia-se na observação das lesões, macro e microscópicas e sinais clínicos do animal, pode ser confirmado através da identificação do agente etiológico por meios de métodos microbiológicos, imunológicos e moleculares (Uzal et al. 2003).

A coleta do material para análises laboratorial deve ser realizada imediatamente após a morte do animal, a fim de evitar a contaminação com organismos saprófitas, como o *C. septicum* e outros (Lobato et al. 2013).

A determinação do agente etiológico pode ser realizada a partir do isolamento e identificação bioquímica. Esta técnica é relativamente simples por exigir meios de cultura e reagentes comuns de um laboratório de microbiologia, no entanto, existem algumas limitações, principalmente por serem técnicas laboriosas e demoradas, no mínimo 48 horas. Outra causa que dificulta essa determinação é a semelhança entre as espécies de clostrídeos, como *C. chauvoei* e *C. septicum* nas reações bioquímicas, além do *C. chauvoei*, que poder ser

inibido pelo *C. septicum* em cultura de meio sólido e o *C. septicum*, por ser um invasor *post-mortem* muito frequente em carcaças de ruminantes e, portanto, o isolamento desta bactéria nem sempre pode ser considerado o causador da infecção (Kuhnert et al. 1997, Assis et al. 2001, Lobato et al. 2013).

A imunofluorescência direta (IFD) é uma técnica eficaz, prática e rápida, resultado em torno de 4 horas, e pode ser realizada a partir do *imprint* do material coletado ou tecido fixado em formol e impregnado na parafina. A dificuldade em realizar esta técnica está na necessidade de anticorpos conjugados com fluorocromos e microscópio especial para leitura (Assis et al. 2001, Assis et al. 2007). Existe também o inconveniente destes anticorpos serem difíceis de comprar, e ainda, alguns autores relatam a ocorrência de reações cruzadas, limitando ainda mais o uso desta técnica (Uzal et al. 2003a).

Outra técnica de diagnóstico imunológico desenvolvida é a imunohistoquímica (IHQ), nesta técnica o material está fixado em formol e impregnado na parafina, eliminando o inconveniente da autólise do material e o crescimento de outros microrganismos saprófitos. No entanto, esta técnica também exige anticorpos, e que nestes casos não são encontrados para compra e devem ser produzidos (Assis et al. 2005b, Pires et al. 2012).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que também vem sendo utilizada para identificação do agente etiológico envolvido nas miosites clostridiais. Apesar de ser uma técnica de alto custo e que exige pessoal treinado, é livre da maioria dos inconvenientes das técnicas microbiológicas e imunológicas. Possui as vantagens de não exigir anticorpos, não produz reação cruzada e também não exige isolamento prévio, pois além de poder utilizar culturas que não foram submetidas à purificação prévia, identifica microrganismos em tecidos fixados em formol e/ou impregnados em parafina. Esta técnica tem alta capacidade de diferenciar clostrídios fortemente relacionados, como *C. chauvoei* e *C. septicum*, que causam enfermidades semelhantes em ruminantes (Lange et al. 2010, Uzal et al. 2003a).

Sasaki et al. (2001) confirmou a sensibilidade da técnica de PCR, em que utilizou isolamento e PCR como técnicas de diagnósticos, ambas utilizando o tecido animal e observou que um animal com carbúnculo foi encontrado *C. chauvoei* pela técnica de PCR, no entanto, não foi possível o isolamento bacteriano.

IFD e PCR são consideradas as melhores técnicas para diagnóstico confirmatório de carbúnculo sintomático, são rápidas, seguras e precisas, apesar de suas limitações (Assis et al. 2005a). Outra técnica imunodiagnóstica recentemente desenvolvida é a partir de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) baseada em uma flagelina recombinante, embora ainda necessite

de validação e testes em amostras clínicas, resultados bastante satisfatórios em amostras testes foram observados e pode ser uma técnica diagnóstica promissora (Usharani et al. 2015).

2.1.6 Diagnóstico diferencial

Realizado com as demais miosites clostridiais, edema maligno e gangrena gasosa. A diferenciação pode ser feita com base no histórico clínico de ferimentos recentes e achados de necropsia (Riet-Correa 2007, Barros 2011).

Doenças infecciosas agudas e superagudas devem ser diferenciadas do carbúnculo sintomático, em especial o carbúnculo hemático, pois são doenças em que o animal morre rapidamente, causando inchaço e putrefação rápida. A distinção entre as doenças deve ser realizadas na necropsia, as lesões causadas por clostrídios são geralmente bem características e fáceis de diferenciar (Kriek & Odendaal 2004).

Outras causas de morte súbita também devem ser diferenciadas, como babesiose cerebral (Estima-Silva et al. 2016), carência de cobre (Marques et al. 2003), intoxicação por plantas do gênero *Palicourea*, *Arrabidea*, *Pseudocalymma* e *Amorimia*, que contém monofluoracetado de sódio (Tokarnia et al. 2012), e por organofosforados (Santos et al. 2014).

2.1.7 Tratamento, profilaxia e controle

O tratamento é realizado com antibióticos, principalmente a penicilina em altas doses, além do tratamento de suporte e debridamento cirúrgico. Devido o curso clínico ser agudo, muitos animais morrem antes de receber o tratamento, e os que recebem na maioria das vezes não tem um bom prognóstico, pois quando os sinais clínicos são observados a doença já está bastante avançada (Radostits et al. 2007, Gregory et al. 2006, Lobato et al. 2013).

Alternativas de controle e profilaxia que devem ser utilizadas a fim de diminuir as perdas econômicas com essa doença. Em casos de surtos de carbúnculo sintomático, é recomendada a vacinação dos animais e aplicar dose reforço após 15 a 21 dias, e se possível tratamento com penicilina em todos os animais do lote problema no momento da vacinação (Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007). Nestes casos, durante a vacinação, devem ser tomados cuidados extras com relação ao manejo e higiene, evitando traumas e lesões que podem levar a ocorrência da doença. E nos casos de rebanhos muito grandes em que o tratamento com penicilina é inviável, é interessante que os animais sejam diariamente observados, se possível com aferição de temperatura, para que ao primeiro sinal clínico o animal seja tratado (Lemos & Carvalho 2008).

Para a imunização de bezerros recomenda-se que seja realizada a primeira dose no quarto mês de vida, com reforço após trinta dias e anualmente até os dois ou três anos de idade (Kriek & Odendaal 2004). No entanto, para facilitar o manejo dos produtores, pode ser utilizado o esquema de vacinação com a primeira e segunda doses aos quatro meses e oito meses, respectivamente, com dose de reforço anual (Araújo et al. 2010). Em áreas de alto risco, as imunizações podem ser realizadas a cada 6 a 8 meses, como também após os três anos de idade e, se necessário, por toda a vida. No caso de bovinos adultos que serão introduzidos em áreas de risco e não seja conhecido o histórico vacinal, é aconselhado realizar a imunização com duas doses, com intervalo de 30 dias (Kriek & Odendaal 2004).

A imunização colostrar pode interferir na imunização ativa, desta forma aconselha-se a vacinação das mães no quinto mês de gestação, assim, a imunidade colostrar terá duração de até quatro meses e após esse período pode ser realizado a primeira dose de vacina (Troxel et al. 1997).

Portanto, a principal medida para diminuir a incidência desta doença é a vacinação, no entanto, sabe-se que surtos podem ocorrer mesmo nos rebanhos devidamente vacinados (Lemos 1998, Fiss et al. 2008). Alguns autores sugerem que as falhas vacinais podem estar relacionadas à cepa a qual a vacina é produzida. Como observado por Santos (2003) em que cerca de 60% das partidas vacinais testadas foram reprovadas no teste de eficácia com cepa de campo, por serem cepas heterólogas às usadas na fabricação de vacinas.

Em relação à resposta sorológica das vacinas, Araújo et al. (2010) encontrou resultados significativamente inferiores em animais avaliados com antígenos da cepa de campo e relação a cepa oficial.

A ocorrência de falhas vacinais também pode estar relacionada com a eficácia reduzida da vacina. As cepas utilizadas na produção da vacina podem perder a sua virulência após sucessivos cultivos de repiques, pois se modificam e perdem seus antígenos, ou conferir graus de proteção variados a depender da espécie animal (Kerry, 1967). Poucos estudos avaliam a real eficácia da vacinação por meio de ensaios rigorosos, randomizados e controlados (Uzal 2012). Por isso, deve ser realizado o isolamento bacteriano na ocorrência de surtos, para que sejam avaliadas as possíveis falhas vacinais.

É importante que carcaças de animais que morreram desta doença devem ser incineradas, além de maior cuidado com o manejo de animais susceptíveis a fim de minimizar a ocorrência de traumas (Lemos 1998, Radostits et al. 2007).

2.2 Edema maligno e gangrena gasosa

2.2.1 Etiologia

C. septicum, *C. novy* tipo A, *C. sordellii*, *C. perfringens* tipo A e *C. chauvoei*, sozinhos ou combinados, são responsáveis por causar edema maligno e gangrena gasosa, uma toxemia aguda e geralmente fatal. Edema maligno e gangrena gasosa são muitas vezes utilizados como sinônimos de forma errônea, mas existem diferenças quanto a apresentações morfológicas mesmo sendo produzidas pela mesma causa. Edema maligno designa a maioria dos casos das infecções por clostrídios, neste caso, não há formação de gás e ocorre uma inflamação do tecido celular subcutâneo, com edema, sendo mais uma forma de celulite do que miosite. Gangrena gasosa são casos mais raros que causam inflamação muscular com formação de bolhas gasosa, os fatores que explicam essa formação não estão bem esclarecidos, no entanto, acredita-se que a qualidade do suprimento sanguíneo no músculo é importante para determinar se esta inflamação ficará restrita ao tecido subcutâneo ou poderá afetar o músculo, sendo, portanto, possível que o edema maligno evolua para gangrena gasosa (Barros 2011, Radostits et al. 2007).

2.2.2 Patogenia

O edema maligno e gangrena gasosa são considerados a forma exógena das miosites clostridiais, pois são causados pela contaminação clostridial de feridas penetrantes devido a castrações, tosquias, sangrias, partos e vacinações, provocando injúria tecidual, consequente diminuição do potencial oxirredução, aumento do pH e decomposição de produtos proteicos. Estes fatores criam um ambiente favorável para os esporos, que irão germinar e replicar, produzindo as toxinas, responsáveis pelo quadro patológico da doença, causando destruição tecidual rápida e extensa (Hatheway 1990, Barros 2011, Lobato et al. 2013).

Os tipos de toxinas produzidas pelos clostrídios que causam mionecroses diferem de espécie para espécie. O *C. septicum* possui praticamente as mesmas toxinas do *C. chauvoei*, já relatado anteriormente, a alfa toxina é a mais importante, pois causa citotoxicidade, letalidade, necrose e hemólise, age produzindo poros nas membranas, causando lise e citotoxicidade celular (Hatheway 1990, Lobato et al. 2013). *C. sordellii* produz duas toxinas importantes, a toxina letal e a hemorrágica, responsáveis pela destruição tecidual, agem modificando GTPases, estas enzimas controlam o ciclo celular, apoptose, transcrição gênica e funções estruturais da actina (Adalpe et al. 2006, Aronoff 2013, Vidor et al. 2015). *C. novy* tipo A, produz principalmente a toxina alfa, que também age modificando GTPases, provocando edema grave, necrose e leucocitose (Aronoff 2013). *C. perfringens* tipo A tem como principal

fator tóxico a toxina alfa, uma fosfolipase C, que age hidrolisando a membrana celular, provocando hemólise e lise celular (Titball et al. 1999, Stevens & Bryant 2002).

2.2.3 Epidemiologia

Edema maligno e gangrena gasosa são enfermidades pouco frequentes, afeta diversas espécies animais e de qualquer idade. Surto são observados quando ocorrem traumatismos coletivos, após balneações, tosquias, castrações, corte de cauda, no parto ou injeções com agulhas contaminadas. O uso de agulhas contaminadas pode acarretar uma mortalidade muito alta já nas primeiras 48 horas (Riet-Correa 2007). No Mato Grosso do Sul, um surto de edema maligno em bovinos com lesões de necrose na língua foi possivelmente ocasionado por contaminação de feridas causadas por pastagens grosseiras (Lemos 1998).

No Rio Grande do Sul, 15% dos diagnósticos de clostridioses, realizados no laboratório de patologia da Universidade Federal de Pelotas, eram de edema maligno, em que a maioria ocorreu após traumas coletivos pela utilização de vacinas ou medicamentos, as mortes ocorreram num período entre 24 horas a 10 dias após as aplicações. Esta é uma doença ligada à forma de manejo e condições higiênico-sanitárias que pode ser facilmente evitada (Fiss et al. 2008)

2.2.4 Sinais clínicos

Edema maligno e gangrena gasosa provocam sinais clínicos semelhantes ao do carbúnculo sintomático, com inchaço edematoso, a gangrena gasosa provoca áreas com crepitação muscular. Podem ocorrer em outros locais, como cauda, vulva ou qualquer local que tenha ocorrido alguma ferida penetrante, por exemplo, feridas causadas por tosquias (Odendaal & Kriek 2004).

2.2.5 Patologia

As lesões macro e microscópicas da gangrena gasosa são semelhantes às do carbúnculo sintomático, diferindo da presença da ferida penetrante (Assis et al. 2005a). No edema maligno e gangrena gasosa, observa-se edema hemorrágico no tecido subcutâneo e entre os músculos, presença de líquido edematoso variando de seroso fino até gelatinoso, geralmente sanguinolento e no caso da gangrena gasosa com bolhas de gás. Nas cavidades é comum apresentar líquido serossanguinolento e hemorragia sub-serosas. Achados histopatológicos consistem em abundante líquido edematoso, enfisema e infiltrado de neutrófilos no tecido

conjuntivo e no muscular, quando afetado (Assis et al. 2002, Odendaal & Kriek 2004, Radostits et al. 2007).

2.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico para edema maligno e gangrena gasosa segue os mesmos princípios do carbúnculo sintomático. Deve ser observado o histórico clínico e achados de necropsia associando-se a presença de feridas recentes que iniciaram a infecção (Barros 2011). As técnicas laboratoriais de diagnósticos são as mesmas supracitadas.

2.2.7 Diagnóstico diferencial

Edema maligno e gangrena gasosa devem ser diferenciados do carbúnculo sintomático, observando-se a existência de alguma ferida que levou a ocorrência da infecção (Riet-Correa 2007). O diferencial destas doenças é muito semelhante ao do carbúnculo sintomático, realizado com outras doenças infecciosas agudas e superagudas, sendo distinguidas da mesma forma. Acidentes ofídicos também devem ser diferenciados (Odendaal & Kriek 2004).

2.2.8 Tratamento, profilaxia e controle

Tratamento é o mesmo para carbúnculo sintomático, realizado com antibióticos, tratamento de suporte e, quando for o caso, debridamento cirúrgico da ferida (Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007, Lobato et al. 2013).

A vacinação é o método de escolha para controle e profilaxia do edema maligno e gangrena gasosa. As vacinas devem ser polivalentes para que confirmem proteção às diversas espécies de clostrídios que afetam esta patologia (Lobato et al. 2007). Porém, para comprovação de sua eficiência, testes devem ser realizados (Lobato et al. 2008). Alguns estudos demonstram que grande parte das vacinas polivalentes não produz resposta imune eficaz para os clostrídios que causam estas doenças (Azevedo et al. 1998, Lobato et al. 2004, Nascimento et al. 2004, Lobato et al. 2008). Por isso é importante que sejam tomadas medidas de higiene adequadas, utilização de agulhas estéreis na vacinação e aplicação de medicamentos, além de técnicas de assepsia durante procedimentos cirúrgicos, como em castrações e corte de cauda em ovinos (Lobato et al. 2007, Lobato et al. 2013).

Esporos destes microrganismos resistem à maioria das formas de esterilização. Para inativação, os materiais cirúrgicos devem ser submersos em solução de formaldeído 3% por 30 minutos (Odendaal & Kriek 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abella B.S., Kuchinic P., Hiraoka T. & Howes D.S. 2003. Atraumatic clostridial myonecrosis: case report and literature review. *J. Emerg. Med.* 24(4):401-405.
- Adalpe M.J., Bryant A.E. & Stevens D.L. 2006. *Clostridium sordellii* Infection: Epidemiology, Clinical Findings, and Current Perspectives on Diagnosis and Treatment. *Clin. Infect. Dis.* 43 (11):1436-1446.
- Araújo R.F., Curci V.C.L.M., Nobrega F.L.C., Ferreira R.M.M & Dutra I.S. 2010. Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. *Pesq. Vet. Bras.* 30(7):554-558.
- Aronoff D.M. 2013. *Clostridium novyi*, *sordellii*, and *tetani*: mechanisms of disease. *Anaerobe* 24:98-101.
- Assis R.A., Lobato F.C.F., Dias L.D., Uzal F.A., Martins N.E. & Silva N. 2001. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Rev. de Med. Vet.* 82(2):68-70.
- Assis R.A., Lobato F.C.F., Martins N.E., Nascimento R.A.P., Abreu V.L.Z. & Uzal F.A. 2002. An outbreak of malignant edema in cattle. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 97:4-8.
- Assis R.A., Facury Filho E.J., Lobato F.C.F., Carvalho A.U., Ferreira P.M. & Carvalho A.V.A. 2005a. Surto de carbúnculo sintomático em bezerros. *Ciênc. Rural.* 35(4):945-947.
- Assis R.A., Lobato F.C.F., Serakides R., Santos R.L., Dias G.R.C., Nascimento R.A.P. Abreu V.L.V., Parreiras P.M. & Uzal F.A. 2005b. Immunohistochemical detection of Clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. *Pesq. Vet. Bras.* 25(1):4-8.
- Assis R.A., Lobato F.C.F., Salvarani F.M., Lima C.G.R.D. & Uzal F.A. 2007. Detection of several clostridia by a direct fluorescent antibody test in formalina-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(5):1319-1322.
- Assis R.A., Lobato F.C.F., Nascimento R.A.P., Maboni F., Pires P.S., Silva R.O.S., Salvarani F.M. & Vargas A.P.C. 2010. Mionecroses clostridiais bovinas. *Arq. Inst. Biol.* 77(2):331-334.
- Azevedo E.O., Lobato F.C.F., Abreu V.L.V., Maia J.D. & Nascimento R.A.P. 1998. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 50:239-242.
- Barros C.S.L. 2011. Sistema Muscular, p.697-746. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), *Patologia Veterinária*. Roca, São Paulo.
- Brito F.P., Barlett R. & Mendonça M. 2008. Regionalização sazonal e mensal da precipitação máxima no estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Climatol.* 2:35-51.
- Burke M.P. & Opeskin K. 1999. Nontraumatic Clostridial Myonecrosis. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 20:158-162.

Casagrande R.A., Pires P.S., Silva R.O.S., Sonne L., Borges J.B.S., Neves M.S., Rolim V.M., Souza S.O., Driemeier D. & Lobato F.C.F. 2015. Histopathological, immunohistochemical and biomolecular diagnosis of myocarditis due to *Clostridium chauvoei* in a bovine. *Ciênc. Rural* 45(8):1472-1475.

Estima-Silva P., Molarinho K.R., Marcolongo-Pereira C., Soares M.P., Sallis E.S.V., Ladeira S.R.L. & Schild A.L. 2016. Morte súbita em bovinos no Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico. *Pesq. Vet. Bras.* 36(1):19-23.

Fiss L., Grecco F.B., Ladeira S.R.L., Ferreira J.L.M., Soares M.P., Schramm R., Riet-Correa F. & Schild A.L. 2008. Clostridioses em ruminantes na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico de 1978-2007. In.: Ferreira J.L.M., Ladeira S.R.L., Ruas J.L., Soares M.P. & Schild A.L. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico/ n°28*. Editora e Gráfica Universitária UFPel. Pelota, RS.

Frey J., Johansson A., Bürki S., Vilei E.M. & Redhead K. 2012. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. *Vaccine* 30:5500-5505.

Frey J. & Falquet L. 2015. Patho-genetics of *Clostridium chauvoei*. *Res. Microbiol.* 166:384-392.

Gregory L., Della Libera A.M.M., Birgel Júnior E.H., Pogliani F.C., Birgel D.B., Benesi F.J., Miyashiro S. & Baldassi L. 2006. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acompanhamento da recuperação de bovino acometido de “manqueira”. *Arq. Inst. Biol.* 73(2):243-246.

Groseth P.K., Ersdal C., Bjelland A.M. & Stokstad M. 2011. Large outbreak of blackleg in housed cattle. *Vet. Rec.* 169(13):339-341.

Hang'ombe B.M., Kohda T., Mukamoto M. & Kozaki S. 2006. Purification and sensitivity of *Clostridium chauvoei* hemolysin to various erythrocytes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29:263-268.

Harwood D.G., Higgins R.J., Aggett D.J. 2007. Outbreak of intestinal and lingual *Clostridium chauvoei* infection in two-year-old Friesian heifers. *Vet. Rec.* 161:307-308.

Hatheway C.L. 1990. Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(1):66-98.

Heller H.H. 1920. A etiology of acute gangrenous infections of animals: a discussion of black leg, braxy, malignant edema and whale septicemia. *J. Infect. Dis.* 27:385-451.

Hermesen J.L., Schurr M.L., Kudsk K.A. & Fausher L.D. 2008. Phenotyping *Clostridium septicum* Infection: A Surgeon's Infectious Disease. *J. Surg. Res.* 148:67-76.

Hynes W. & Walton S.L. 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183:201-207.

Idrees A., Chaudhary Z.I., Younus M. & Ashraf K. 2014. Isolation and molecular detection of *Clostridium chauvoei* alpha toxin gene from clinical cases of black quarter in cattle. *J. Anim. Plant. Sci.* 24(3): 755-759.

Kerry J.B. 1967. Immunological differences between strains of *Clostridium chauvoei*. Res. Vet. Sci. 8:89-97

Kriek N.P.J. & Odendaal M.W. 2004. *Clostridium chauvoei* infections, p.1856-1862. In: Coetzer R. & Tustin R.C. (Eds), Infectious Diseases of Livestock. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.

Kuhnert P., Krampe M., Capaul S.E., Frey J. & Nicolet J. 1997. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. Vet. Microbiol. 51:291-298.

Lange M., Neubauer H. & Seyboldt C. 2010. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Mol. Cell. Probes 24:204-210.

Lemos R.A.A. & Carvalho N.M. 2008. Carbúnculo Sintomático, p.9-22. In.: Lemos R.A.A. (Org.). Série Qualificação Rural (Carbúnculo Sintomático, Controle Integrado do Carrapato, Diarréia Viral Bovina, Bovinos de Corte e o Meio Ambiente. 1^aed.Campo Grande: Editora UFMS. Vol. 1.

Lemos R.A.A. 1998. Enfermidades do Sistema Musculoesquelético, p.387-397. In.: Lemos, R.A.A. (Ed.), Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Lobato F.C.F., Assis R.A., Balsamão G.M., Abreu V.L.V., Nascimento R.A.P. & Neves R.D. 2004. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. Ciência Rural 34(2):439-442.

Lobato F.C.F., Salvarani F.M. & Assis R.A. 2007. Clostridioses dos pequenos ruminantes. Rev. Port. Ciênc. Vet. 102:23-34.

Lobato F.C.F., Dias L.D., Salvarani F.M., Martins N.E., Nascimento R.A.P. & Assis R.A. 2008. Avaliação da potência de vacinas contra *Clostridium septicum* comercializadas no Brasil. Arq. Inst. Biol. 75(2):225-228.

Lobato F.C.F., Salvarani F.M., Gonçalves L.A., Pires P. S., Silva R.O.S., Alves G.G., Neves M., Oliveria Júnior C.A. & Pereira P.L.L. 2013. Clostridioses dos animais de produção. Vet. e Zootec. 20:29-48.

Marques A.P., Riet-Correa F., Soares M.P., Ortolani E.L. & Giuliadori M.J. 2003. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. Pesq. Vet. Bras. 23(1):21-32

Nagano N., Isomine S., Kato H., Sasaki Y., Takahashi M., Sakaida K., Nagano Y. & Arakawa Y. 2008. Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei*. J. Clin. Microbiol. 46(4):1545-1457.

Nascimento R.A.P., Lobato F.C.F., Abreu V.L.V., Martins N.E., Assis R.A. & Carvalho Filho M.B. 2004. Avaliação de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56(1):1-6.

Odendaal M.W. & Kriek N.P.J. 2004. *Clostridium septicum* infections, p.1869-1873. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), Infectious Diseases of Livestock. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.

Pires P.S., Ecco R., Araújo M.R., Silva R.O.S., Salvarani F.M., Heneine L.G.D., Assis R.A. & Lobato F.C.F. 2012. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. *Semina: Ciênc. Agrár.* 33(6):2337-2346.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. & Carter G.R. 1994. *Clostridium* species, p.191-208. In: Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London.

Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 2156p.

Riet-Correa F. 2007. Doenças Bacterianas, p.199-443. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol. 1. 3^a ed. Pallotti, Santa Maria, RS.

Riet-Correa F. & Lemos R.A.A. 2002. Clostridioses em ruminantes, p.281-290. In: Lemos R.A.A., Barros N., Brum K.B. (ed.) *Enfermidades de Interesse Econômico em Bovinos de Corte*. Editora da UFMS. Campo Grande, MS.

Santos B.A. 2003. Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra carbúnculo sintomático em uso no Brasil. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 35p.

Santos B.L., Marcolongo-Pereira C., Stigger A.L., Coelho A.C.B., Soares M.P., Sallis E.S.V., Barreto F. & Schild A.L. 2014. Uso inadequado de organofosforados: uma prática de risco para bovinos no Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 34(7):655-658.

Sasaki Y., Yamamoto K., Kojima A., Norimatsu M. & Tamura Y. 2000. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S–23S rDNA spacer region. *Res. Vet. Sci.* 69:289–294.

Sasaki Y., Yamamoto K., Amimoto K., Kojima A., Ogikubo Y., Notimatsu M., Ogata H. & Tamura Y. 2001. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Res. Vet. Sci.* 71:227-229.

Smith L.D.S. & Williams B.L. 1984. Clostridia. 101-136p. In: *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. 3^a ed. Charles C. Thomas, Springfield, IL, 550p.

Sterne M. 1981. Clostridial infections. *Br. Vet. J.* 137(4):443-454.

Sterne M. & Batty I. 1975. *Pathogenic Clostridia*. London. Butterworths. 144p.

Stevens D.L. & Bryant A.E. 2002. The role of Clostridial Toxins in the Pathogenesis of Gas Gangrene. *Clin. Infect. Dis.* 35(1):93-100.

Songer J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 9:216–234.

Tamura Y., Kijima-Tanaka M., Aoki A., Ogikubo Y. & Takahashi T. 1995. Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. Microbiology 141(3): 605-610.

Titball R.W., Naylor C.E. & Basak A.K. 1999. The *Clostridium perfringens* α -toxin. Anaerobe 5:51-64.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil. Helianthus, Rio de Janeiro, p.29-70.

Troxel R., Burke G.L., Wallace W.T., Keaton L.W., McPeake S.R., Smith D. & Nicholson I. 1997. Clostridial Vaccination Efficacy on Stimulating and Maintaining an Immune Response in Beef Cows and Calves. J. Anim. Sci. (Champaign, IL, U. S.) 75:19-25.

Uzal F.A., Hugenholtz P., Blackall L.L., Petray S., Moss S., Assis R.A., Fernandez Miyakawa M. & Carloni G. 2003a. PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Vet. Microbiol. 91: 239-248.

Uzal F.A., Paramidani M., Assis R., Morris W., Miyakwa M.F. 2003b. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. Veterinary Record v.152, p.134-136.

Uzal F.A. 2012. Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. Vet. Clin. North Am.: Large Anim. Pract. 28:71-77.

Useh N.M., Nok A.J. & Esievo K.A.N. 2003. Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuraminidase. A short review. Vet Q. 25:155-159.

Useh N.M., Ajanusi O.J., Esievo K.A.N. & Nok A.J. 2006a. Characterization of a sialidase (neuraminidase) isolated from *Clostridium chauvoei* (Jakari strain). Cell Biochemistry and Function. 24:347–352.

Useh NM, Ibrahim NDG, Nok AJ, Esievo KAN. 2006b. Relationship between outbreaks of blackleg of cattle and annual rainfall in Zaria, Nigeria. Veterinary Record.158:100–101.

Useh N.M., Nok A.J. & Esievo K.A. 2006c. Blackleg in ruminants. Perspect. Agric. Vet. Scienc. Nutr. Nat. Res. 1:1-8.

Usharani J., Nagaleekar V.K., Thomas P., Gupta S.K., Bhure S.K., Dandapat P., Agarwal R.K. & Singh V.P. 2015. Development of a recombinant flagellin based ELISA for the detection of *Clostridium chauvoei*. Anaerobe 33:48-54.

Vidor C., Awad M. & Lyras D. Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of *Clostridium sordellii*. Res. Microbiol. 166:368-374.

Weatherhead J.E. & Twardy D.J. 2012. Lethal human neutropenic enterocolitis caused by *Clostridium chauvoei* in the United States: tip of the iceberg? J. Infect. 64:225-227.

Carbúnculo sintomático em bovinos no Mato Grosso do Sul: 59 casos¹

Rubiane F. Heckler², Ricardo A. A. de Lemos³, Danilo C. Gomes³, Iveraldo S. Dutra⁴, Rodrigo O. S. Silva⁵, Francisco C. F. Lobato⁵, Carlos A. N. Ramos³, Ricardo C. Brumatti³

ABSTRACT.- Heckler R.F., Lemos R.A., Gomes D.C., Dutra I.S., Silva R.O.S., Lobato F.C.F., Ramos C.A.N. & Brumatti R.C. 2016. [Blackleg in cattle in Mato Grosso do Sul: 59 cases.] Carbúnculo sintomático em bovinos no Mato Grosso do Sul: 59 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS79070-900, Brasil. E-mail: ricardo.lemos@ufms.br

This study was performed aiming to describe cases of blackleg (*Clostridium chauvoei* infection) diagnosed in cattle from Midwestern Brazil from 1994-2014 considering epidemiological, clinical, necropsy and histopathological findings and to evaluate the use of the following laboratory tests for the diagnosis of blackleg: microbiological culture and identification, of the agent, microbiological culture and identification of the agent by the polymerase chain reaction (PCR) and identification of the agent in formalin fixed paraffin embedded tissues (FFPE). Criteria for presumptive diagnosis of blackleg included necrohemorrhagic emphysematous myositis associated inflammatory infiltrate, coagulative necrosis of myofiber, interstitial edema, hemorrhage, and gas bubbles interspersed among myofibers. Fifty nine cases from 51 outbreaks of blackleg were found, which corresponded of 1,10% of 5,375 cattle deaths investigated. In five of those samples of affected muscles cultures for the identification of pathogenic clostridia were made. Another three samples of similar material were cultured for clostridia and subsequent identification by PCR. In twelve samples of FFPE affected muscle fragments were submitted to PCR for the identification of the etiological agent. Except for January, cases were observed in every month of the year, with higher numbers in July-October. Most affected cattle were in the age range of 7-12 year – old but calves younger than 6 month-old and older than 24-month-old were also observed. Vaccination histories were scarce in those outbreaks. In 32 outbreaks some vaccination history was available but only in two of those, vaccination was carried out properly. Fifty six cases of the disease were of classical blackleg affecting the skeletal muscle. Muscle of the pelvic members were the most affected. In ten cases muscles of the tongue, myocardium and diaphragm were also affected. Only three of the cases had the visceral (cardiac) form. It was estimated that deaths occurred within 6-24 hours and in most cases cattle was found death. In cases of visceral form there was sudden death. *C. chauvoei* was confirmed as the etiology by culture and identification in five cases and by PCR in FFPE samples in 8 cases.

INDEX TERMS: Diseases of cattle, clostridial myositis, *Clostridium chauvoei*.

¹ Recebido em

Aceito em

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

³ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79070-900. *Corresponding author: ricardo.lemos@ufms.br

⁴ Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, no Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo.

⁵ Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

RESUMO.- Esse estudo foi realizado com o objetivo de descrever casos de carbúnculo sintomático (infecção por *Clostridium chauvoei*) diagnosticado em bovinos do Centro-Oeste brasileiro de 1994-2014, para avaliar a epidemiologia, os sinais clínicos, os achados de necropsia e histopatologia e os seguintes testes laboratoriais para o diagnóstico de carbúnculo sintomático: cultura microbiológica e identificação do agente, cultura microbiológica e identificação do agente por reação em cadeia de polimerase (PCR) e identificação do agente em material fixado em formol e incluído em parafina (FFIP). Os critérios para o diagnóstico presuntivo de carbúnculo sintomático incluiu miosite necro-hemorrágica enfisematosa, associada a infiltrado inflamatório, necrose de coagulação de miofibras, edema intersticial, hemorragia e bolas de gás em meio às miofibras. Cinquenta e nove casos oriundos de 51 surtos foram encontrados, o que corresponde a 1,10% das 5.375 mortes de bovinos investigadas. Em cinco desses casos, amostras de músculo afetado foram cultivadas para clostrídios patogênicos. Outras três amostras de material

semelhante foram cultivadas para clostrídios e identificação subsequente por PCR. Doze fragmentos de músculo afetado FFIP foram submetidos a PCR para identificação do agente etiológico. Com exceção de janeiro, os casos de carbúnculo sintomático foram observados em todos os meses do ano com uma maior incidência em junho-outubro. A faixa etária da maioria dos bovinos afetados era 7-12 anos de idade, mas bovinos mais jovens que 6 meses e mais velhos que 24 meses foram também afetados. Os históricos de vacinação eram escassos nesses surtos. Em 32 surtos havia alguma informação sobre a vacinação, mas em apenas dois casos a vacinação tinha sido realizada adequadamente. Cinquenta e seis casos de carbúnculo sintomático deste estudo eram casos clássicos afetando os músculos esqueléticos. Os músculos mais afetados foram os dos membros pélvicos. Em dez casos os músculos da língua, miocárdio e diafragma estavam também afetados. Apenas três dos casos apresentaram a forma visceral (cardíaca). Foi estimado que as mortes ocorreram com curso de 6-24 horas e, na maioria dos casos, os bovinos foram encontrados mortos. Em casos da forma visceral ocorreu morte súbita. *C. chauvoei* foi confirmado em cinco casos como etiologia pela cultura e identificação do agente e por PCR em amostras de músculo FFIP em oito casos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de bovinos, miosite clostridial, *Clostridium chauvoei*.

INTRODUÇÃO

Carbúnculo sintomático é uma miosite necrosante causada pela ativação de esporos de *Clostridium chauvoei*, conhecida também como manqueira, mancha ou doença da perna preta, é caracterizada pela inflamação e necrose nos músculos afetados na ausência de ferida penetrante (Hatheway 1990, Burke & Opeskin 1999). Acomete principalmente a musculatura esquelética, podendo afetar o coração, língua e diafragma (Uzal et al. 2003b, Harwood et al. 2007).

Carbúnculo sintomático é uma clostridiose histotóxica endógena, em que os esporos de *C. chauvoei* são ingeridos, absorvidos pelo trato gastrointestinal e através da circulação sanguínea alojam-se em células fagocíticas do músculo estriado (Barros 2011). Os esporos podem ficar latentes nos músculos por anos até uma diminuição no nível de oxigênio, permitindo a germinação dos esporos e multiplicação, além de produção de toxinas potencialmente fatais (Radostits et al. 2007, Useh et al. 2003, Kriek & Odendaal 2004). A doença possui distribuição mundial, com potencial para provocar sérias perdas econômicas, acomete predominantemente bovinos de 6-24 meses em bom estado nutricional (Useh et al. 2006b, Fiss et al. 2008).

O quadro clínico caracteriza-se por claudicação, edema, crepitação e aumento de volume na musculatura afetada, podendo ocorrer depressão, letargia, anorexia e febre. Devido à evolução aguda da doença, em muitos casos não se observam os sinais clínicos e os bovinos são encontrados mortos (Radostits et al. 2007, Gregory et al. 2006, Groseth et al. 2011). Mortes súbitas ocorrem quando o miocárdio é acometido (Uzal et al. 2003b, Casagrande et al. 2015). Macroscopicamente são observados edema e crepitação das massas musculares afetadas, ausência de feridas na pele e mucosas. Ao corte flui líquido serossanguinolento, a musculatura é vermelha enegrecida de aspecto necrótico e distendidas por gás (Radostits et al. 2007, Assis et al. 2005). As principais alterações histológicas são de miosite necro-hemorrágica enfisematosa; há presença de infiltrado inflamatório neutrofilico, necrose segmentar de coagulação de miofibras separadas por bolhas de gás, edema intersticial, hemorragia e deposição de fibrina. Em alguns casos podem ser observados bastonetes gram-positivos em meio à lesão (Uzal et al. 2003b, Assis et al. 2005, Casagrande et al. 2015).

O diagnóstico baseia-se na observação de lesões macro e microscópicas e histórico clínico, e pode ser confirmado pela identificação do agente etiológico por métodos microbiológicos, imunológicos ou moleculares (Uzal et al. 2003a). A técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método amplamente utilizado, bastante eficaz e com menos interferentes; identifica bactérias estreitamente relacionadas, não demanda a utilização de anticorpos como as técnicas imunológicas e nem exige isolamento prévio como método microbiológico (Lange et al. 2010, Sasaki et al. 2001, Uzal et al. 2003a).

A principal medida profilática preconizada é a imunização (Schipper et al. 1978, Kriek & Odendaal 2004). Existem no mercado formulações monovalentes, contendo somente antígenos de *C. chauvoei*, e polivalentes contendo antígenos de vários clostrídios considerados patogênicos para bovinos. (Araújo et al. 2010).

Apesar de a doença ser considerada importante no país, os relatos são poucos, principalmente séries históricas abordando as condições de ocorrência dos surtos são escassas e não há dados sobre aspectos relacionados ao diagnóstico e o impacto econômico da doença.

Este trabalho tem como objetivo descrever os casos e surtos de carbúnculo sintomático diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) de janeiro de 1994 a

dezembro de 2014, abordando aspectos epidemiológicos, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatológicos, e realizar diagnóstico laboratorial aplicando a técnica de isolamento e identificação microbiológica, isolamento microbiológico e identificação pela técnica da PCR em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (FFPI), de casos de carbúnculo sintomático.

MATERIAL E MÉTODO

Realizou-se um estudo retrospectivo correspondendo ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 2014 com base nos laudos anatomopatológicos de bovinos encaminhados ao LAP-FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS.

Consideraram-se como carbúnculo sintomático os casos com alterações histológicas de miosite necro-hemorrágica enfisematosa, associada a infiltrado inflamatório, necrose de coagulação das fibras, bolhas de gás entre as miofibras, edema intersticial e hemorragia, que são consideradas como características desta doença (Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007, Valentine & McGavin 2012). A ausência de histórico de ferimentos perfurantes no local da lesão, o quadro clínico e as lesões macroscópicas foram utilizados como critério complementar. Cada caso de carbúnculo sintomático foi enumerado por ordem cronológica a partir do número 1.

Para análise epidemiológica, casos provenientes de uma mesma propriedade e do mesmo período foram agrupados em um único surto. Os dados de número total de animais na propriedade, sob-risco, doentes e mortos, informações referentes à vacinação, músculos afetados e lesões macro e microscópicas foram retirados dos laudos de necropsia.

Para calcular os coeficientes de morbidade e letalidade considerou-se o total de animais sob-risco, compreendido pelo número de animais da mesma faixa etária de bovinos necropsiados e criados sob as mesmas condições de manejo nutricional e sanitário destes bovinos, os dados numéricos (doentes e mortos) correspondiam ao momento do envio do material.

Em cinco casos (3, 9, 11, 25 e 29), amostras dos músculos afetados foram colhidas, envolvidas em parafina para manter a condição de anaerobiose e imediatamente enviadas ao Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, no Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, para isolamento e identificação microbiológica de clostrídios patogênicos. Outras três amostras acondicionadas da mesma forma e armazenadas em refrigeração a 5°C por um período de 12 meses (caso 59, Quadro 1) a 36 meses (casos 52 e 54, Quadro 1) foram encaminhadas ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, para isolamento microbiológico e identificação por PCR utilizando a técnica de PCR descrita por Ribeiro et al. (2012).

Em 12 casos (48- 59 Quadro 1), amostras FFIP foram submetidas à identificação pela técnica de PCR no Laboratório de Biologia Molecular da FAMEZ/UFMS. Os tecidos FFPI, em que foram identificadas lesões características de carbúnculo sintomático no exame histopatológico, foram submetidos à técnica de PCR. Cortaram-se seções de 20µm de cada bloco, utilizando navalhas novas para cada bloco. Essas seções foram colocadas em tudo de microcentrifugação. Procedeu-se a retirada do excesso de parafina das amostras, com adição de 1,5ml de solução fisiológica, aquecimento em termobloco a 96°C por 10 minutos e centrifugação a 16.000 rpm por 5 minutos. A parafina que ficou na parte superior foi descartada. Essa etapa foi realizada três vezes. As amostras foram submetidas à extração de DNA com kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e posterior amplificação por PCR segundo a metodologia descrita por Kojima et al. (2001) para identificação molecular de *C. chauvoei* e *C. septicum* e por Ribeiro et al. (2012) para identificação de *C. novyi*, *C. sordellii* e *C. perfringens*. A amplificação dos fragmentos amplificados foi visualizada sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 2% corado com Gel Red (Biotium, Hayward, CA, USA).

A avaliação econômica baseou-se na quantidade de animais sob risco e animais mortos, sendo desconsiderados os casos em que não havia tais informações. Os valores monetários utilizados foram obtidos junto a praça comercial de Campo Grande, MS, tanto para estimar o valor dos animais quanto para estimar o gasto com a vacinação.

Foram calculados os seguintes valores: valor do estoque animal sob risco, considerando a quantidade total de rebanho sob risco multiplicado pelo valor unitário comercial da categoria informada; valor aferido com as mortes, considerando a quantidade de mortes multiplicado pelo valor unitário comercial da categoria; percentual de prejuízo estimado, calculado pela relação ((prejuízo total R\$/Valor rebanho sob risco R\$)*100); valor do custo estimado com a vacinação, calculado pelo total de rebanho sob risco multiplicado pelo valor unitário da vacinação por cabeça.

Para a determinação do impacto do custo da vacinação sobre o prejuízo este foi calculado pela relação ((custo da vacinação R\$/prejuízo total R\$)*100), esta relação dá a noção de quanto é o impacto do

custo sobre o prejuízo aferido, sendo que quanto menor o valor maior o impacto do prejuízo, caracterizando que um pequeno gasto com vacinas poderia ter evitado um grande prejuízo.

RESULTADOS

No período estudado foram diagnosticados 59 casos de carbúnculo sintomático, em um total de 5.375 bovinos submetidos para exame histopatológico, correspondendo a 51 surtos da doença em bovinos. Os dados epidemiológicos referentes aos surtos estão descritos no quadro 1.

Dados sobre vacinação não foram informados em 19 surtos. E a maior parte dos casos em que houve vacinação não foi informado qual o esquema de vacinação utilizado, em 2 surtos utilizou o esquema preconizado pelo fabricante e 3 surtos o esquema de 4 meses e dose reforço aos 8 meses para facilitar o manejo.

Dados estratificados referentes à idade dos bovinos acometidos estão descritos nos Quadros 2. Na faixa etária de 6 a 24 meses foram acometidos 48 bovinos.

Ocorreram casos de carbúnculo sintomático em todos os anos do estudo, nas diferentes regiões geográficas do estado, e em quase todos os meses, com exceção do mês de janeiro. Os coeficientes de morbidade e letalidade variaram de 0,5 a 33,33% e 27,27 a 100%, respectivamente, no entanto a maioria dos surtos os valores de morbidade foram abaixo de 6,00% (Figura 1). No surto 3 houve tratamento com antibiótico nos animais que apresentaram temperatura superior a 39º graus, portanto a letalidade deste surto foi baixa devido o início do tratamento antes mesmo destes animais apresentarem outros sinais clínicos de carbúnculo sintomático.

Em um surto, referente aos casos 9 e 10, o total de bovinos na propriedade era de 300 animais, sendo 150 submetidos ao esquema de vacinação preconizado pela literatura (1ª dose aos 4 meses e dose reforço após 30 dias) e os outros 150 não foram vacinados, a doença acometeu apenas bovinos não vacinados.

Os principais sinais clínicos, músculos afetados e achados de necropsia e histopatológico estão descritos, por ordem de frequência, nos quadros 3, 4 e 5, respectivamente.

Quanto à observação de sinais clínicos, houve relatos em 41 casos. O restante dos casos os animais haviam sido encontrados mortos (10 casos) ou a ficha clínica do bovino estava sem informações sobre histórico clínico (8 casos).

Em doze casos não houve descrição dos achados macroscópicos, em 8 casos as lesões descritas não mencionavam alterações sugestivas de carbúnculo sintomático, embora com encaminhamento de músculo esquelético com lesão. Nos casos restantes, as lesões descritas eram características de carbúnculo sintomático, e, em 10 casos houve acometimento de mais de um sítio de infecção. Em um caso em que houve acometimento do coração foi observado aderência do epicárdio ao pericárdio, além de edema e fibrina aderidos ao coração e pulmão, além de lesões em músculos esqueléticos (Figura 2). Em 12 casos o material estava em avançado estágio de autólise.

No quadro 6, descrevem-se os resultados dos exames laboratoriais empregados para identificação de clostrídios causadores de mionecroses. Em 12 dos 17 casos submetidos ao exame de identificação do agente causador, foi identificado *C. chauvoei*.

No quadro 7, descrevem-se os resultados econômicos estimados para os casos analisados no trabalho, onde é possível verificar a oscilação estimada em termos do prejuízo com as mortes, o qual varia de 0,75% a 27,50% para as propriedades que não vacinaram, de 0,50% a 33,33% para as propriedades que não informaram se vacinaram, e de 0,72% a 6,00% para as propriedades que vacinaram seus rebanhos.

A relação custo da vacinação estimada por prejuízo estimado apresenta as seguintes oscilações: para as propriedades que não vacinaram de 15,96% a 0,44%, para as que não informaram a vacinação de 36,14% a 0,54%, e as que vacinaram de 16,52% a 2,13%.

DISCUSSÃO

Embora o carbúnculo sintomático seja considerado como uma importante causa de perdas econômicas em diversos países (Usehet al. 2003, Kriek & Odendaal 2004, Useh et al. 2006a) incluindo o Brasil (Riet-Correa 2007, Lobato et al. 2013), são poucas as documentações de levantamentos sobre a doença abordando séries históricas. Em todos os anos deste estudo ocorreram casos de carbúnculo sintomático nas diferentes regiões geográficas do estado, demonstrando que a contaminação das pastagens por *C. chauvoei* está disseminada e que a doença é uma causa frequente de mortes em bovinos no estado. Considerando que o *C. chauvoei* é um organismo telúrico (Kriek & Odendaal 2004, Radostits et al. 2007) e amplamente distribuído no estado, é provável que a baixa prevalência de casos no período deste estudo deva-se à vacinação ser uma prática comum na maioria das propriedades. A vacinação contra carbúnculo

sintomático com o uso de vacinas monovalentes e polivalentes é uma prática disseminada no Brasil (Araújo et al. 2010), e também em outros países (Uzal et al. 2012). Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), no Brasil, estima-se que 150 milhões de doses de vacinas sejam comercializadas anualmente, apresentando formulação monovalente e polivalente (Araújo et al. 2010).

O carbúnculo sintomático foi responsável por 59 casos de morte em bovinos no Mato Grosso do Sul, de um total de 5.375 materiais de bovinos examinados no LAP/FAMEZ, correspondendo a 1,10% das causas de morte nessa espécie no período estudado. Em um estudo retrospectivo sobre doenças em bovinos no Brasil na área de influencia do Laboratório Regional de Diagnósticos (LRD) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), referente ao período de 1978-2007, de um total de 5.133 materiais de bovinos, 29 foram diagnosticados com carbúnculo sintomático, número que representa 0,56% do total de diagnósticos realizados em bovinos naquela instituição e a clostridiose mais frequente nesta espécie (Fiss et al. 2008).

Em outro estudo sobre doenças de bovinos realizado na região central do Rio Grande do Sul no período de 1964 a 2008, pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), descreve o carbúnculo sintomático como a principal clostridiose em bovinos, responsável por 0,63% (42/6706) do total de diagnósticos em bovinos submetidos ao exame histopatológico (Lucena et al. 2010). Embora esse número possa fornecer uma estimativa sobre o número de casos diagnosticados no LAP/FAMEZ/UFMS, comparativamente com outros laboratórios de diagnóstico, essa abordagem é limitada, pois os dois estudos referidos são de um mesmo estado da federação e abrangem séries de 35 (Fiss et al. 2008) e de 45 anos (Lucena et al. 2010).

Os casos ocorreram em quase todos os meses do ano, e observou-se um maior número de casos entre os meses de junho e outubro. Esses dados são semelhantes a outros relatos sobre a doença no Brasil, em que o maior número de casos ocorreu no inverno e primavera (Fiss et al. 2008). Alguns autores, em outros países, mencionam que a doença apresenta incidência sazonal, com maioria dos casos nos meses quente do ano. Esses mesmos autores destacam que pode haver variação na sazonalidade, com maior ocorrência de casos entre a primavera e o outono (Kriek & Odendaal 2004, Radostits et al. 2007). Outras condições descritas como favoráveis à ocorrência de surtos são chuvas fortes ou a escavação do solo. Altas precipitações podem estar relacionadas à difusão dos esporos por áreas mais amplas, solos saturados de água que contribuem para anaerobiose e favorecem a multiplicação do *C. chauvoei*, além de proporcionar pastagens com maior disponibilidade e mais nutritivas, resultando em animais bem nutridos e, por conseguinte favoráveis à ocorrência da doença (Useh et al. 2006a). Em relação à escavação do solo sugere-se que este procedimento pode expor e ativar esporos latentes de *C. chauvoei* (Radostits et al. 2007). A época de maior incidência de casos também pode estar relacionada aos meses do ano no qual os bezerros atingem a idade de maior susceptibilidade, que é determinada pelo manejo reprodutivo.

A maioria dos casos diagnosticados ocorreu em bovinos com idade entre 7 a 12 meses, porém casos de bezerros com idade inferior a 6 meses e bovinos com idade superior a 24 meses também foram observados. A ocorrência de casos predominantemente em bovinos com idade entre 6- 24 meses é descrita pela maioria dos autores (Assis et al. 2005, Kriek & Odendaal 2004, Riet-Correa 2007, Groseth et al. 2011). A ocorrência de poucos casos da doença em bezerros de até 6 meses de idade é explicada pela proteção conferida pelo colostro e a ocorrência de casos nesse grupo de bezerros indica falha na transferência da imunidade passiva. Após essa idade ocorre a diminuição da imunidade passiva (Kriek & Odendaal 2004, Radostits et al. 2007). Embora não existam estudos sobre a maior resistência de bovinos com idade acima de 24 meses, é provável que a mesma deva-se a imunidade naturalmente adquirida pelas sucessivas infecções que ocorrem em bovinos mantidos em áreas contaminadas. Dessa forma, bovinos adultos não vacinados criados em áreas livres da doença podem adoecer quando introduzidos em áreas de risco.

A maioria dos casos encaminhados não continha informações detalhadas sobre o histórico de vacinação. Em 12 surtos a vacinação não foi realizada, em 8 surtos foi realizada inadequadamente, e em apenas 2 surtos o procedimento foi realizado conforme as recomendações do fabricante, ou seja, aplicação da primeira dose aos 4 meses de idade e dose reforço após 30 dias. Em três surtos os bezerros tinham sido vacinados aos 4 meses com reforço aos 8 meses de idade, prática que pode ser considerada adequada (Araújo et al. 2010) e bastante utilizada pelos produtores. A vacinação inadequada em 8 surtos deve ao fato de ter sido realizada a menos de 15 dias antes do início dos surtos. Em todos os surtos em que os protocolos de vacinação não eram adequados, os bovinos tinham mais de 8 meses, de modo que a imunidade passiva já havia declinado para níveis não protetores.

Uma dificuldade encontrada para avaliar se os protocolos utilizados estão em conformidade com as recomendações técnicas é que em propriedades que não possuem um calendário sanitário, bem definido, no qual os animais sejam separados em lotes de acordo com suas idades. É possível que a idade dos

bezerros vacinados seja bastante variável. Por exemplo, quando a primeira dose de vacina é aplicada simultaneamente em todos os bezerros de uma propriedade, podem ser vacinados bezerros com idade superior ou inferior a 4 meses. Esse pode ser um procedimento de risco, pois os bezerros mais velhos estariam com menor proteção devido ao declínio da imunidade colostrálica, e bezerros mais novos podem ter menor proteção em virtude da interferência dos anticorpos colostrálicos com a vacina. Ressalta-se que a interferência negativa da imunidade passiva com a produção de anticorpos vacinais é controversa. Vários autores citam a existência de efeito negativo (Troxel et al. 1997, Radostits et al. 2007), porém isso não é confirmado em outros estudos (Schipper et al. 1978).

Outro ponto a ser destacado é ocorrência de surtos da doença em bovinos devidamente vacinados na Austrália (Reed & Reynolds 1977) e também no Brasil (Santos 2003), devido à existência de diferenças antigênicas entre as cepas de campo e as cepas utilizadas na elaboração da vacina.

Embora a vacinação seja uma prática mundialmente disseminada, existem poucos estudos baseados em ensaios clínicos comprovando a eficácia da vacina (Uzal et al. 2012). No presente estudo, a evidência da eficácia da vacinação foi observada em um surto em que bovinos mantidos sob as mesmas condições, uma parte recebendo vacinação conforme a recomendação técnica e outra parte sem vacinação, a doença atingiu somente os bovinos não vacinados.

Houve ampla variação entre os coeficientes mínimo e máximo de morbidade (0,50 a 33,33%) e letalidade (27,27 a 100%), de forma semelhante a outros relatos sobre a doença, nos quais esses coeficientes variaram de 0,66 a 57,14% para morbidade e 85,71 a 100% para letalidade (Assis et al. 2005, Casagrande et al. 2015, Groseth et al. 2011, Harwood et al. 2007, Uzal et al. 2003b). Destaca-se que no presente estudo, na maioria dos surtos (22/31), a morbidade foi inferior a 6,00%. Deve-se considerar também que os coeficientes de morbidade mais elevados ocorreram em lotes pequenos de bovinos, de forma que um único caso representa um percentual importante do grupo de animais. Outro dado importante refere-se à letalidade que em alguns surtos (4/31) foi inferior a 100%. Esses dados devem ser interpretados com cautela, pois como os dados foram colhidos no momento do envio do material ao laboratório, é provável que a maioria dos bovinos doentes tenha morrido. A letalidade do carbúnculo sintomático é virtualmente 100%, e mesmo animais tratados apresentam prognóstico desfavorável (Kriek & Odendaal 2004, Riet-Correa 2007).

Em relação à forma de ocorrência da doença, com exceção de três casos que se caracterizaram como a forma visceral (cardíaca), os demais foram da forma clássica. Estes dados estão de acordo com relatos anteriores que mencionam que a forma clássica é predominante, e a forma visceral ocorre esporadicamente (Glastonbury et al. 1988, Uzal et al. 2003b). Os sinais clínicos observados foram semelhantes a relatos anteriores da doença, inclusive o fato de que muitos bovinos são encontrados mortos, sem que sinais prévios sejam observados (Groseth et al. 2001, Uzal et al. 2003b, Gregory et al. 2006, Harwood et al. 2007, Casagrande et al. 2015). Considerando que nos casos em que foi possível observar a evolução clínica, a morte ocorreu entre 6- 24 horas, conforme relato de produtores e veterinários de campo, em condições de criações extensivas é provável que muitos bovinos sejam encontrados mortos. Nos casos da forma visceral, com acometimento do coração, ocorreram mortes súbitas.

Os achados de necropsia e histopatológicos, tanto na forma visceral quanto na forma clássica, foram semelhantes aos relatos anteriormente (Uzal et al. 2003b, Odendaal & Kriek 2004, Barros 2011, Casagrande et al. 2015, Cooper & Valentine 2016). Os músculos mais acometidos na forma clássica foram os músculos dos membros pélvicos e em 10 casos outros músculos, como a língua, coração e diafragma, também foram afetados juntamente com a musculatura dos membros. A maioria dos autores considera que os músculos mais afetados são os dos membros pélvicos, porém não detalham a incidência de lesões nos músculos de outras regiões anatômicas, nem a ocorrência de lesões em mais de um músculo no mesmo animal (Radostits et al. 2007).

A histopatologia associada aos achados de necropsia e ao quadro clínico demonstrou ser um critério eficiente de diagnóstico. Esse critério é utilizado por vários laboratórios do Brasil (Riet-Correa 2007) e de outros países (Kriek & Odendaal 2004, Useh et al. 2006b). Esta metodologia é utilizada devido à dificuldade de isolamento do *C. chauvoei* em amostras clínicas (Uzal et al. 2003a) e também pelo fato de muitas vezes o material ser encaminhado somente formolizado. A eficiência da histopatologia associada ao quadro epidemiológico e clínico, foi confirmada pelo isolamento e identificação microbiológica de *C. chauvoei* em cinco casos e de sua detecção pela técnica de PCR em 8 casos.

Nos oito casos encaminhados para isolamento bacteriano, em 5 isolou-se *C. chauvoei* em cultura pura e em dois apenas o *C. septicum* foi isolado. Em um material não houve isolamento de clostrídios patogênicos. O isolamento ou identificação de outros clostrídios em lesões de bovinos mortos com quadro clínico de carbúnculo sintomático deve ser avaliado criteriosamente, pois vários clostrídios (*C. septicum*, *C.*

perfringens) podem proliferar após a morte do animal (Kriek & Odendaal 2004, Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007).

A técnica de isolamento e identificação microbiológica (amostras 3, 9, 12, 25 e 29) foi empregada com sucesso para a detecção de *C. chauvoei*, nesses casos as amostras foram enviadas em ambiente de anaerobiose, resfriadas e encaminhadas logo após a coleta. Apesar da dificuldade para isolamento, este procedimento deve ser incentivado, pois casos de falhas vacinais devido às diferenças entre a cepa oficial e a de campo são descritas na Austrália (Reed & Reynolds 1977) e também no Brasil (Santos 2003, Araújo et al. 2010). Assim a existência de bancos de cepas de campo é uma medida de segurança para avaliação periódica da eficácia das vacinas.

Em dois materiais de bovinos, pertencentes ao mesmo surto, com quadro epidemiológico, clínico e anatomopatológico característicos de carbúnculo sintomático, armazenados durante o período de tempo de 12 meses, houve isolamento de *C. septicum* em cultura pura com posterior confirmação pela PCR realizada do cultivo, além desses outro material também com quadro característico de carbúnculo sintomático foi negativo no isolamento, sendo os três materiais positivos para *C. chauvoei* na técnica de PCR no material FFPI. Observa-se que a armazenagem de material por tempo superior a 12 meses pode interferir no resultado do isolamento bacteriano.

A técnica de PCR em amostras fixadas em formol foi eficiente para identificar *C. chauvoei*, detectando exclusivamente este clostrídio em 8 de 12 casos. Resultados semelhantes são descritos por outros autores (Kuhnert et al. 1997, Uzal et al. 2003a). A utilização da PCR em materiais formolizados é uma alternativa promissora em situações nas quais não é possível a coleta e remessa imediata para laboratório para isolamento bacteriano.

Outro ponto a ser destacado é que o isolamento e identificação de *C. chauvoei* em amostras sem lesão característica não podem ser considerados como critério de diagnóstico da doença, pois o agente pode ser isolado de amostras de animais sadios (Useh et al. 2006b). Muitos organismos incluindo *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii* são saprófitos universais e estão presentes no trato digestivo de bovinos sadios. O mesmo pode ocorrer com *C. haemolyticum* e *C. novyi* tipo B no fígado e trato digestivo de animais criados em áreas endêmicas para a hemoglobinúria bacilar e a hepatite necrótica. Durante os estágios terminais de algumas doenças não causadas por clostrídios, esses organismos podem invadir a corrente sanguínea através do intestino ou fígado e se disseminarem pelos tecidos da carcaça. Como esses clostrídios se proliferam nos tecidos dos animais mortos, a autólise é acelerada com simultânea de produção de gás. Assim, bovinos encontrados mortos ou com históricos de mortes súbitas, com ausência de lesões macroscópicas, ocorrência de autólise rápida, presença de gás na carcaça e no isolamento de clostrídios potencialmente patogênicos, podem ser erroneamente diagnosticados como casos de miosites clostridiais. O isolamento de clostrídios patogênicos durante a necropsia é essencialmente de difícil interpretação, sem significado diagnóstico na ausência de lesões compatíveis com a doença ou na demonstração da toxina específica em testes de inoculação em camundongos (Hjerpe 1990).

A dificuldade para o isolamento de *C. chauvoei* reforça a importância da necropsia e da histopatologia para o diagnóstico do carbúnculo sintomático. Diversos fatores podem interferir no diagnóstico bacteriológico. Dentre estes se destaca o tempo decorrido da coleta da amostra e a realização da análise, e também as condições assepsia e conservação do material colhido (Radostits et al. 2007, Riet-Correa 2007). *C. septicum* por ser um microrganismo de putrefação e invasor *post mortem*, que pode estar presente no momento da coleta da amostra e não necessariamente estar envolvido na patogenia da doença (Kuhnert et al. 1997, Lobato et al. 2007), outro fator importante a ser considerado é que o *C. septicum* inibe o crescimento do *C. chauvoei* em meios de cultura sólidos. Infecções com *C. chauvoei* e *C. septicum* não são infrequentes, mas a importância do *C. septicum* como agente etiológico da doença é discutida (Radostits et al. 2007).

No presente estudo não houve isolamento de *C. chauvoei* conjuntamente com outros clostrídios patogênicos, porém em dois casos em que houve isolamento apenas de *C. septicum*, o *C. chauvoei* foi identificado pela PCR em material fixado em formol e incluído em parafina. Em um estudo envolvendo 176 casos de miosites clostridiais em bovinos, *C. chauvoei* foi encontrado sozinho ou juntamente com o *C. septicum* em 56% dos casos, em 36% dos casos foi identificado apenas *C. novyi* ou *C. novyi* e *C. septicum* (Williams et al. 1977). Embora alguns autores considerem que esses resultados indiquem que para a máxima proteção do rebanho bovino deva se utilizar vacinas polivalentes contendo estes antígenos (Radostits et al. 2007), nas condições brasileiras evidência de campo reforçam a importância do *C. chauvoei* como causador do carbúnculo sintomático, pois durante muitos anos havia apenas vacinas monovalentes, e mesmo após o advento das vacinas polivalentes um grande número de bovinos no Brasil era imunizado com vacinas monovalentes (Lobato et al. 2004) sem que fossem registradas mortalidades por carbúnculo sintomático nessa população de animais. Esta doença causa severas perdas econômicas em bovinos em muitas partes do mundo e grande parte dos surtos pode ser evitado pela utilização da

vacinação, embora surtos possam ocorrer ocasionalmente em rebanhos devidamente vacinados ou com esquema vacinal incompleto (Radostits et al. 2007).

Os resultados demonstram que o carbúnculo sintomático é uma doença frequente em bovinos em Mato Grosso do Sul que pode provocar importantes prejuízos para os produtores rurais.

A estimativa de prejuízos, custos e impactos econômicos da ocorrência da doença evidenciam que a não vacinação e/ou a vacinação inadequada elevam os valores de prejuízos ao produtor e seus impactos na lucratividade da propriedade, uma vez que a mortalidade apresenta-se em coeficientes elevados quando da ocorrência da doença. Embora a ausência de informações prejudique a precisa avaliação dos resultados econômicos, e a ausência na literatura de dados para comparação, os resultados obtidos indicam uma pior situação econômica nos surtos em que não houve a vacinação ou não foram informados.

Os resultados demonstram que o carbúnculo sintomático é uma doença frequente em bovinos no Mato Grosso do Sul que pode provocar importantes prejuízos para os produtores rurais. O custo destes prejuízos pode ser reduzido com a realização de um programa de vacinação adequado, considerando-se como tal a aplicação de vacinas eficazes contra cepas de *C. chauvoei* prevalentes na região, conforme protocolos preconizados pelos fabricantes ou por estudos que evidenciem sua eficácia.

CONCLUSÕES

O carbúnculo sintomático é uma doença frequente no Mato Grosso do Sul ocorrendo em todos os anos do estudo. Bovinos com idade entre 7 a 12 meses são os mais acometidos, porém casos esporádicos ocorrem em bovinos com idade abaixo de 6 meses e acima de 24 meses. Há predominância da forma clássica, mas ocorreram casos esporádicos da forma visceral. O número de casos em bovinos adequadamente vacinados foi inferior ao número de casos em bovinos não vacinados ou inadequadamente vacinados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo R.F., Curci V.C.L.M., Nobrega F.L.C., Ferreira R.M.M & Dutra I.S. 2010. Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. *Pesq. Vet. Bras.* 30(7):554-558.
- Assis R.A., Facury Filho E.J., Lobato F.C.F., Carvalho A.U., Ferreira P.M. & Carvalho A.V.A. 2005. Surto de carbúnculo sintomático em bezerros. *Ciência Rural* 35(4):945-947.
- Barros C.S.L. 2011. Sistema Muscular, p.697-746. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), *Patologia Veterinária*. Roca, São Paulo.
- Burke M.P. & Oakes K. 1999. Non traumatic clostridial myonecrosis. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 20:158-162.
- Casagrande R.A., Pires P.S., Silva R.O.S., Sonne L., Borges J.B.S., Neves M.S., Rolim V.M., Souza S.O., Driemeier D. & Lobato F.C.F. 2015. Histopathological, immunohistochemical and biomolecular diagnosis of myocarditis due to *Clostridium chauvoei* in a bovine. *Ciência Rural* 45(8):1472-1475.
- Cooper B.J. & Valentine B.A. 2016. Muscle and tendon, p.164-249. In: Maxie M.G. (Ed), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.1. 6th ed. Elsevier, St. Louis.
- Fiss L., Grecco F.B., Ladeira S.R.L., Ferreira J.L.M., Soares M.P., Schramm R., Riet-Correa F. & Schild A.L. 2008. Clostridioses em ruminantes na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico de 1978-2007. In: Ferreira J.L.M., Ladeira S.R.L., Ruas J.L., Soares M.P. & Schild A.L. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico/ nº28*. Editora e Gráfica Universitária UFPel. Pelota, RS.
- Glastonbury J.R.W., Searson J.E., Links I.J. & Tucket L.M. 1988. Clostridial myocarditis in lambs. *Aust. Vet. J.* 65(7): 208-209.
- Gregory L., Della Libera A.M.M., Birgel Júnior E.H., Pogliani F.C., Birgel D.B., Benesi F.J., Miyashiro S. & Baldassi L. 2006. Carbúnculo sintomático: ocorrência, evolução clínica e acompanhamento da recuperação de bovino acometido de "manqueira". *Arq. Inst. Biol.* 73(2):243-246.
- Groseth P.K., Ersdal C., Bjelland A.M. & Stokstad M. 2011. Large outbreak of blackleg in housed cattle. *Vet. Rec.* 169(13):339-341.
- Harwood D.G., Higgins R.J., Aggett D.J. 2007. Outbreak of intestinal and lingual *Clostridium chauvoei* infection in two-year-old Friesian heifers. *Vet. Rec.* 161:307-308.
- Hatheway C.L. 1990. Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(1):66-98.
- Hjerpe C. A. 1990. Bovine vaccines and herd vaccination programs. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 6:171-214.
- Kojima A., Uchida I., Sekizaki T., Sasaki Y., Ogikubo Y. & Tamura Y. 2001. Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. *Vet. Microbiol.* 78:363-371.
- Kriek N.P.J. & Odendaal M.W. 2004. *Clostridium chauvoei* infections, p.1856-1862. In: Coetzer R. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.

- Kuhnert P., Krampe M., Capaul S.E., Frey J. & Nicolet J. 1997. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Vet. Microbiol.* 51:291-298.
- Lange M., Neubauer H. & Seyboldt C. 2010. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Mol. Cell. Probes* 24:204-210.
- Lobato F.C.F., Assis R.A., Balsamão G.M., Abreu V.L.V., Nascimento R.A.P. & Neves R.D. 2004. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. *Ciência Rural* 34(2):439-442.
- Lobato F.C.F., Salvarani F.M. & Assis R.A. 2007. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 102:23-34.
- Lobato F.C.F., Salvarani F.M., Gonçalves L.A., Pires P. S., Silva R.O.S., Alves G.G., Neves M., Oliveira Júnior C.A. & Pereira P.L.L. 2013. Clostridioses dos animais de produção. *Vet. e Zootec.* 20:29-48.
- Lucena R.B., Pierezan F., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Figuera R.A. & Barros C.S.L. 2010. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):428-434.
- Odendaal M.W. & Kriek N.P.J. 2004. *Clostridium septicum* infections, p.1869-1873. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 2156p.
- Reed G.A. & Reynolds L. 1977. Failure of *Clostridium chauvoei* vaccines to protect against blackleg. *Aust. Vet. J.* 53:393.
- Ribeiro M.G., Silva R.O.S., Pires P.S., Martinho A.P.V., Lucas T.M., Teixeira A.I.P., Paes A.C., Barros C.B. & Lobato F.C.F. 2012. Myonecrosis by *Clostridium septicum* in a dog, diagnosed by a new multiplex-PCR. *Anaerobe* 18(5):504-507.
- Riet-Correa F. 2007. Doenças Bacterianas, p.199-443. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol. 1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Santos B.A. 2003. Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra carbúnculo sintomático em uso no Brasil. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 35p.
- Sasaki Y., Yamamoto K., Amimoto K., Kojima A., Ogikubo Y., Notimatsu M., Ogata H. & Tamura Y. 2001. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Res. Vet. Sci.* 71:227-229.
- Schipper I.A., Kelling C.L., Mayer J. & Pfeiffer N.W. 1978. Effects of passive immunity on immune response in calves vaccinated against *Clostridium chauvoei* infection (blackleg). *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 73:1564-1566.
- Troxel R., Burke G.L., Wallace W.T., Keaton L.W., McPeake S.R., Smith D. & Nicholson I. 1997. Clostridial Vaccination Efficacy on Stimulating and Maintaining an Immune Response in Beef Cows and Calves. *J. Anim. Sci. (Champaign, IL, U. S.)* 75:19-25.
- Useh N.M., Ibrahim N.D.G., Nok A.J. & Esievo K.A.N. 2006a. Relationship between outbreaks of blackleg of cattle and annual rainfall in Zaria, Nigeria. *Vet. Rec.* 158:100-101.
- Useh N.M., Nok A.J. & Esievo K.A. 2006b. Blackleg in ruminants. *Perspect. Agric. Vet. Scienc. Nutr. Nat. Res.* 1:1-8.
- Useh N.M., Nok A.J. & Esievo K.A.N. 2003. Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuraminidase. A short review. *Vet Q.* 25:155-159.
- Uzal F.A., Hugenholtz P., Blackall L.L., Petray S., Moss S., Assis R.A., Fernandez Miyakawa M. & Carloni G. 2003a. PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Microbiol.* 91: 239-248.
- Uzal F.A., Paramidani M., Assis R., Morris W., Miyakwa M.F. 2003b. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. *Vet. Rec.* 152:134-136.
- Uzal F.A. 2012. Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. *Vet. Clin. North Am.: Large Anim. Pract.* 28:71-77.
- Valentine B.A. & McGavin M.D. 2012. Skeletal Muscle. p.871-919. In: Zachary F.J. & McGavin M.D. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Elsevier, St Louis.
- Williams B.M. 1977. Clostridial myositis in cattle: bacteriology and gross pathology. *Vet. Rec.* 100(5):90-91.

Quadro 1. Dados epidemiológicos dos surtos de carbúnculo sintomático em bovinos diagnosticados no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

Caso	Mês	Idade	Total de animais	Animais sob-risco	Animais doentes	Animais mortos	Vacinação	Esquema de vacinação
------	-----	-------	------------------	-------------------	-----------------	----------------	-----------	----------------------

1	Março	8 m	NI	NI	8	8	Inadequada	A
2	Março	30 m	NI	NI	1	1	Inadequada	4 meses
3	Junho	8 m	60	60	11	3	Sim	Protocolo 1
4	Julho	12 m	50	50	1	1	NI	NI
5	Junho	18 m	2000	NI	1	1	Sim	Protocolo 1
6	Julho	4 m	NI	NI	NI	NI	NI	NI
7	Julho	6 m	200	200	1	1	NI	NI
8	Julho	2 m	NI	6	2	2	NI	NI
9 e 10*	Agosto	12 m	300	150	16	16	Não	-
11	Agosto	18 m	3500	NI	16	16	NI	NI
12	Agosto	8 m	NI	NI	5	5	NI	NI
13 e 14*	Outubro	11 m	NI	78	8	8	Inadequada	A
15	Novembro	12 m	NI	NI	1	1	NI	NI
16	Setembro	11 m	600	600	5	5	NI	NI
17	Abril	12 m	NI	156	6	6	Sim	NI
18	Junho	7 m	16	16	1	1	NI	NI
19	Setembro	14 m	26	26	1	1	NI	NI
20, 21 e 22**	Junho	7 m	1000	940	11	11	Sim	Protocolo 2
23	Agosto	8 m	160	NI	10	8	Inadequada	A
24	Maiο	36 m	100	NI	3	3	Não	NI
25	Setembro	6 m	NI	4	1	1	Não	NI
26	Setembro	4 m	400	30	1	1	NI	NI
27	Outubro	8 m	100	100	7	6	Sim	NI
28	Dezembro	4 m	200	40	1	1	NI	NI
29	Fevereiro	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
30	Julho	4 m	NI	NI	2	2	Não	-
31	Março	14 m	813	367	17	17	Sim	NI
32	Março	18 m	600	NI	1	1	Não	-
33	Abril	24 m	700	NI	1	1	Sim	NI
34	Maiο	9 m	1943	29	2	2	Inadequada	B
35	Junho	6 m	70	12	2	2	Não	-
36	Setembro	10 m	NI	NI	9	9	Sim	Protocolo 2
37	Julho	NI	NI	NI	3	3	Inadequada	B
38	Agosto	12 m	2000	800	7	6	Não	-
39 e 40*	Setembro	12 m	693	200	5	5	Sim	Protocolo 2
41	Agosto	9 m	NI	NI	NI	NI	Inadequada	B
42	Outubro	12 m	206	206	4	4	Não	-
43	Abril	10 m	NI	NI	11	11	NI	NI
44 e 45*	Maiο	7 m	1500	NI	3	3	Não	-
46	Agosto	10 m	110	110	2	2	Não	-
47	Agosto	14 m	1053	534	13	13	Inadequada	A
48	Junho	36 m	1200	125	2	2	Não	-
49	Outubro	10 m	248	138	1	1	Sim	NI
50	Outubro	8 m	600	NI	1	1	NI	NI

51	Março	8 m	80	80	2	2	NI	NI
52, 53 e 54**	Dezembro	18 m	310	80	4	3	Sim	NI
55	Setembro	11 m	480	68	2	2	NI	NI
56	Outubro	12 m	115	115	5	5	NI	NI
57	Novembro	30 m	700	NI	NI	NI	Não	-
58	Julho	12 m	160	40	1	1	NI	NI
59	Setembro	8 m	1500	NI	3	3	Sim	NI

*=2 necropsias; **=3 necropsias; NI – não informado; Protocolo 1 = primeira dose aos 4 meses e dose reforço após 30 dias; Protocolo 2 = primeira dose aos 4 meses e dose reforço aos 8 meses; A = vacinação 1-5 dias antes do início do surto; B = vacinação 6-15 dias antes do início do surto.

Quadro 2. Distribuição conforme faixa etária dos casos de carbúnculo sintomático em bovinos diagnosticados no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

Idade	Total de casos	%
0-6 meses	8	13,6
7-12 meses	35	59,3
13-18 meses	9	15,3
19-24 meses	1	1,7
> 24 meses	4	6,8
NI	2	3,4

* NI = não informado

Quadro 3. Frequência de sinais clínicos dos casos de carbúnculo sintomático em bovinos diagnosticados no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

Sinal Clínico	Nº	%
Claudicação	23/41	56,10
Prostração	14/41	34,15
Aumento de volume na musculatura	12/41	29,27
Crepitação na área afetada	7/41	17,07
Edema	7/41	17,07
Tremores	4/41	9,76
Dificuldade de locomoção	2/41	4,88
Inapetência	1/41	2,44
Taquipnéia	1/41	2,44

Quadro 4. Frequência dos músculos afetados nos casos de carbúnculo sintomático em bovinos diagnosticados no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

Músculos afetados	Nº	%
Músculo esquelético	46/59	77,97
MPD*	9/46	19,56
MPE*	15/46	32,61
MAD*	5/46	10,87
MAE*	5/46	10,87
Psoas	1/46	2,17
Região anatômica não informada	11/46	23,91
Coração e músculos dos membros	6/59	10,17
Coração	3/59	5,08
Coração, língua e músculos dos membros	1/59	1,69
Língua e músculos dos membros	1/59	1,69
Língua, diafragma e músculos dos membros	1/59	1,69
Diafragma e músculos dos membros	1/59	1,69

* MPD= membro pélvico direito; MPE= membro pélvico esquerdo; MAD= membro torácico direito; MAE= membro torácico esquerdo.

Quadro 5. Frequência de achados de necropsia e histopatológico nos casos de carbúnculo sintomático em bovinos no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

Achados de necropsia	Nº	%	Achado histopatológico	Nº	%
Área muscular afetada vermelho escura	34/39	87,18	Infiltrado de neutrófilos	55/59	93,22
Crepitação na área afetada	23/39	58,97	Hemorragia	52/59	88,14
Edema serossanguinolento	16/39	41,03	Fibrina	37/59	62,71
Bom estado nutricional	15/39	38,46	Necrose segmentar de coagulação	32/59	54,24
Odor butírico	10/39	25,64	Separação entre as fibras	30/59	50,85
Tecido flutua no formol	6/39	15,38	Vacúolos em meio à lesão (gás)	17/59	28,81
Esplenomegalia	6/39	15,38			
Secreção sanguinolenta nariz ou ânus	5/39	12,82			
Aumento do volume muscular na área afetada	4/39	10,26			

Quadro 6. Resultados dos exames laboratoriais de isolamento e identificação microbiológica e molecular dos casos de carbúnculo sintomático encaminhados para análise laboratorial de isolamento e identificação.

Amostra	Isolamento e identificação microbiológica	Isolamento microbiológico e identificação por PCR	Identificação por PCR (tecido FFPI)
3	<i>C. chauvoei</i>	NR	NR
9	<i>C. chauvoei</i>	NR	NR
12	<i>C. chauvoei</i>	NR	NR
25	<i>C. chauvoei</i>	NR	NR
29	<i>C. chauvoei</i>	NR	NR
48	NR	NR	Negativo
49	NR	NR	<i>C. chauvoei</i>
50	NR	NR	Negativo
51	NR	NR	Negativo
52	NR	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>
53	NR	NR	<i>C. chauvoei</i>
54	NR	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>
55	NR	NR	<i>C. chauvoei</i>
56	NR	NR	<i>C. chauvoei</i>
57	NR	NR	Negativo
58	NR	NR	<i>C. chauvoei</i>
59	NR	Negativo	<i>C. chauvoei</i>

NR = não realizado

Quadro 7. Resultados da análise econômica dos casos de carbúnculo sintomático em bovinos diagnosticados no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

Caso	Animais Sob Risco	Animais Mortos	Vacinação	Valor Rebanho R\$	Prejuízo R\$	Prejuízo %	Custo Vacina R\$	Relação Custo/Prejuízo
57	80	22	Não	107.600	29.590	27,50%	129	0,44%
25	4	1	Não	5.044	1.261	25,00%	6	0,51%
35	12	2	Não	15.132	2.522	16,67%	19	0,77%
9 e 10*	150	16	Não	183.000	19.520	10,67%	242	1,24%
13 e 14*	78	8	Não	95.160	9.760	10,26%	126	1,29%
34	29	2	Não	35.380	2.440	6,90%	47	1,91%
47	534	13	Não	651.480	15.860	2,43%	860	5,42%
48	125	2	Não	218.750	3.500	1,60%	201	5,75%
46	110	2	Não	147.950	2.690	1,82%	177	6,58%
42	206	4	Não	251.320	4.880	1,94%	332	6,80%
38	800	6	Não	1.076.000	8.070	0,75%	1.288	15,96%

8	6	2	NI	5.346	1.782	33,33%	10	0,54%
18	16	1	NI	20.176	1.261	6,25%	26	2,04%
56	115	5	NI	140.300	6.100	4,35%	185	3,04%
19	26	1	NI	34.970	1.345	3,85%	42	3,11%
55	68	2	NI	82.960	2.440	2,94%	109	4,49%
28	40	1	NI	50.440	1.261	2,50%	64	5,11%
58	40	1	NI	48.800	1.220	2,50%	64	5,28%
26	30	1	NI	26.730	891	3,33%	48	5,42%
4	50	1	NI	64.125	1.283	2,00%	81	6,28%
51	80	2	NI	71.280	1.782	2,50%	129	7,23%
16	600	5	NI	732.000	6.100	0,83%	966	15,84%
7	200	1	NI	178.200	891	0,50%	322	36,14%
27	100	6	Sim	126.100	7.566	6,00%	161	2,13%
31	367	17	Sim	493.615	22.865	4,63%	591	2,58%
3	60	3	Sim	64.560	3.228	5,00%	97	2,99%
17	156	6	Sim	200.070	7.695	3,85%	251	3,26%
52, 53 e 54**	80	3	Sim	97.600	3.660	3,75%	129	3,52%
39 e 40*	200	5	Sim	244.000	6.100	2,50%	322	5,28%
20, 21 e 22**	940	11	Sim	1.011.440	11.836	1,17%	1.513	12,79%
49	138	1	Sim	185.610	1.345	0,72%	222	16,52%

*=2 necropsias; **=3 necropsias

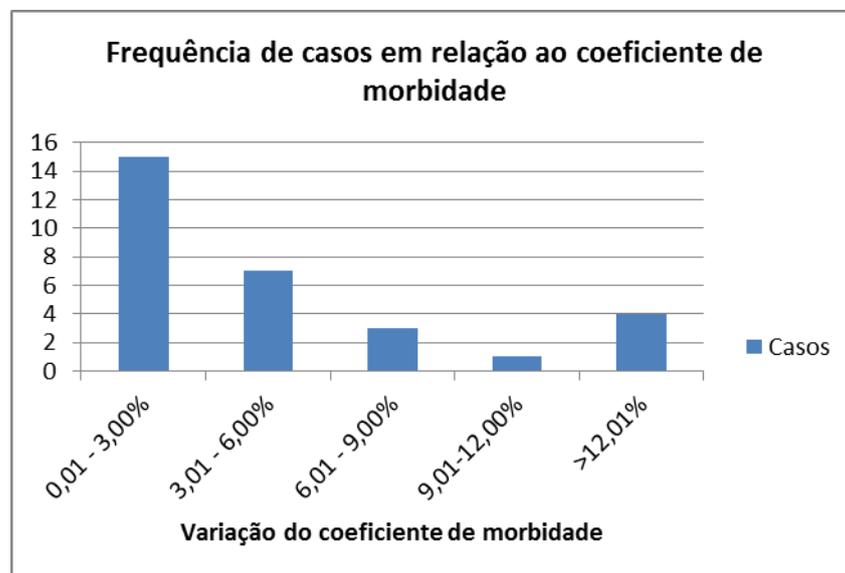


Figura 1. Distribuição conforme coeficientes de morbidade dos casos de carbúnculo sintomático em bovinos diagnosticados no LAP/FAMEZ no período de 1994 a 2014.

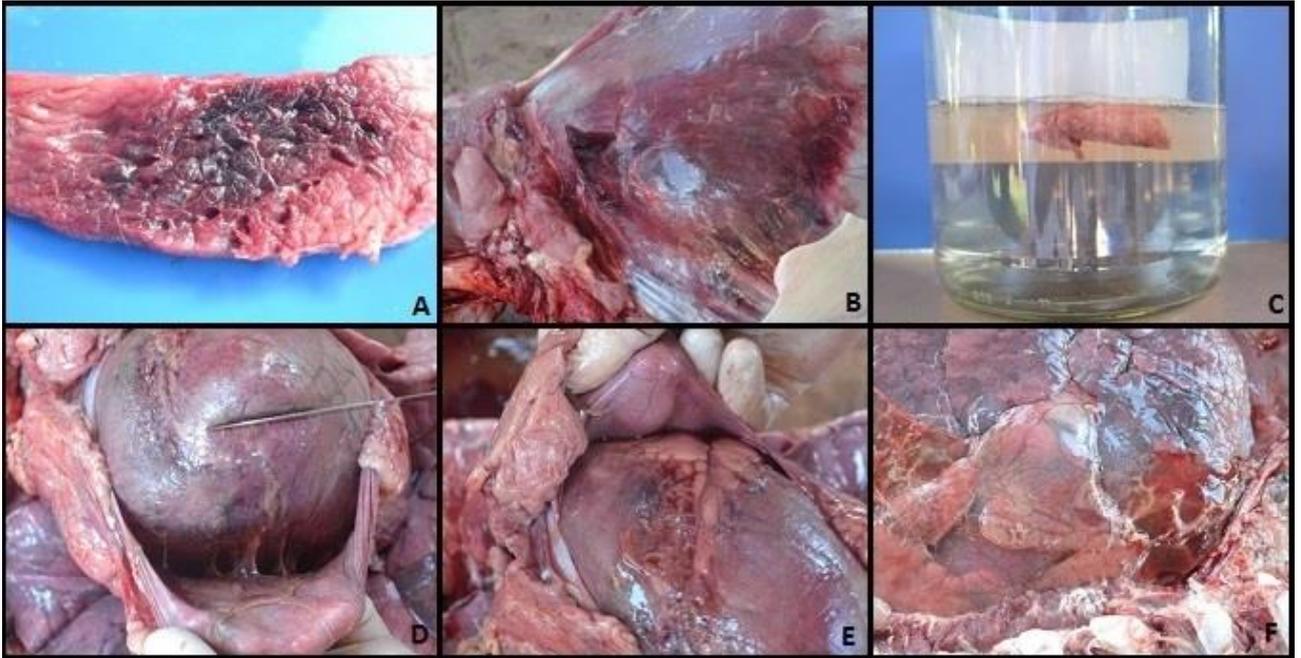


Figura 2. Carbúnculo sintomático - achados de necropsia: A. musculatura enegrecida com bolhas de gás (seta). B. Edema entre fásias musculares e fibras, hemorragia e bolhas perilesionais (seta). C. Tecido flutuando no formol. D. Aderência do epicárdio ao pericárdio. E. Fibrina e edema aderido ao coração. F. Fibrina e edema sob superfície pleural.