

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Epidemiologia da raiva e das clostridioses no sul do Rio Grande do Sul

Bianca Lemos dos Santos

Pelotas, 2019

Bianca Lemos dos Santos

Epidemiologia da raiva e das clostridioses no sul do Rio Grande do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dra Ana Lucia Schild

Coorientador: Dr Fábio Raphael Pascoti Bruhn

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237e Santos, Bianca Lemos dos

Epidemiologia da raiva e das clostridioses no sul do Rio Grande do Sul / Bianca Lemos dos Santos ; Ana Lucia Schild, orientadora ; Fábio Raphael Pascoti Bruhn, coorientador. — Pelotas, 2019.

80 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Bovinocultura. 2. Enfermidades infecciosas. 3. Análise descritiva. 4. Análise temporal. 5. Clostridioses. I. Schild, Ana Lucia, orient. II. Bruhn, Fábio Raphael Pascoti, coorient. III. Título.

Elaborada por Dafne Silva de Freitas CRB: 10/2175

Bianca Lemos dos Santos

Epidemiologia da raiva e das clostridioses no sul do Rio Grande do Sul

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dra. Ana Lucia Schild
Doutora em Ciência/Patologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros
PhD em Patologia animal pela Colorado State University

Prof. Dr. David Driemeier
Doutor em Patologia veterinária pela Justus Liebig Universität Giessen, Germany

Prof. Dra. Margarida Buss Raffi
Doutora em Ciências/Patologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Dedico essa tese a uma pessoa que partiu sem me ver chegar ao final dessa etapa.

À memória de Vanildo dos Santos, meu amado pai.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Dra. Ana Lucia Schild, pela confiança, pela dedicação diária como orientadora, além de sua indiscutível dedicação ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD/UFPel).

Ao meu pai, Vanildo dos Santos por ter me dado todo o suporte necessário para encarar essa etapa, pai tu és um guerreiro, e sei que nesse momento tu estás realizando um sonho junto comigo e à minha mãe Ivonete Lemos dos Santos por ser essa mãe amorosa, amiga e incontestavelmente dedicada a família.

Agradeço de forma especial ao meu colega e amigo Clairton Marcolongo Pereira, pela amizade, ensinamentos, dedicação e confiança, além do apoio nessa etapa da minha vida. És um exemplo!

Aos meus colegas e amigos de doutorado, Pablo Estima Silva e Joana Vargas Echenique pelo trabalho em conjunto, pelo aprendizado e pela paciência do convívio diário, nesses últimos meses vocês foram fundamentais para finalização dessa etapa. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementamos e nos fortalecemos. Obrigada pela troca e cumplicidade.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ana Carolina Barreto Coelho, Rosimeri Zamboni, Haide Scheid, Fabiano da Rosa Venancio, Taina dos Santos Alberti e Carolina dos Santos Bermann.

Às professoras do departamento de Patologia Animal, Eliza Simone Sallis e Margarida Raffi, Cristina Gevehr Fernandes e Josiane Bonel pelo carinho, apoio e ensinamentos.

Aos médicos veterinários do LRD, Sílvia Ladeira e Mauro Pereira Soares, pelo apoio e ensinamentos.

As técnicas de histoquímica do LRD, Daiane Xavier e Lucia Mendes pela ajuda na execução das lâminas para o trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica Lucas Marques dos Santos, Rocheli Mähler e Luiza Soares Ribeiro pelo auxílio na realização dessa dissertação.

Resumo

SANTOS, BIANCA L. **Epidemiologia da raiva e das clostridioses no sul do Rio Grande do Sul**. 2019. 80f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2019.

As doenças infecciosas são as mais importantes causas de morbidade e mortalidade entre bovinos na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel), representando 57,2% de todas as mortes diagnosticadas nesta espécie. Dentre estas enfermidades destacam-se a raiva e as clostridioses. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia dos surtos de raiva observados em bovinos de janeiro de 2008 a dezembro de 2017, por meio de sua distribuição no espaço e no tempo na região sul do Rio Grande do Sul. Foi realizado um estudo observacional e ecológico retrospectivo, por meio da análise de dados registrados nos protocolos de necropsias realizadas em bovinos no LRD. Foi feita análise descritiva dos dados para avaliar a distribuição dos casos ao longo do tempo. Para a análise temporal foi utilizado o software estatístico Gretl 1.9.12 (GNU Regression, Econometric and Time-series Library). Para verificar a existência da estacionariedade utilizou-se o teste de Dickey-Fuller aumentado, considerando um valor de $p < 0,05$. No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2017, foram recebidos no LRD/UFPel 1418 materiais de bovinos para diagnóstico, sendo confirmados 160 surtos de raiva em 160 propriedades situadas nos 24 municípios da área de influência do LRD/UFPel. O número de animais infectados pelo vírus foi de 591 bovinos de um total de 25.886. O presente estudo permitiu concluir que a raiva não tem sazonalidade na região do estudo, tendo tendência de queda na frequência nos próximos anos. A doença tem característica epidêmica na maioria dos meses analisados (2012-2014), mantendo-se endêmica no período restante (2011, 2015 e 2016) com episódios esporádicos de epidemias nestes anos. Observou-se ainda, que a medida em que aumentou a incidência da doença nos animais e nas propriedades, houve disseminação geográfica do vírus para a maioria (54,16%) dos municípios da área de influência do LRD/UFPel. Nesta tese foi incluído, também, um estudo retrospectivo das clostridioses ocorridas na região sul do Rio Grande do Sul, correspondente a área de influência do LRD/UFPel, em um período de 40 anos, com uma breve revisão sobre essas enfermidades. De um total de 6.736 materiais de bovinos provenientes de necropsias realizadas ou órgãos enviados 111 (1,65%) ocorreram em consequência de alguma clostridiose, sendo 35 surtos de tétano (31,5%), 34 surtos de carbúnculo sintomático (30,6%), 23 de hemoglobinúria bacilar (20,7%), 11 de edema maligno (9,9%) e oito de botulismo (7,2%). Concluiu-se cada uma das clostridioses diagnosticadas devem ser consideradas no diagnóstico a campo na região Sul do Rio Grande do Sul e que a vacinação associada a um protocolo sanitário de acordo com a epidemiologia de cada uma delas é o procedimento mais adequado para evitar sua ocorrência.

Palavras-chave: bovinocultura; enfermidades infecciosas; análise descritiva; análise temporal; sanidade animal, clostridioses

Abstract

SANTOS, BIANCA, L. **Epidemiology of rabies and clostridiosis in Southern Rio Grande do Sul**. 2019. 80f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Infectious diseases are the most important causes of morbidity and mortality among cattle in the area of influence of the Regional Diagnostic Laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Pelotas (LRD/UFPel), representing 57.2% of all deaths diagnosed in this species. Amongst these diseases, rabies and clostridiosis stand out. In this context, the aim of this thesis was to study the spatio-temporal epidemiology of rabies outbreaks observed in cattle from January 2008 to December 2017 in southern Rio Grande do Sul. An observational and ecological retrospective study was made through the analysis of data recorded in the necropsy protocols performed in cattle in LRD/UFPel. A descriptive analysis of the data was performed to evaluate the distribution of the cases over time. For temporal statistical analysis, the software Gretl 1.9.12 (GNU Regression, Econometric and Time-series Library) was used. To verify the existence of stationarity, the Dickey-Fuller test was used, considering a value of $p < 0.05$. From January 2008 to December 2017, 1,418 bovine materials were received at the LRD / UFPel, and 160 outbreaks of rabies were confirmed in 160 farms located in the 24 municipalities in southern Rio Grande do Sul. Five hundred-ninety-one animals were infected out of 25,886. This study demonstrated that rabies does not have seasonality in the region, and its frequency tends to decrease in the next years. Additionally, the disease has an epidemic characteristic in most of the analyzed years (2012-2014), remaining endemic in the remaining period (2011, 2015 and 2016) with sporadic episodes of epidemics in these years. It was also observed that as the incidence of the disease increased in animals and in the properties, a geographical spread of the virus for the majority (54.16%) of the municipalities in the area of influence of the LRD / UFPel occurred. This thesis also describes an epidemiological study of clostridiosis in southern Rio Grande do Sul between January 1978 and December 2018. From a total of 6,736 bovine material obtained from necropsies or organs received, 111 (1.65%) were from clostridiosis: 35 of tetanus (31.53%); 34 outbreaks of blackleg (30.6%), 23 of bacillary hemoglobinuria (20.7%), 11 of gas gangrene (9.9%); and eight of botulism (7.2%). It was concluded that all the diagnosed clostridiosis should be considered in the field diagnosis in the southern region of Rio Grande do Sul and vaccination associated with an adequate sanitary protocol to the epidemiological conditions in which such diseases occurs is fundamental to control them.

Keywords: cattle; infectious diseases; descriptive analysis; spatio-temporal epidemiology; animal health.

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Microrregiões da área de influência do LRD/UFPel (região Sul do Rio Grande do Sul)..... 30
- Figura 2 A e B. Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de incidência entre bovinos com vírus rábico (x 1.000.000 de bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. A. série original, B. Série livre de tendência. C e D. Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de incidência entre propriedades com o vírus rábico (x 100.000 bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. C. Série original. D. Série livre de tendência..... 31
- Figura 3 A e B. Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de incidência entre municípios com vírus rábico (1 caso a cada 100 bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. A. Série original. B. Série livre de tendência. C e D. Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de mortalidade específica da raiva em bovinos (1 caso a cada 100 bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. C. Série original. D. Série livre de tendência..... 32

Figura 4	A. Curva endêmica da taxa de incidência de raiva entre bovinos (x1000000)* na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2011 a 2016. *Número de animais positivos / total de animais criados nos 24 municípios (x1000000). B. Curva endêmica da taxa de incidência entre propriedades (x100000)* na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2011 a 2016. *número de propriedades positivas / número de propriedades nos 24 municípios (x100000).....	33
Figura 5	Taxa de incidência (casos x 1000000) de raiva em bovinos nos municípios da região sul do Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2017.....	34
Figura 6	Áreas contendo aglomerados (análise hot spot) de casos de raiva em bovino nos municípios da região sul do Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2017. A análise de ponto quente foi realizada com o software ArcGis 10.2.1. Áreas vermelhas indicam aglomerados de valores altos (hot spot).....	34

Artigo 2

Figura 1	Pathogenesis of tetanus. Tetanus neurotoxin (TetNT, yellow stars) is directed by retrograde transport into motor neurons (shown as a green line) by the action of microtubules and actin microfilaments. TetNT inhibits the exocytosis of specific synaptic vesicles at inhibitory neuronal terminals. Thus the action of the inhibitory neuron is not exerted on the motor neuron, resulting in spasticity.....	57
Figura 2	Clostridial diseases. Tetanus. Cow with spastic paralysis.....	58
Figura 3	Clostridial diseases. Tetanus. Steer with opisthotono	58

Figura 4	Blackleg. Pathogenesis. Clostridium chauvoei spores are ingested from the contaminated soil (1) and absorbed through the intestinal mucosa into the blood circulation (2). The spores are then distributed through various tissues, mainly skeletal muscles, where they become dormant (3). When a muscle injury occurs, a favorable anaerobic environment is created, the spores germinate, and the bacteria produce potent exotoxins that cause hemorrhagic necrotizing emphysematous myositis (4). The proliferating bacteria and toxins enter the bloodstream causing exotoxemia and death (5). Redrawn after Abreu et al. 2017.....	59
Figura 5	Clostridial diseases. Blackleg. Gross lesions at the thigh muscles. Lesions at right re most and is an early lesion. The dark, dry muscle to the left is a more advanced phase of the lesion. Observed the well-developed gas bubbles in the muscle fat to the top right.....	60
Figura 6	Schematic representation of the anatomical sites where muscle lesions are more commonly seen: posterior muscles of the thigh, diaphragm, heart, and tongue.....	61
Figura 7	Clostridial diseases. Blackleg. Hemorrhagic necrotizing myositis. A histopathological aspect of the striated muscle lesion. There is hyaline necrosis of myofibers and edema and hemorrhage between myofibers.HE, obj.40x.....	61
Figura 8	The life cycle of Fasciola hepatica. Eggs are eliminated in the bile and feces.ç The hatching produces miracidium that survives only in humid environments. Miracidium penetrates actively in the intermediate host (snail of the genus Lymnaea). Inside the snail, each miracidium gives rise 5-rediae which originate daughter rediae and cercariae. Cercariae leave the snail and set themselves on	

grass, just below the water level, turning then into metacercariae. The final host ingests the metacercariae along with the grass. People and other domestic and wild mammals can also become infected. The ingested metacercariae cross the duodenum of the definitive host and penetrate the intestinal wall, migrate through the coelom, penetrate the capsule of the liver, and migrate through the hepatic parenchyma to reach the hepatic ducts..... 62

Figura 9 Clostridial diseases. Bacillary hemoglobinuria (BH). Liver, cut surface. The triangular single white area of necrosis is seen to the right is a hallmark lesion of BH. The ducts are thick walled (chronic cholangitis) and some specimens of *Fasciola hepatica* are in their lumen. Migration of *F. hepatica* metacercariae through liver parenchyma favor sporulation of *Clostridium haemolyticum*, the causative agent of BH..... 63

Figura 10 Clostridial diseases. Bacillary hemoglobinuria (BH). Liver, cut surface. Notice the large irregular bordered pale area of coagulative necrosis in the liver parenchyma. A red rim of hemorrhage and inflammation surrounds the necrotic focus..... 63

Figura 11 Clostridial diseases. Bacillary hemoglobinuria (BH). Histopathology. A large area of coagulative to the right is surrounded by a rim of leucocytes. HE, obj.20x..... 64

Figura 12 Botulism Schematic view of a motor neuron and the neuromuscular junction. The botulinum neurotoxin (BoNTs, shown as (TetNT, yellow stars) are internalized at synapses in endosomal compartments, one of which might attach to synaptic vesicles (blue dots). At the neuromuscular junction, the BoNT inhibits the exocytosis of acetylcholine, which compromises the stimulus for muscle contraction, resulting in flaccid paralysis. The synaptic 65

vesicles are synthesized in the endoplasmic reticulum and released by the Golgi apparatus.....

Figura 13 Clostridial diseases. Botulism. Flaccid paralysis in a cow. The lack of tonus in the limbs prevents the steer from standing..... 66

Figura 14 Clostridial diseases. Botulism. Outbreak of botulism in feedlot cattle. Flaccid paralysis causes the tongue to protrude from the mouth..... 66

Lista de Tabelas

Artigo 1

Quadro 1	Taxa de incidência dos casos de raiva nos 24 municípios da região de abrangência do Laboratório Regional de Diagnóstico, Rio Grande do Sul, no período de 2008 a 2017.....	35
Quadro 2	Taxa de incidência de casos de raiva, por ano, na região de abrangência do Laboratório Regional de Diagnóstico, Rio Grande do Sul, no período de 2008 a 2017.....	35
Quadro 3	Taxa de incidência de casos de raiva, por mês, na região de abrangência do Laboratório Regional de Diagnóstico, Rio Grande do Sul, no período de 2008 a 2017.....	36

Artigo 2

Quadro 1	Epidemiological data on the five outbreaks of clostridial diseases diagnosed in cattle by the Regional Laboratory Diagnostic Laboratory of the Federal University of Pelotas between 1978-2018.....	67
Quadro 2	Approach for the diagnosis of some clostridial disease.....	68

Sumário

1 Introdução.....	16
2 Artigos.....	17
2.1 Artigo 1.....	17
2.2 Artigo 2.....	37
3 Considerações Finais.....	69
Referências.....	70

1 Introdução

A bovinocultura no Brasil é atualmente uma atividade que ocupa a maior extensão de terras destinadas a produção pecuária (SCHLESINGER, 2010). O Brasil é o país com segundo maior rebanho de bovinos do mundo, sendo responsável por 22,2% do rebanho mundial (USDA 2007). É, também, o segundo país maior produtor de carne bovina, responsável por 15,4% da produção mundial com efetivo de 214,9 milhões de cabeças, representando, juntamente com a União Europeia e os Estados Unidos, quase toda carne produzida no mundo. O Rio Grande do Sul possui 11,4 milhões de bovinos, representando o 6º maior produtor de gado bovino no Brasil e o 9º maior exportador de carne bovina in natura do país (IBGE 2017).

Apesar de números representativos relacionados a pecuária bovina do país frente ao cenário mundial, os índices produtivos ainda são insatisfatórios devido a perdas com diversas enfermidades, principalmente infecciosas (JUNQUEIRA, ALFIERE, 2006). Dados do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) tem demonstrado, que ao longo de 40 anos, na região Sul do RS, 60% dos bovinos morrem devido a doenças infecciosas, sendo 17,5% dessas mortes causadas por doenças virais e 39,8% por doenças bacterianas ((SCHILD et al. 2017). Como tentativa de melhorar a produtividade do rebanho é necessário, portanto, ter conhecimento dessas enfermidades e sua epidemiologia minimizando perdas econômicas e melhorando a produtividade.

Destacam-se entre as principais enfermidades infecciosas diagnosticadas no LRD/UFPel, a raiva (28,33% das doenças virais) e as clostridioses (6,85% das doenças bacterianas). As perdas anuais de bovinos por raiva são estimadas em aproximadamente 850.000 cabeças, que equivalem a aproximadamente 17 milhões de dólares (LIMA et al. 2005). Estudos sobre esta enfermidade no Rio Grande do Sul revelaram que a raiva bovina é endêmica (SANCHES et al. 2000, TEIXEIRA et al. 2008), tendendo a ser cíclica e reaparecendo com periodicidade de aproximadamente 7 anos (BARROS et al. 2006) ou 8 a 11 (ROEHE et al. 1987).

A raiva no ano de 2014 foi a terceira doença de maior ocorrência em bovinos da área de influência do LRD/UFPel (SCHILD et al. 2016).

Por sua vez as clostridioses estão entre as principais enfermidades que acometem os animais de produção com altas taxas de mortalidade e letalidade, acarretando grandes prejuízos econômicos na bovinocultura do país (LOBATO et al 2013). Surtos dessas enfermidades têm sido descritos isoladamente (DUTRA et al. 2001, ASSIS et al. 2005, LOBATO et al. 2006, DRIEMEIER et al. 2007, QUEVEDO et al. 2011), e revisões sobre essas doenças, descrição de sinais clínicos e formas de diagnóstico são encontradas na literatura (LOBATO et al. 2013), porém descrições da epidemiologia, que pode variar nas diferentes regiões não têm sido descritas. O controle dessas enfermidades é normalmente realizado com vacinas polivalentes, porém tem sido mencionada a necessidade de considerar a prevalência da doença, o custo-benefício, bem como a comprovar sua eficiência, fatos muitas vezes, não considerados na elaboração desses produtos (LOBATO et al. 2004).

O impacto econômico negativo causado pelas doenças infecciosas na pecuária, justifica a importância do estudo epidemiológico das doenças de rebanho e posterior desenvolvimento de medidas de controle e profilaxia dessas enfermidades.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia da raiva e das clostridioses que acometem os bovinos na região de abrangência do LRD/UFPel no período de 1978 a 2018 determinando os principais fatores que predispõe a ocorrência dessas enfermidades e estabelecer se as medidas profiláticas utilizadas para minimizar essas perdas são adequadas para a região.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Estudo epidemiológico da raiva em bovinos no Sul do Brasil: distribuição espacial e temporal de 2008 a 2017

Bianca Lemos dos Santos, Fábio Raphael Pascoti Bruhn, Ana Carolina Barreto Coelho, Pablo Estima-Silva¹, Joanna Vargas Echenique, Eliza Simone Viegas Sallis e Ana Lucia Schild

Publicado pela revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Estudo epidemiológico da raiva em bovinos no Sul do Brasil: distribuição espacial e temporal de 2008 a 2017

Bianca Lemos dos Santos¹, Fábio Raphael Pascoti Bruhn², Ana Carolina Barreto Coelho¹,
Pablo Estima-Silva¹, Joanna Vargas Echenique¹, Eliza Simone Viegas Sallis³
e Ana Lucia Schild^{4*}

ABSTRACT.- Santos B.L., Bruhn F.R.P., Coelho A.C.B., Estima-Silva P., Echenique J.Z., Sallis E.S.V. & Ana Lucia Schild 2018. [**Epidemiological study of rabies in cattle in Southern Brazil: spatial and temporal distribution from 2008 to 2017**] Estudo epidemiológico da raiva em bovinos no Sul do Brasil: distribuição espacial e temporal de 2008 a 2017. *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(x):xxx-xxx. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: alschild@terra.com.br

Rabies affects several domestic species, causing significant economic losses due to the death of animals in characteristic areas of the southern region of Rio Grande do Sul. In this context, the objective of this study was to study the epidemiology of rabies outbreaks observed in cattle from January 2008 to December 2017, through its space and time distribution in the southern region of Rio Grande do Sul. An observational and ecological retrospective study was carried out, through the analysis of data recorded in necropsy protocols performed in cattle at the Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel). A descriptive analysis of the data was done with the objective of evaluating the distribution of cases over time. For statistical analysis, Gretl statistical software 1.9.12 (GNU Regression, Econometric and Time-series Library) was used. To verify the existence of stationarity the Dickey-Fuller test was used, considering a value of $p < 0.05$. From January 2008 to December 2017, 1418 bovine diagnostic materials were received at the LRD / UFPel, and 160 outbreaks of rabies were confirmed in 160 farms located in the 24 municipalities of the LRD/UFPel area of influence. The number of animals infected with the virus was 591 cattle out of a total of 25,886. The

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas- (UFPel) Campus Capão do Leão, 96010-900, Pelotas, RS

²Professor Adjunto Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, 96010-900, Pelotas, RS

³Depto. de Patologia Animal Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, 96010-900, Pelotas, RS

⁴ Laboratório Regional de Diagnóstico, FV, UFPel, Campus. *Autor para correspondência, e-mail: alschild@terra.com.br

present study allowed to conclude that rabies does not have seasonality in the study region, with a tendency to decrease in frequency in the next years. The disease has an epidemic characteristic in most of the analyzed months (2012-2014), remaining endemic in the remaining period (2011, 2015 and 2016) with sporadic episodes of epidemics in these years. It was also observed that as the incidence of the disease increased in the animals and in the properties, there was a geographical spread of the virus for the majority (54.16%) of the municipalities in the area of influence of the LRD/UFPel.

INDEX TERMS: Epidemiology, descriptive analysis, mortality, epidemics

RESUMO.- A raiva afeta várias espécies domésticas, causando perdas econômicas significativas pela morte de bovinos em áreas bem características da região Sul do Rio Grande do Sul. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia dos surtos de raiva observados em bovinos de janeiro de 2008 a dezembro de 2017, por meio de sua distribuição no espaço e no tempo na região sul do Rio Grande do Sul. Foi realizado um estudo observacional e ecológico retrospectivo, por meio da análise de dados registrados nos protocolos de necropsias realizadas em bovinos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel). Foi feita análise descritiva dos dados para avaliar a distribuição dos casos ao longo do tempo. Para a análise temporal foi utilizado o software estatístico Gretl 1.9.12 (GNU Regression, Econometric and Time-series Library). Para verificar a existência da estacionariedade utilizou-se o teste de Dickey-Fuller aumentado, considerando um valor de $p < 0,05$. No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2017, foram recebidos no LRD/UFPel 1418 materiais de bovinos para diagnóstico, sendo confirmados 160 surtos de raiva em 160 propriedades situadas nos 24 municípios da área de influência do LRD/UFPel. O número de bovinos infectados pelo vírus foi de 591 de um total de 25.886. O presente estudo permitiu concluir que a raiva não tem sazonalidade na região do estudo, tendo tendência de queda na frequência nos próximos anos. A doença tem característica epidêmica na maioria dos meses analisados (2012-2014), mantendo-se endêmica no período restante (2011, 2015 e 2016) com episódios esporádicos de epidemias nestes anos. Observou-se ainda, que a medida em que aumentou a incidência da doença nos bovinos e nas propriedades, houve disseminação geográfica do vírus para a maioria (54,16%) dos municípios da área de influência do LRD/UFPel.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Epidemiologia, análise descritiva, séries temporais, mortalidade, epidemia.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade neurológica causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, com evolução invariavelmente fatal que acomete o homem e quase todos os mamíferos domésticos e silvestres que são reservatórios da doença, incluindo o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, que é o principal transmissor da doença para bovinos. A doença é endêmica em muitas partes do mundo, sendo uma importante zoonose com mortalidade mundial estimada em 40.000-100.000 humanos por ano (Fernandes & Riet-Correa 2007).

Na América do Sul a raiva dos herbívoros ocorre em surtos cíclicos, reaparecendo com periodicidade de aproximadamente sete anos (Hudson et al. 1996). As condições climáticas favoráveis, a presença de abrigos naturais e artificiais para o morcego, que permite a presença do vírus rábico na natureza, e a distribuição da população bovina por todo o território são os fatores responsáveis pela estabilidade enzoótica da raiva no Rio Grande do Sul. Apesar do sucesso no controle da raiva canina neste estado brasileiro, a raiva bovina é, ainda, endêmica em algumas regiões. No Brasil foi criado o Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) como objetivo de reduzir a prevalência da doença na população de herbívoros domésticos (MAPA 2017).

Segundo dados do Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel), no período de 1978 a 2015 foram recebidos 6.228 materiais de bovinos, destes, 206 foram diagnosticados com raiva, correspondendo 3.3% do total de diagnósticos de bovinos no laboratório (Schild et al. 2017). Os 24 municípios de abrangência do LRD/UFPel se localizam em seis das 34 microrregiões do Rio Grande do Sul e concentram, aproximadamente, 20% da população bovina do estado com rebanho efetivo de aproximadamente 2 milhões e 800 mil bovinos (Vergara 2017, comunicação pessoal), o que demonstra a importância deste estudo no Rio Grande do Sul.

Estudos sobre a distribuição espacial e temporal da raiva realizados em Minas Gerais, São Paulo e Bahia demonstram a influência de fatores como clima, temperatura e precipitação sobre a ocorrência de surtos de raiva em determinadas áreas (municípios),

em determinadas épocas do ano (sazonalidade) e ao longo dos anos (ciclicidade) (Silva et al. 2001, Menezes et al. 2008, Gomes et al. 2011, Teixeira et al. 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia dos surtos de raiva observados em bovinos de janeiro de 2008 a dezembro de 2017, por meio de sua distribuição no espaço e no tempo na região sul do Rio Grande do Sul, e identificar a distribuição de numerosos surtos da enfermidade na região, após a mesma ter sido controlada por um período de 12 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo, no qual foram resgatadas informações relativas a ocorrência de raiva bovina nos diferentes municípios do RS, entre 2008 e 2017, por meio da análise de dados registrados nos protocolos de necropsias e materiais recebidos realizadas em bovinos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel).

A região de estudo compreendeu a área de influência do LRD/UFPel (região sul do Rio Grande do Sul), composta por 24 municípios. Esses municípios pertencem a seis das 35 Microrregiões do Estado: 1- microrregião de Pelotas (Arroio do Padre, Canguçu, Capão do Leão, Cerrito, Cristal, Morro Redondo, Pedro Osório, Pelotas, São Lourenço do Sul e Turuçu); 2- microrregião Campanha Meridional (Aceguá, Bagé, Dom Pedrito, Hulha Negra e Lavras do Sul); 3- microrregião Campanha Central (São Gabriel e Santana do Livramento); 4- microrregião Serras do Sudeste (Candiota, Encruzilhada do Sul, Pedras Altas, Pinheiro Machado, Caçapava do Sul, Piratini e Santana da Boa Vista); 5- microrregião de Jaguarão (Arroio Grande, Herval e Jaguarão); e 6- microrregião do Litoral Lagunar (Rio Grande e Santa Vitória do Palmar) (Fig. 1).

Processamento e análise de dados

Foram resgatados os dados epidemiológicos de cada surto ou caso isolado diagnosticado no LRD/UFPel, registrando-se município de origem do bovino, mês e ano de ocorrência da doença. Além disso, foram obtidas informações sobre o número de propriedades e o número de bovinos afetados por raiva e a localização de cada propriedade de acordo com o Sistema de Posicionamento Global (GPS).

Os dados foram analisados por meio de métodos estatísticos temporais e espaciais. Para isso foram construídos os seguintes indicadores, relacionados à morbidade da doença: i. taxa de incidência animal (TIA) =bovinos positivos/todos os bovinos criados nos municípios pesquisados (x1000000); ii. taxa de incidência entre propriedades (TIP) =propriedades positivas/total de propriedades existentes nos municípios da área de abrangência do LRD/UFPeL (x100000); iii. taxa incidência propriedades com surtos (TIPS) =propriedades positivas/propriedades que ocorreram surtos (x100); iv. taxa incidência por município (TIM) =municípios positivos/total de municípios da área de abrangência do LRD/UFPeL (x100); v. taxa de mortalidade específica da raiva (TMER) =bovinos positivos/bovinos mortos por qualquer doença em bovinos no LRD/UFPeL (x100). A partir desses dados foi realizada análise estatística descritiva de forma bivariada, usando como variável dependente a incidência da raiva nos bovinos, a incidência nas propriedades e a incidência nos municípios nos quais ocorreram casos; e como variável independente o ano, o mês, a microrregião e o município.

Séries Temporais

Foi feita análise dos dados avaliando-se a distribuição dos casos ao longo do tempo, além de verificar as mudanças no comportamento da doença ao longo dos anos, principalmente no que se refere a morbidade e a sensibilidade do sistema do LRD/UFPeL. Para as análises temporais utilizou-se o software estatístico Gretl 1.9.12 (GNU Regression, Econometric and Time-series Library). Foi realizada análise da existência dos componentes de tendência e sazonalidade, por meio da verificação das séries e dos seus respectivos correlogramas. Uma vez verificada a existência desses componentes, as séries foram diferenciadas e, posteriormente, testadas estatisticamente em relação a existência da estacionariedade por meio de testes de Dickey-Fuller aumentado (Dickey & Fuller 1979), considerando um valor de $p < 0,05$ (Baptista et al. 2016, Morettin & Toloí 2006). Uma vez observada estacionariedade nas séries diferenciadas, inferiu-se a presença ou ausência dos componentes tendência e sazonalidade nas séries mensais consideradas. Foram realizados, também, por meio do cálculo de modelos de Mínimos Quadrados Ordinários (MQO), a estimação da tendência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e o cálculo do coeficiente de determinação (R^2) nas séries temporais dos indicadores ao longo do tempo.

Visando caracterizar a dinâmica de ocorrência de endemias e epidemias relacionadas a morbidade da raiva em bovinos no Sul do RS, foram construídos diagramas de controle, baseados na distribuição dos casos entre 2011 e 2016, seguindo a metodologia das médias geométricas das taxas, mais adequada quando se observam distribuição assimétrica dos casos ao longo dos anos, conforme descrito por Bortman (1999). Foi realizada a transformação logarítmica (Log10) dos dados originais. A partir dos valores transformados, foram calculadas as médias geométricas e os intervalos de confiança a 95% (IC.95%), estes usados como limites endêmicos inferior e epidêmico e a curva endêmica (Bortman 1999).

Análise espacial

A distribuição dos casos de raiva em cada município foi analisada a partir de mapas temáticos, construídos por meio do software ArcGis for desktop 10.2.1. Foram utilizados *shapefiles*, formato de armazenamento de dados espaciais, que consiste na posição, forma e atributos das características geográficas, fornecidos pelo IBGE 2018. Mapas foram projetados anualmente com base nos casos de raiva sobrepostos em cada área do município.

A ferramenta de análise *hot spot* foi utilizada para à identificação de agrupamentos espaciais, a partir da identificação dos valores altos (*hot spots*) e valores baixos (*cold spots*)(Anselin 1995) de incidência de raiva bovina. De acordo com a Getis & Ord (Getis & Ord 1992), a análise *hot spot* calcula a concentração ou a falta de concentração da soma dos valores associados às variáveis em um conjunto de dados. Assumindo um padrão de distribuição normal, quando a probabilidade associada a um escore z é positiva ou negativamente maior do que um nível de significância específico (valor P), obtém uma associação espacial positiva ou negativa. Assim, para z-scores positivos, a intensidade de agrupamento espacial de valores altos (*hot spots*) aumenta quando o z-score é maior. Por outro lado, para z -escores negativos, a intensidade do agrupamento espacial de valores baixos (*cold spots*) aumenta quando o z-escore é menor.

RESULTADOS

No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2017, foram recebidos no LRD/UFPel 1418 materiais de bovinos para diagnóstico, incluindo cadáveres, cabeças ou encéfalos e outros

órgãos. Neste período foram observados 160 surtos de raiva. Esses surtos ocorreram em 160 propriedades situadas nos 24 municípios que compreendem a área de influência do LRD/UFPel. O número de bovinos afetados com o vírus foi de 591 bovinos de um total de 25.886 criados nas propriedades infectadas.

Entre os anos de 2008 e 2011 o vírus da raiva em bovinos atingiu apenas quatro desses 24 municípios todos da microrregião de Pelotas, porém entre 2012 e 2014 a enfermidade foi diagnosticada em 13 dos 24 municípios (54,16%), pertencentes as microrregiões de Pelotas, Serra do Sudeste, Campanha Meridional e Jaguarão. Em 2015 a microrregião Campanha Central também registrou casos da doença. Em 2015, sete municípios foram acometidos com os surtos de raiva, oito em 2016 e três em 2017.

A maior taxa de incidência de raiva entre os bovinos ocorreu no município de Capão do Leão, RS, com 3,6 casos / 1000000 de bovinos infectados (Quadro 1). A maior taxa de incidência entre as propriedades situadas nos 24 municípios da área de influência do LRD/UFPel foi, também, no município do Capão do Leão, ou seja, seis propriedades criadoras de bovinos em cada 100 mil foram infectadas com o vírus da raiva (Quadro 1).

De acordo com a distribuição dos surtos de raiva em bovinos entre 2008 e 2011 ocorreram 24 surtos, representando 15% do total de surtos observados no período do estudo. Entre os anos de 2012 e 2014, foram diagnosticados 110 surtos, equivalente a 68,75% do total. No período de 2015 a 2017 ocorreram 26 surtos, 16,25% do total. As taxas de incidência dos casos de raiva, por ano, observadas na área de influência do LRD/UFPel são apresentadas Quadro 2.

Observando-se a distribuição da raiva ao longo do ano, verificou-se que no mês de março, abril e setembro ocorreu a maior taxa de incidência nos bovinos e a maior taxa de incidência nas propriedades, considerando o número total de propriedades nos 24 municípios. Entre fevereiro e junho ocorreram as maiores taxas de incidência entre propriedades com surtos de raiva. Em março observou-se a maior taxa de incidência entre os municípios do estudo. Em relação a taxa de mortalidade específica da raiva no LRD/UFPel, foi observado que o maior percentual foi entre os meses de março e abril (Quadro 3).

Na análise estatística de séries temporais entre os anos 2013 e 2016 foi observada ausência de sazonalidade ($p > 0,05$) e presença de tendência ($p < 0,05$) em todos os indicadores analisados (Figs. 2 e 3).

As curvas endêmicas da taxa de incidência de raiva entre bovinos e da taxa de incidência entre propriedades na área do estudo no período de 2011 a 2016 são apresentadas na Figura 4.

De acordo com a análise espacial descritiva dos casos de raiva em bovinos, no período de 2011 a 2014 houve disseminação da doença na área de influência do LRD/UFPel. Em 2011 apenas na microrregião de Pelotas houve casos, que se disseminaram para a microrregião da Serra do Sudeste em 2012 e para a microrregião de Jaguarão em 2013 e 2014. A partir do ano 2015 houve diminuição dos municípios e microrregiões atingidas. Em 2015 apesar da doença ter se disseminado para microrregião da campanha meridional, apenas em São Lourenço do Sul e Bagé houve aumento do número de casos comparado com anos anteriores. Em 2016 a doença teve aumento apenas em Lavras do Sul e no Capão do Leão e em 2017 apenas em Turuçu (Fig. 5).

Análise *hot spots* demonstrou estatisticamente ($p < 0.05$) que o agrupamento de raiva na microrregião de Pelotas disseminou-se em direção a microrregião da Serra dos Sudeste e Campanha Meridional nos anos de 2011 a 2014. De 2015 a 2017 houve diminuição da quantidade de agrupamento nos municípios observados (Fig. 6).

DISCUSSÃO

Com relação a distribuição temporal da raiva bovina avaliada nos 24 municípios do estudo entre 2008 e 2017, foi observado que o número de municípios com diagnóstico de raiva variou ao longo do tempo. Esses dados demonstram que o vírus se disseminou para áreas nas quais anteriormente não havia registros da doença. Isso provavelmente ocorreu devido à falta de combate ao morcego, que em condições ambientais favoráveis se mantém e transpõe barreiras geográficas favorecendo a disseminação do vírus (Fernandes & Riet-Correa 2007, Gomes et al. 2011, Dognani et al. 2016) e a falta de vacinação preventiva sistemática dos rebanhos. A partir de 2015 novamente houve diminuição no número de municípios com surtos da doença, provavelmente em função das medidas de controle tomadas a partir dos surtos diagnosticados nos anos anteriores.

Os surtos de raiva ocorrem em áreas bem características da região sul do estado, por um lado às margens da lagoa dos Patos com áreas de vegetação nativa e grandes figueiras centenárias (São Lourenço do Sul, Turuçu, Pelotas e Cristal) e por outras áreas de serra com mata nativa e morros de pedra com cavernas (Canguçu, Santana da Boa

Vista, Morro Redondo, Arroio do Padre, Piratini, Pinheiro Machado e Herval). Ambas as regiões proporcionam abrigos ideais para a formação das colônias de morcegos. Nesta região, além do abrigo, as colônias encontram alimento em abundância, principalmente em criações de bovinos (Póvoas et al. 2012). Em municípios vizinhos como Rio Grande e Arroio Grande com campos planos, baixos e alagadiços os casos de raiva não ocorrem ou são pouco frequentes.

A distribuição dos surtos de raiva em bovinos variou no tempo. Entre o período de 2012 e 2014 a taxa de incidência da doença nos bovinos foi superior à taxa de incidência nos demais anos do estudo. No período de 2015 a 2017 houve uma queda no número de diagnósticos. Estes resultados sugerem a ocorrência de ciclicidade da raiva nesta região, embora isto não tenha sido comprovado estatisticamente. Em um trabalho realizado no Paraná em um período de 35 anos foi sugerida a ciclicidade da doença a cada 18 anos (Dognani et al. 2016), por outro lado, em estudos realizados no Mato Grosso do Sul (Mori & Lemos 1998, Neves 2008, Ribas et al. 2013), em São Paulo (Gomes et al. 2011) e na Paraíba (Galiza et al. 2010) foi sugerido um período de 5-7 anos para a ciclicidade da raiva em bovinos.

A cada mês é esperado que ocorra menor número de casos de raiva entre bovinos, nas propriedades e nos municípios, pois em todas as situações foi observada tendência de queda ao longo dos anos analisados ($p < 0,05$). O mesmo foi descrito por Menezes et al. (2008) em um estudo realizado em Minas Gerais entre 1998 e 2006. Em outro estudo realizado no Paraná entre 1977 e 2012, foi observada ausência de tendência e de sazonalidade (Dognani et al. 2016). Além disso, embora alguns trabalhos realizados no RS tenham sugerido que a maioria dos casos de raiva ocorre nos meses do outono e inverno (Marcolongo-Pereira et al. 2011) e na primavera e verão (Rech et al. 2006), a raiva não apresenta sazonalidade na região Sul do RS ($p > 0,05$). A ausência de sazonalidade foi observada, também, em estudos realizados no Nordeste do Brasil (Lima et al. 2005), em São Paulo (Gomes et al. 2011) e no MS (Mori & Lemos 1998).

A doença tem característica epidêmica na maioria dos meses dos anos analisados entre 2012 e 2014 mantendo-se endêmica no período restante (2011, 2015 e 2016) com episódios esporádicos de epidemias nestes anos. Tem sido demonstrado em outros trabalhos que a raiva em bovinos é uma doença endêmica, com ocorrência variável entre os anos, porém com poucas epidemias ao longo dos anos (Dognani et al. 2016), diferente do observado neste trabalho. Observou-se, ainda que a medida em que aumentou a

incidência da doença nos bovinos e nas propriedades, houve disseminação geográfica do vírus para a maioria (54,16%) dos municípios da área de influência do LRD. A vacinação preventiva e sistemática nas propriedades é recomendável, uma vez que o combate ao morcego não tem eficiência suficiente para minimizar os riscos. Além disso, pouco é conhecido sobre o ciclo silvestre da raiva que tem canídeos selvagens como reservatórios do vírus e são uma fonte de contaminação além dos morcegos.

No período do estudo observou-se não apenas a disseminação da doença para municípios vizinhos não afetados, como também a permanência da enfermidade nas áreas atingidas anteriormente. A disseminação dos casos de raiva pode estar relacionada com a expansão geográfica de abrigos dos morcegos hematófagos (Dognani et al. 2016). No presente trabalho foi observado que os municípios com casos de raiva possuem características ambientais favoráveis para surgimento de novos abrigos para esta espécie.

De acordo com a análise espacial descritiva e *hotspots* foi observado período de expansão da doença até o ano de 2014 e período de queda ao longo dos demais anos estudados. Esta característica foi encontrada, também, em estudos da distribuição espaço temporal da raiva em bovinos realizados em Minas Gerais no período de 1998 a 2016 (Menezes et al. 2008) e em estudo no estado do Paraná entre 1977 e 2012 (Dognani et al. 2016). A diminuição dos casos de raiva a partir de 2015 pode estar relacionada com a maior efetividade das ações de vigilância epidemiológicas de combate ao morcego e vacinação sistemática dos rebanhos.

CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

1. A raiva não apresenta sazonalidade na região Sul do Rio Grande do Sul.
2. Há tendência de queda na frequência dos casos nos próximos anos.
3. A doença tem característica epidêmica na maioria dos meses dos anos analisados entre 2012 e 2014.
4. É endêmica no período restante (2011, 2015 e 2016) com episódios esporádicos de epidemias nestes anos.
5. A medida em que aumentou a incidência da doença nos bovinos e nas propriedades, houve disseminação geográfica do vírus para a maioria (54,16%) dos municípios da área de influência do LRD.

6. A análise espacial demonstrou que a doença se dissemina principalmente pela proximidade geográfica entre municípios e microrregiões vizinhas.

REFERÊNCIAS

- Anselin L. 1995. Local Indicators of Spatial Association - LISA. *Geo Analysis*. 27:93–115.
- Baptista D.Q., Bruhn F.R.P., da Rocha C.M.B.M., Torres F.C., Machado E.D., Sáfydi T. & Pereira S.M. 2016. Temporal series analyses in equine infectious anemia cases in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 2007 to 2011. *Pesq. Vet. Bras.* 38(4): 431-438.
- Bortman M. 1999. Elaboración de corredores o canales endémicos mediante planillas de cálculo. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 5(1):1-8.
- Dickey, D. & Fuller, W. 1979. Distribution of the estimators for autoregressive time series with a unit root. *Journal of the American Statistical Association*. 74(366):427-431.
- Dognani R., Pierre E.J., Silva M.C.P., Patrício M.A.C., Costa S.C., Prado J.R., Lisboa J.A.N. 2016. Epidemiologia descritiva da raiva dos herbívoros notificados no estado do Paraná entre 1977 e 2012. *Pesq. Vet. Bras.* 36(12):1145-1154.
- Fernandes C.G. & Riet-Correa F. 2007. Raiva, p.184-198. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.1. Pallotti, Santa Maria. 719p.
- Galiza G.J.N., Silva M.L.C.R., Dantas A.F.M., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2010. Doenças do sistema nervoso central de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):267-276.
- Getis A & Ord JK. 1992. The analysis of spatial association by use of distance statistics. *GeoAnalysis*. 24:189–206.
- Gomes M.N., Monteiro A.M.V. & Escada M.I.S. 2011. Raiva bovina segundo os mosaicos de uso e cobertura da terra no estado de São Paulo entre 1992 e 2003. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 63(2):287-295.
- Hudson L.C., Weinstock D. & Jordan T. 1996. Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. *J. Vet. Med. B.* 43(2):85-95.
- IBGE 2018. Produção da Pecuária Municipal - 2014 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>
- Lima E.F., Riet-Correa F., Castro R.S., Gomes A.A.B. & Lima F.S. 2005. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso central e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25(4):250-264.
- MAPA 2017. Controle da Raiva dos Herbívoros e Encefalopatia Espongiforme Bovina EEB Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/> programas-de-saude-animal/prog-nacional-de-controle-da-raiva-dos-herbivoros-e-outras-encefalopatias. Acesso em 24/7/2018.
- Marcolongo-Pereira C., Sallis E.S.V., Grecco F.B., Raffi M.B., Mauro P.S., Schild A.L. 2011. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):331-335.
- Menezes F.L., Silva J.A., Moreira E.C., Meneses J.N.C., Magalhães D.F., Barbosa A.D. & Oliveira C.S.F. 2008. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais,

- 1998 a 2006. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(3):566-573.
- Morettin P. A. & Toloi C. M. C. 2006. *Análise de séries temporais*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, p. 2006. 729.
- Mori A. E. & Lemos R.A.A. 1998. Raiva, p.47-58. 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.
- Neves D.A. 2008. *Sazonalidade e ciclicidade da raiva em herbívoros domésticos no estado do Mato Grosso do Sul, 1998 a 2006*. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 84p.
- Rech R.R., Rissi D.R., Pierezan F., Inkelmann M.A. & Barros C.S.L. 2006. Raiva em herbívoros: 27 casos. *Endivet*, Campo Grande, MS. (Resumo)
- Ribas N.L.K.S., Carvalho R.I., Santos A.C., Valençuela R.A., Gouveia A.F., Castro M.B., Mori A.E. & Lemos R.A.A. 2013. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 33(10):1183-1194.
- Schild A.L., Marques L.S., Coelho A.C.B., Echenique J.Z., Lemos B.S., Estima-Silva P., Oliveira P.A. 2017. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico*. Principais diagnósticos realizados em ruminantes e equinos no Laboratório Regional de Diagnóstico entre 1978-2016. 39:48-51.
- Silva J.A., Moreira E.C., Haddad J.P.A., Modena C.M., Tubaldini M.A.S. 2001. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53(3)
- Póvoas D.R., Chaves N.P., Bezerra D.C., Almeida V.M., Saraiva L.Q. 2012. Rabies in herbivorous in the state of Maranhão: a retrospective study. *R. bras. Ci. Vet.*, 19(2): 86-89.
- Teixeira L.H.M, Tomaz L.A.G., Linhares G.F.C., Santos M.F.C., Jayme V.S. 2015. Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. *Cienc. anim. bras.* 16 (1):144-157.
- Vergara E.N. 2017. *Seção de Gestão dos Processos e da Informação*. Fiscal Estadual Agropecuário- IF 2372568. Secretaria Estadual da Agricultura Pecuária e Abastecimento (SEAPA/RS). Av. Getúlio Vargas, 1384 - Menino Deus, Porto Alegre - RS, 90150-004.

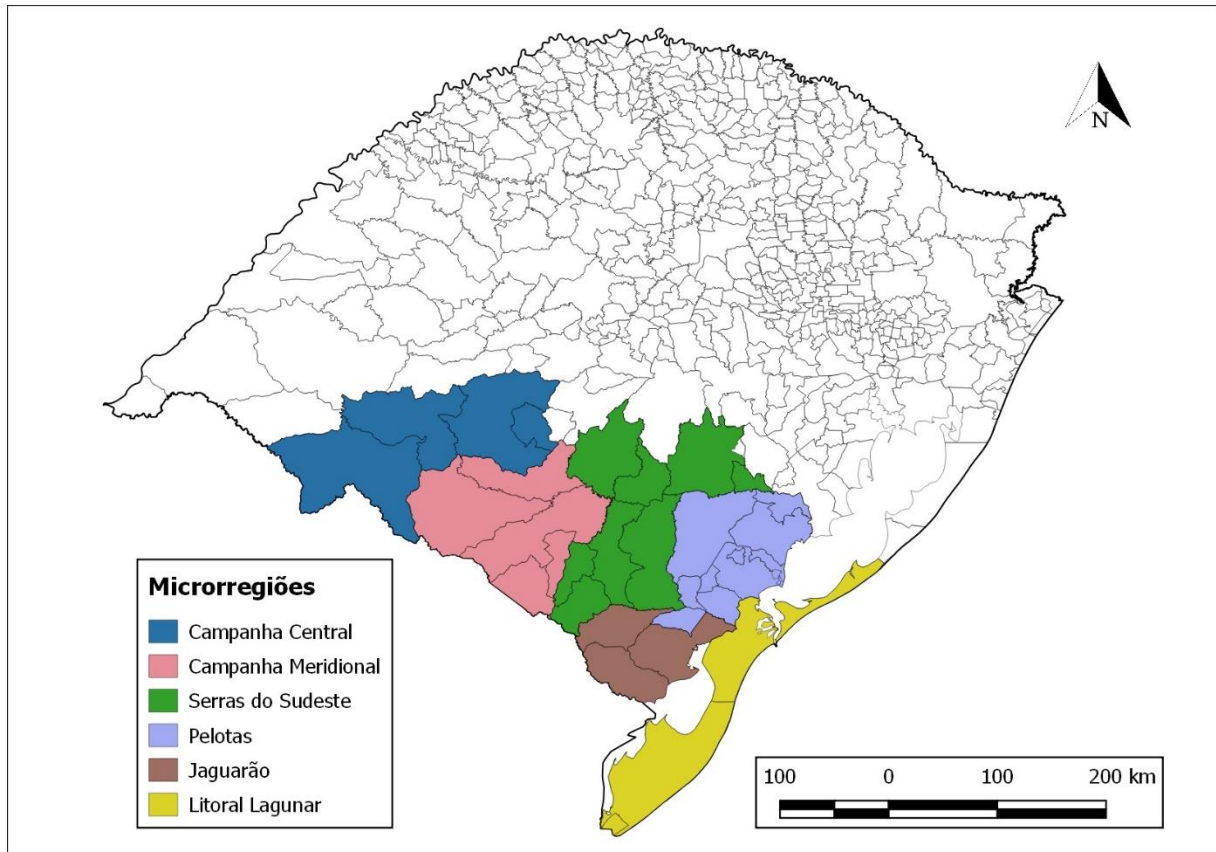


Figura 1. Microrregiões da área de influência do LRD/UFPel (região Sul do Rio Grande do Sul).

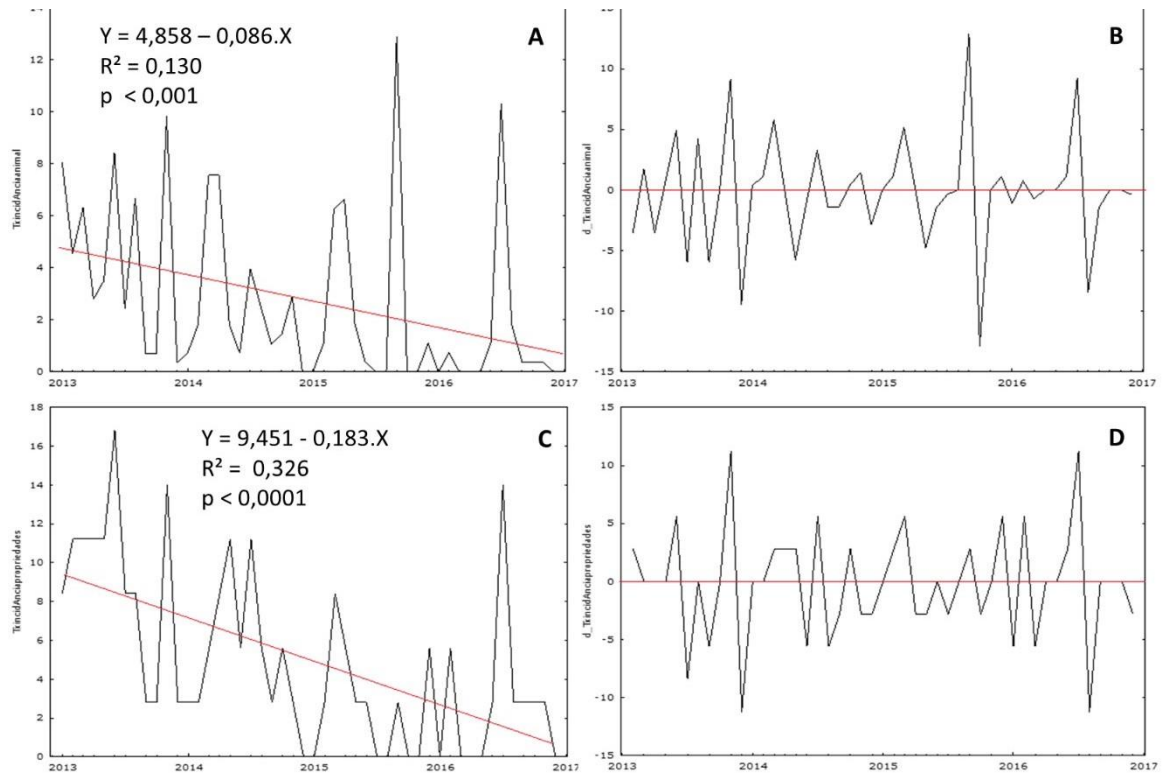


Figura 2 A e B. Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de incidência entre bovinos com vírus rábico (x 1.000.000 de bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. **A.** série original, **B.** Série livre de tendência. **Figura 2 C e D.** Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de incidência entre propriedades com o vírus rábico (x 100.000 bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. **C.** Série original. **D.** Série livre de tendência.

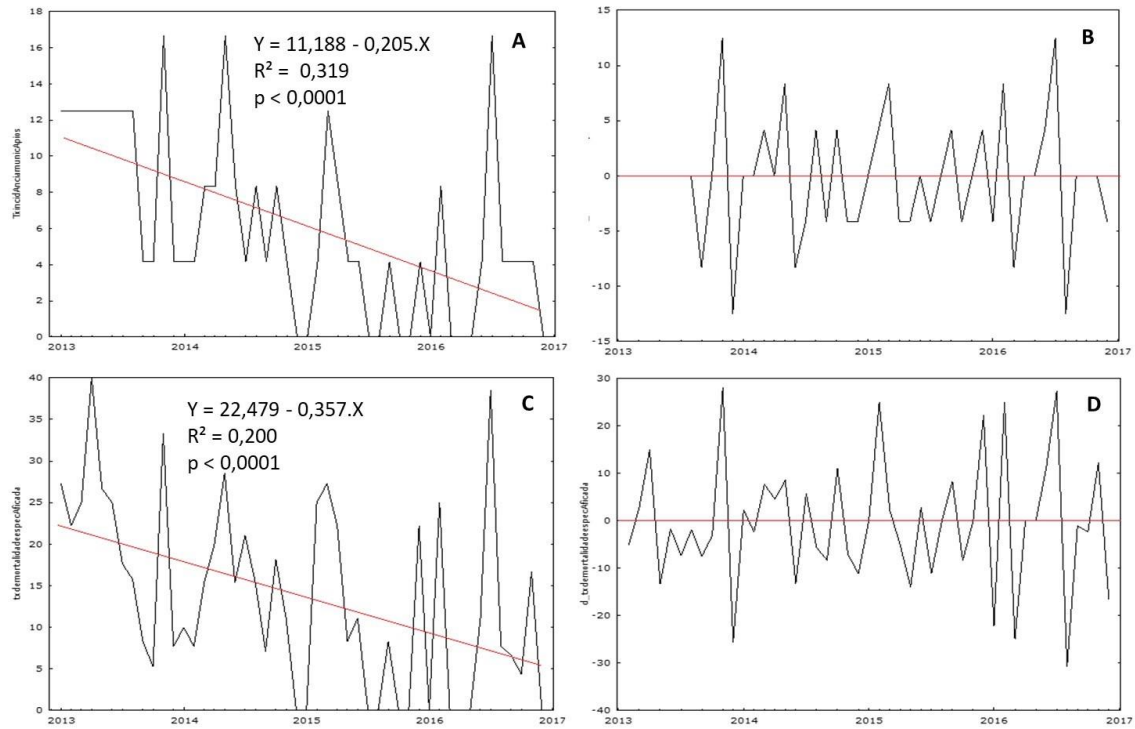


Figura 3 A e B. Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de incidência entre municípios com vírus rábico (1 caso a cada 100 bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. **A.** Série original. **B.** Série livre de tendência. **Figura 3 C e D.** Série temporal e equação da reta de tendência da taxa de mortalidade específica da raiva em bovinos (1 caso a cada 100 bovinos) na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico/Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2013 a 2016. **C.** Série original. **D.** Série livre de tendência.

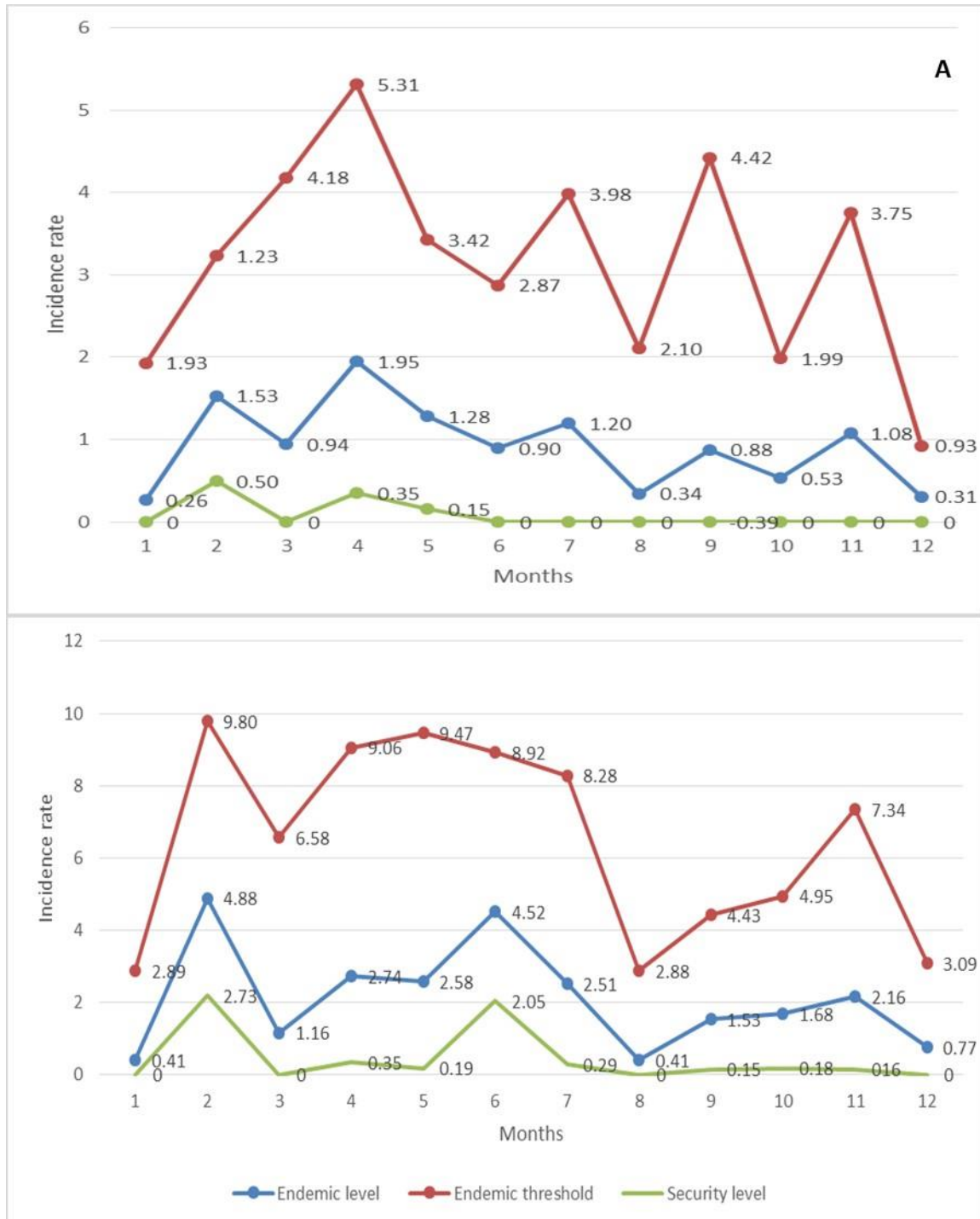


Figura 4 A. Curva endêmica da taxa de incidência de raiva entre bovinos (x1000000)* na área de influência do Laboratório regional diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2011 a 2016. *Número de bovinos positivos / total de bovinos criados nos 24 municípios (x1000000). **B.** Curva endêmica da taxa de incidência entre propriedades (x100000)* na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, de 2011 a 2016.

*número de propriedades positivas / número de propriedades nos 24 municípios (x100000).

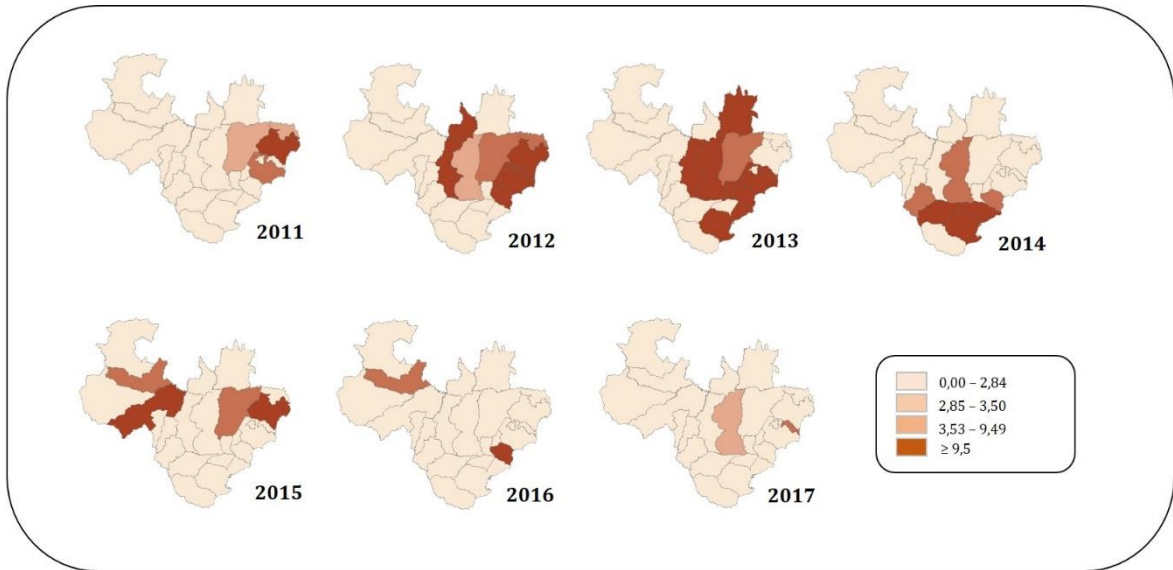


Figura 5. Taxa de incidência (casos x 1000000) de raiva em bovinos nos municípios da região sul do Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2017.

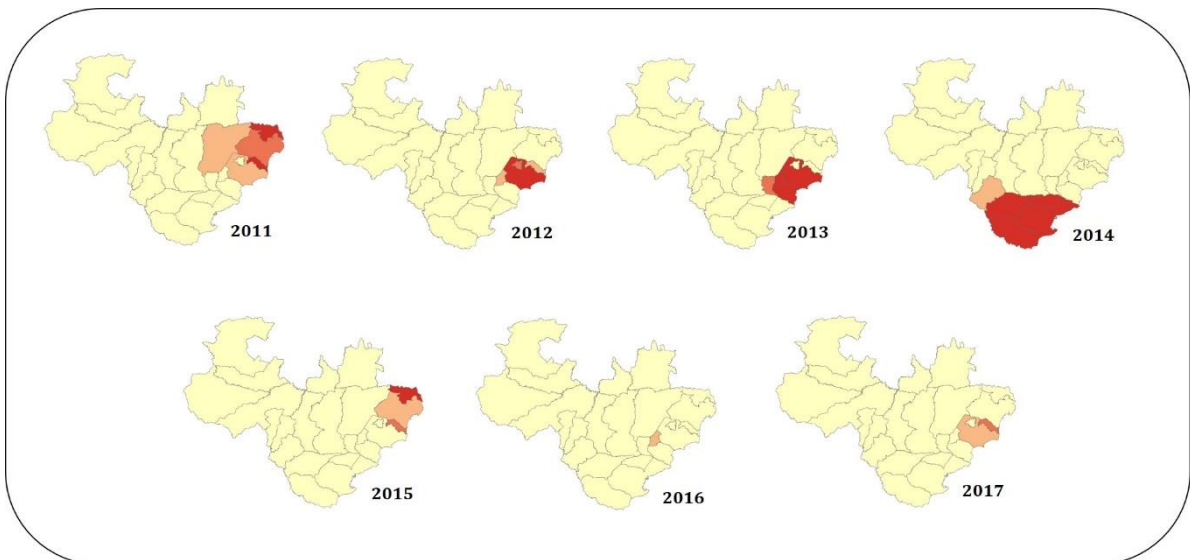


Figura 6. Áreas contendo aglomerados (análise hot spot) de casos de raiva em bovino nos municípios da região sul do Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2017. A análise de ponto quente foi realizada com o software ArcGis 10.2.1. Áreas vermelhas indicam aglomerados de valores altos (hot spot).

Quadro 1. Taxa de incidência de casos de raiva nos 24 municípios da região de abrangência do Laboratório Regional de Diagnóstico, Rio Grande do Sul, no período de 2008 a 2017

Microrregiões	Municípios	TIA ¹	TIP ²	TIPS ³	TMER ⁴	
Pelotas	Arroio do Padre	0.10	0.30	0.62	23.08	
	Canguçu	1.93	4.82	10.62	22.86	
	Capão do Leão	3.60	6.21	13.75	19.96	
	Cerrito	0.32	0.62	1.25	14.81	
	Cristal	0,10	0.62	1.25	3.28	
	Morro redondo	0.64	3.12	6.87	35.85	
	Pedro Osório	0.31	0.84	1.87	2.69	
	Pelotas	2.54	8.40	18.75	16.40	
	São Lourenço do Sul	2.41	5.00	11.25	16.40	
	Turuçu	0.40	1.41	3.12	7.43	
Campanha Meridional	Bagé	1.26	0.82	1.87	26.14	
	Dom Pedrito	0.22	0.32	0.62	1.87	
	Hulha negra	0.11	0.34	0.62	1.41	
	Lavras do Sul	1.24	0.81	1.87	26.23	
Campanha Central	São Gabriel	0.20	0.30	0.62	100.00	
	Serras do Sudeste	Candiota	0.03	0.30	0.62	6.67
	Encruzilhada do Sul	0.52	0.30	0.62	75.00	
	Pedras Altas	0.31	0.60	1.25	10.11	
	Pinheiro Machado	1.24	1.72	3.75	61.54	
	Piratini	1.54	2.24	5.00	28.39	
	Santana da Boa vista	0.43	1.71	3.75	29.73	
	Jaguarão	Arroio Grande	1.13	1.71	3.75	21.02
		Herval	1.00	1.42	3.12	30.47
Jaguarão		0.03	0.30	0.62	0.53	

¹ TIA=[bovinos positivos / todos os bovinos criados nos municípios de abrangência do LRD/UFPEL (x1000000)]/10; ²TIP=[propriedades positivas / total de propriedades existentes nos municípios pesquisado (x100000)]/10; ³TIPS=propriedades positivas / propriedades que ocorreram surtos (x100); ⁴ TMER=bovinos positivos / bovinos mortos por qualquer doença no LRD/UFPEL(x100)

Quadro 2. Taxa de incidência de casos de raiva, por ano, na região de abrangência do Laboratório Regional de Diagnóstico, Rio Grande do Sul, no período de 2008 a 2017

Ano	TIA ¹	TIP ²	TIPS ³	TIM ⁴	TMER ⁵
2008	4.98	14.02	3.50	8.33	3.79
2009	2.57	11.21	2.78	8.33	1.50
2010	8.10	8.41	2.10	4.17	5.94
2011	13.00	33.64	8.39	16.67	7.38
2012	54.24	134.59	33.57	50.00	35.63
2013	55.45	109.36	27.27	41.67	24.96
2014	31.33	64.49	16.08	54.17	13.72
2015	30.19	30.84	7.69	29.17	19.52
2016	15.09	3.08	8.39	33.33	8.54
2017	2.45	8.41	2.10	12.5	1.55
Total	21.7	41.81	11.19	25.83	12.25

¹ TIA=bovinos positivos / todos os bovinos criados nos municípios de abrangência do LRD/UFPEL (x1000000); ²TIP=propriedades positivas / total de propriedades existentes nos municípios pesquisado (x100000); ³TIPS=propriedades positivas / propriedades que ocorreram surtos (x100); ⁴ TIM=municípios positivos / total de municípios da área de abrangência do LRD/UFPEL (x100); ⁵ TMER=bovinos positivos / bovinos mortos por qualquer doença no LRD/UFPEL(x100)

Quadro 3. Taxa de incidência de casos de raiva, por mês, na região de abrangência do Laboratório Regional de Diagnóstico, Rio Grande do Sul, no período de 2008 a 2017

Meses	TIA ¹	TIP ²	TIPS ³	TIM ⁴	TME ⁵
Janeiro	1.13	1.96	4.38	20.83	36.67
Fevereiro	1.85	4.21	9.38	29.17	57.45
Março	2.47	4.77	10.63	41.67	75.79
Abril	2.74	5.33	11.88	33.33	60.15
Maio	1.78	5.88	13.13	50.00	38.23
Junho	1.26	4.21	9.38	33.33	29.84
Julho	1.88	4.48	10.00	33.33	37.41
Agosto	1.27	1.96	4.38	20.83	27.82
Setembro	2.50	3.36	7.50	20.83	56.15
Outubro	0.99	3.08	6.88	33.33	20.57
Novembro	1.85	3.92	8.75	33.33	51.43
Dezembro	0.38	1.68	3.75	20.83	12.22
Total	1.45	3.73	8.34	30.90	42.00

¹ TIA=[bovinos positivos / todos os bovinos criados nos municípios de abrangência do LRD/UFPe] (x1000000)]/10;

²TIP=[propriedades positivas / total de propriedades existentes nos municípios pesquisado (x100000)]/10; ³TIPS=propriedades positivas / propriedades que ocorreram surtos (x100); ⁴TIM= municípios positivos / total de municípios da área de abrangência do LRD/UFPe] (x100); ⁵ TME=bovinos positivos / bovinos mortos por qualquer doença no LRD/UFPe] (x100)

2.2 Artigo 2

Clostridial diseases diagnosed in cattle from the South of Rio Grande do Sul, Brazil. A forty-year survey (1978-2018) and a brief review of the literature

Bianca I. Santos, Silvia R. L. Ladeira, Franklin Riet-Correa, Mauro Pereira Soares, Clairton Marcolono-Pereira, Eliza Simone Viegas Saliis, Margarida Buss Raffi and Ana Lucia Schild

Publicado pela revista Pesquisa Veterinária Brasileira

**Clostridial diseases diagnosed in cattle from the South of Rio Grande do Sul, Brazil.
A forty-year survey (1978-2018) and a brief review of the literature ⁵**

Bianca L. Santos⁶, Silvia R. L. Ladeira², Franklin Riet-Correa⁷, Mauro Pereira Soares², Clairton Marcolongo-Pereira⁸, Eliza Simone Viegas Sallis⁹, Margarida Buss Raffi⁵ and Ana Lucia Schild^{2*}

ABSTRACT.- Santos B.L., Ladeira S.R.L., Riet-Correa F., Soares M.P., Marcolongo-Pereira C., Sallis E.S.V., Raffi M.B. & Schild A.L. 2019. [**Clostridial diseases diagnosed in cattle from the South of Rio Grande do Sul, Brazil. A forty-year survey (1978-2018) and a brief review of the literature**]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório Regional de Diagnóstico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n. 96160-000, Pelotas, RS, Brazil. alschild@terra.com.br

Clostridial diseases are important causes of livestock losses in southern Rio Grande do Sul. Annual surveys conducted at the Laboratório Regional de Diagnóstico of the Federal University of Pelotas (LRD/UFPel) since 1978 have shown that clostridial diseases represent 10.40% of the bacterial diseases diagnosed in cattle and 1.65% of all diseases diagnosis in cattle over a 40-year period. The purpose of this study is to review the clinical, epidemiological and pathological aspects of the clostridial diseases diagnosed in cattle from January 1978 to December 2018 at the LRD/UFPel in the hopes that it will constitute a useful guide for field veterinary practitioners and interested farmers. We assessed and review the necropsy protocols of 6,736 cattle; this necropsies were performed either by LRD/UFPel faculty or by field veterinary practitioners; 111 outbreaks (1.65%) were diagnosed as clostridial disease, distributed as follows: 35 outbreaks of tetanus, 34 of blackleg, 23 of bacillary hemoglobinuria, 11 of malignant edema (gas gangrene), and eight

⁵ Received on ..

Accepted for publication on . This work is part of the requirements for obtaining the doctoral degree by the first author.

⁶ Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n. CEP 96160-000, Pelotas, RS, Brazil. *Corresponding author (alschild@terra.com.br).

⁷ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental La Estanzuela, Ruta 50 Km 11, Colonia del Sacramento, Colonia, Uruguay.

⁸ Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário do Espírito Santo (Unesc). Av. Fioravante Rossi, 2930, CEP 29703-900 Colatina ES, Bolsista da FAPES

⁹ Departamento de Patologia, Faculdade de Veterinária, UFPel, Campus Capão do Leão, s/n. CEP 96160-000, Pelotas, RS, Brazil.

of botulism. Approximately 904, from a total of 42,480 cattle at risk, died in these outbreaks.

INDEX TERMS: Blackleg, botulism, malignant edema, gas gangrene, bacillary hemoglobinuria, tetanus, *Clostridium* spp.

RESUMO.- [Clostridioses diagnosticadas em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. Uma pesquisa de quarenta anos (1978-2018) e breve revisão da literatura]. Clostridioses são doenças produzidas por alguma das espécies do gênero *Clostridium* e são importantes causas de perdas pecuárias no sul do Rio Grande do Sul. Pesquisas anuais realizadas no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) desde 1978 demonstraram que as clostridioses representaram 11,1% das doenças bacterianas diagnosticadas em bovinos e 1,65% de todos os diagnósticos de doenças em bovinos ao longo de 40 anos. O objetivo deste estudo é revisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos das clostridioses diagnosticadas de janeiro de 1978 a dezembro de 2018, pelo LRD/UFPel com a intenção de que esse trabalho possa servir de guia útil para os veterinários de campo e fazendeiros interessados. Foram avaliados e revisados os protocolos de necropsia de 6.736 bovinos; essas necropsias foram realizadas pelo pessoal do LRD/UFPel ou por veterinários de campo. Cento e quatro (1,16%) casos foram diagnosticados como clostridioses, distribuídos da seguinte forma: 35 surtos de tétano, 34 de carbúnculo sintomático, 23 de hemoglobinúria bacilar, 11 de edema maligno (gangrena gasosa) e oito de botulismo. Aproximadamente 904, de um total de 42.480 bovinos sob-risco, morreram nesses surtos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Carbúnculo sintomático, botulismo, edema maligno, gangrena gasosa, hemoglobinúria bacilar, tétano, *Clostridium* spp.

INTRODUCTION

Clostridial diseases are bacterial diseases caused by one or more of the several species of *Clostridium* and their potent toxins. Members of the genus *Clostridium* are gram-positive anaerobic rods that form heat-resistant endospores (Rood 2016).

Although the pathogenesis of clostridial diseases always involves the action of specific toxins produced by the bacteria (with only one exception) they are truly infectious diseases. The infectious agent needs to establish itself in the host and overcome its immune defenses so it can grow, multiply and elaborate the toxins (Rood 2016). The exception is botulism, which is usually a true toxemia, being caused by the ingestion of botulinum neurotoxin (BoNT) preformed in food (Guizelini et al. 2018).

Clostridial diseases can be divided into three major types: (1) neurotoxic diseases (Böhmel & Gessler 2010), (2) histotoxic diseases (Songer 2010a) and (3) enteric diseases (Songer 2010b). In cattle, the neurotoxic group includes botulism, due to the ingestion of BoNTs; and tetanus, caused by the infection of *C. tetani* and related neurotoxins (TeNT). The histotoxic group includes diseases such as blackleg (*C. chauvoei*), malignant edema (*C. novyi* type A, *C. perfringens* type A, *C. sordelli*, *C. septicum*), and bacillary hemoglobinuria (*C. haemolyticum*). The group of enteric diseases includes several types of necrotizing and hemorrhagic enteritis (*C. difficile* in calves, *C. perfringens* type C, *C. perfringens* type E) and enterotoxemia (*C. perfringens* type D) which occurs in small ruminants and possibly in cattle (Uzal et al. 2002, Lobato et al. 2006, Filho et al. 2009, Mete et al. 2013).

Clostridial diseases usually occur with high rates of lethality causing significant economic losses in cattle in the region of influence of the Laboratório Regional de Diagnóstico of the Federal University of Pelotas (LRD/UFPel), which is located in the South of the state of Rio Grande do Sul (latitude 31°45'48 "South, longitude 52°29'02" West, altitude 21 m), Brazil.

We aimed to review the clinical, epidemiological and pathological aspects of the clostridial diseases diagnosed in cattle from January 1978 to December 2018 at the LRD-UFPel in the hopes that it will constitute a useful guide for field veterinary practitioners and interested farmers.

MATERIAL AND METHODS

We reviewed the necropsy protocols of 6,736 necropsies of cattle performed from January 1978 to December 2018 and filed at the LRD/UFPel. These necropsies were performed either by LRD/UFPel faculty or by field veterinary practitioners from the LRD/UFPel influence area, who subsequently submitted material for histological evaluation at the

LRD/UFPel. We selected cases of clostridial diseases found in these 6,736 necropsies. From each outbreak, we annotated the following data: municipality of origin, year of occurrence, age of affected cattle, type of breeding, morbidity, mortality and lethality rates. The authors did not make any changes in the final diagnosis that appeared in each protocol.

We also made a brief review on the epidemiology, clinical signs, necropsy findings, histopathology and methods of diagnosis and prophylaxis of each clostridial disease reported in this study.

RESULTS AND ADISCUSSION

From the results of the 6,736 bovine necropsies reviewed here, 1,000 (14.85%) were of bacterial diseases. A hundred and four of those (11,1%) were clostridial diseases. In this review, out of a total of 42,480 cattle at risk, approximately 904 died, reaching a mortality rate of 2.13%. Five specific clostridial diseases were found. In descending order of frequency, there were 35 outbreaks of tetanus (31.5% of the clostridial disease), 34 outbreaks of blackleg (30.6% of the cases), 23 outbreaks of bacillary hemoglobinuria (20.7% of the cases), 11 outbreaks of malignant edema (gas gangrene) (9.9% of the cases), and 8 outbreaks of botulism (7.2% of the cases). Epidemiological data on the outbreaks of each disease are in Table 1. With the exception of botulism, in all clostridial diseases outbreaks of this study, a lethality rate of approximately 100% was observed, which shows the importance of this category of diseases as causes of cattle losses.

There was an unusual frequency of cases of bovine tetanus, especially if we consider that cattle is relatively resistant to the disease (Popoff 2016) when compared, for example, with horses, and that the disease tends to be sporadic in cattle (Raposo 2007). However, the following unusual epidemiological conditions explain the high incidence of tetanus in this study: in 2001 large outbreaks of tetanus occurred in five farms in the area of influence of the LRD/UFPel. In these outbreaks at least 297 beef cattle and 50 sheep died. Injections with an anthelmintic contaminated with *C. tetani* was applied to a large number of cattle and caused unusually the large outbreaks (Driemeier et al. 2007). In 2009, 24 outbreaks of tetanus occurred in the southern RS. In this particular outbreak there was a history of drug and/or vaccine application in most of the herds (Quevedo et al. 2011).

Tetanus is a neurological disease characterized by spastic paralysis. It results from the contamination of wounds with spores of *C. tetani* acquired from the environment (Popoff 2016). Deep wounds with little exposure to air and the presence of necrotic tissue provide anaerobic conditions favoring spore germination (Popoff 2016).

Spastic paralysis results from the action of TeNT produced by *C. Tetani* at the synapses of the interneurons in the central nervous system. When the TeNT reaches the neuromuscular end plate, becomes internalized at the presynaptic terminal (Mayhew 2010). Through retrograde transport (Bizzini 1989), it reaches the body of the motor neuron, from where it is transferred to the inhibitory neurons within the the spinal cord and brain stem (Fig.1). TeNT compromises the release of neurotransmitter at the synapse, preventing the inhibitory neuron from disrupting the action triggered by the motor neuron, then resulting in spasticity (Barros et al. 2006b, Mayhew 2009).

The potential risk for tetanus in cattle exists in almost all rural properties due to the ubiquitous occurrence of *C. tetani* in the soil, water, and feces of animals and human beings, and poor husbandry practices that create favorable conditions for the development of the disease. The port of entry is usually a perforating or cutting wound, contaminated by soil, feces or other material containing bacterial spores and anaerobic microorganisms. These wounds may be related to castration, umbilical stump, calving (Odendaal & Kriek 2004) or may be caused by scarification of the intestinal mucosa by plant fibers (Raposo 2007). The bacterium has limited capacity to invade the host, restricting itself to the inoculation site (Raposo 2007).

In Brazil, the occurrence of tetanus is generally sporadic but, as was already mentioned, outbreaks with high morbidity, mortality and lethality have occurred in cattle handled in pens for some kind of procedure, the use of unhygienic equipment, or contamination of the skin by dust or mud during vaccination and de-worming practices (Salvador et al. 1999, Barros et al. 2006b, Driemeier et al. 2007).

The incubation period is 18 hours to 4 weeks – in most cases 7-15 days – (Driemeier et al. 2007). The lower the incubation period and progression, the more severe is tetanus. There is also a correlation with the port of entry: lesions close to the head usually result in more severe disease. In cases with a long incubation period, it may not be possible to detect the portal of entry (Barros et al. 2006b).

In cattle, early signs include mild or moderate bloat tremors, mandibular trismus, muscular rigidity (Fig.2) and prolapse of the third eyelid and opisthotonus (Fig.3).

Affected cattle are alert and anxious with erect ears. Asymmetric contractions induce spinal curvature and lateral deviation of the tail (Bleck 1989, Driemeier et al. 2007).

No specific morphological changes are observed. Gray matter hemorrhages, decubitus pneumonia and asphyxia lesions reported by some authors (Valette & Petermann 1988) are secondary changes or artifacts. The diagnosis of tetanus is primarily clinical and epidemiological. Prophylaxis includes the application of two doses of vaccine, with an interval of four weeks between applications.

Of the 34 outbreaks or sporadic cases of blackleg diagnosed in cattle, 15 occurred in the winter, nine in the spring, seven in the fall, and three in the summer. As has already been observed (Heckler et al. 2018) blackleg cases tend to be distributed throughout the year without showing specific seasonality (Table 1). However, it is also described that the prevalence of the disease was higher during the fall (Riet-Correa 2007). The age of affected cattle in this study ranged from four months to two years, and, exceptionally, in one outbreak a 4-year old cow was affected. Usually, 6-24 month-old well nourish cattle are affected (Useh et al., 2006), but cases were already reported in a 3-day calf (Sojka et al. 1992) and a bovine fetus transplacentally infected (Abreu et al. 2017). In Mato Grosso do Sul, the disease has been diagnosed in cattle of 2.5-3 years old, not vaccinated or vaccinated long time before the outbreak (Riet-Correa 2007a, Heckler et al. 2018). Roughly our data are similar. Surveys of the prevalence of clostridial diseases in Brazil generally indicate blackleg as the most frequent disease (Correa et al. 1980, Riet-Correa 2007a, Heckler et al. 2018). In our study, this is also a trend. However, for reasons already explained there were more cases of tetanus, which is unusual.

The pathogenesis of blackleg is relatively well established (Useh et al. 2003, Abreu & Uzal 2016, Abreu et al. 2017). Spores of *C. chauvoei* are ingested from the contaminated soil and absorbed by the intestinal mucosa gaining access to the blood circulation. The spores are then distributed through various tissues, mainly skeletal muscles and myocardium, where they become dormant. When the occurrence of an injury (which can be trauma, injection, etc.) favors a local anaerobic environment, spore germination occurs and the bacteria produce potent exotoxins that cause necrotizing myositis. The proliferating bacteria and toxins then enter the bloodstream causing exotoxemia and death (Fig.4).

The clinical manifestations of blackleg are often not observed. Due to the rapid clinical course, cattle are often found dead; sudden death may occur and are generally

attributed to myocardial lesions (Williams 1977, Glastonbury et al. 1988, Helman et al. 1997, Uzal et al. 2003.). The clinical picture is acute or hyperacute, and clinical signs consists of lameness, swelling, muscle crepitation and fever. Death invariably occurs within 24 to 36 hours from the onset of the clinical signs (Barros 2016b).

The cadaver of a bovine that dies from blackleg quickly swells. Significant macroscopic changes include localized swelling and crepitus of the muscles in the hind limbs and chest (Barros 2016b). On the cutting surface, the affected muscle is dark-red and contains numerous gas bubbles (Fig.5). In the periphery, the muscle is red and moist due to edema (early lesions). At the center of the lesion, the affected muscle is dark-red, dry and friable (mature lesions) (Barros 2016b, Heckler et al. 2018). Muscle affected by blackleg often has a butyric odor, such as rancid butter (Cooper & Valentine 2016). In addition to skeletal muscle, heart and tongue may be affected (Fig.6). Myocardial lesions are similar to those of skeletal muscles and associated with fibrinous pericarditis and pleuritis (Williams 1977, Abreu & Uzal, 2016). Histologically, necrotic fibers appear dissociated by gas bubbles and hemorrhage (Fig. 7), and there is meager neutrophilic infiltrate (Barros 2016b). In some cases, one can observe intralesional gram-positive rods. Vaccination is the preferred method of control (Abreu & Uzal, 2016)

The results of this survey demonstrate that the most critical clostridial diseases in cattle in the southern area of Rio Grande do Sul (RS) are blackleg and bacillary hemoglobinuria (BH), with 34 and 23 outbreaks respectively. To make this assumption one have to consider the conditions in which many tetanus outbreaks occurred in the period of the current study, as explained previously. In the outbreaks of BH the morbidity, mortality and lethality ratios were the same (Table 1).

BH is an acute or subacute disease, usually fatal, affecting mainly cattle and, more rarely, other species (Schild 2007). It is caused by toxins of *C. haemolyticum* referred to, also by some authors as *C. novyi* type D (Kriek & Odendaal 2004), a rod, sporulated, gram-negative anaerobic (Schild 2007).

BH may be sporadic or endemic. Morbidity is 0.25%-12% (Schild 2007) and the mortality is 80-100% (Navarro et al. 2016). High incidence of BH occurs in flooded regions where the occurrence of hepatic trematodes, mainly *Fasciola hepatica* exist (Barros 2016a). In other countries *Fascioloides magna* and *Dicrocoelium dendriticum* may also be associated with the disease (Navarro et al. 2016). The main determinant of the incidence of the disease is the amount of hepatic trematodes in the cattle grazing area (Navarro et

al. 2016). However in some cases of the outbreaks reported in this study, no evidence of parasitism was observed in the liver. This might indicate that the parasitic lesions were masqueraded or that other factors may be involved in triggering the lesions. Liver biopsy was already inculcated as one of these factors (Monaghan & Sheahan 1987), but is improbable that cattle in these outbreaks had been submitted to this procedure.

In the current study BH was the second most frequent clostridial disease observed in four municipalities in RS, all of which had low terrains and soils used mainly for planting rice. In these regions there are snails of the genus *Lymnea* which are intermediate hosts for *F. hepatica*. Accordingly, in the current study BH occurred throughout all seasons of the year and all outbreaks were observed in municipalities in the southern part of the state, where there is flat and low lands mainly used for rice crops. *F. hepatica* can cause liver lesions that determine an anaerobic environment favoring multiplication of *C. haemolyticum*.

In RS, BH affects well-nourished cattle older than two years pasturing in low fields such as those on the coast (Schild 2007, Barros 2016a). Outbreaks of the disease have also been observed after periods of flood when conditions for increasing the population of *F. hepatica* producing overwhelming numbers of metacercariae (Schild 2007). In these cases BH may become endemic. Paradoxically, in these regions, dry conditions induce cattle to concentrate in parts of the field where there is some water and consequently high populations of *F. hepatica* (Navarro et al. 2016).

Affected cattle can eliminate spores through feces and urine, thus contaminating pastures. Although it is described as a major occurrence in the summer and autumn (Schild 2007), in our study BH occurred with the same frequency throughout the year.

Essential aspects of pathogenesis are as follows (Kriek & Odendaal 2004): as previously stated BH occurs only in regions where both *F. hepatica* and *C. haemolyticum* are endemic. In the life cycle (Fig.8) of *F. hepatica* the final host ingests the metacercariae which are attached to the grass (Tessele et al. 2013). The ingested metacercariae penetrate the duodenum of the definitive host, cross the intestinal wall, migrate through the coelom and penetrate the capsule of the liver, migrating through the hepatic parenchyma to reach the hepatic ducts. The migration of the metacercariae through the liver harboring latent *C. haemolyticum* spores (within Kupffer cells) induces hepatic lesions (Fig.9) and those create the necessary conditions for bacterial growth and toxin production (Kriek & Odendaal 2004).

BH is a hemolytic disease and clinical signs are largely the result of intravascular hemolysis (Barros 2016a). The disease may be acute (clinical course of 10-12 hours) or subacute (3-4 days), but under grazing conditions cattle are generally found dead (Navarro et al. 2016). The incubation period is 7-10 days (Barros 2016a).

Clinical signs include hemoglobinuria, jaundice, and fever (40-41° C), that tends to disappear with the progression of the disease, and blood in the feces (Kriek & Odendaal 2004, Schild 2007, Barros 2016a, Navarro et al. 2016). Jaundice may not be very striking. Pregnant cows may abort. There is anemia (red blood cells $1-4 \times 10^6/\text{mm}^3$ and hemoglobin 3-89mg/dl and leukogram 7,700-34,800 leukocytes/mm³) and glycemia can be 100-200 mg/dl in some cases (Schild 2007, Barros 2016a, Navarro et al. 2016).

The main necropsy findings are single 5-20 cm white to tan necrotic areas in the hepatic parenchyma which is orange due to pigmentation by bilirubin (Barros 2016a). Such areas (Fig.10) may be ischemic resulting from thrombosis or may be the direct action of toxin (Barros 2016a, Navarro et al. 2016), or both. These areas of necrosis are considered pathognomonic when observed in conjunction with other clinical signs (Navarro et al. 2016). Other findings are the same as in any intravascular hemolytic disease and include jaundice, petechial hemorrhages in the subcutaneous tissue, dark kidneys, and coffee-colored urine (Schild 2007).

Histopathologically, the area of coagulative necrosis is surrounded by an inflammatory border of neutrophils (Fig.11) and intralesional rods can be found within the liver sinusoids. Hemoglobinuric nephrosis are usually observed (Navarro et al. 2016).

The diagnosis is based on the epidemiology, characteristic necropsy findings, and can be confirmed by polymerase chain reaction, fluorescent antibody technique and immunohistochemistry. The indicated form of control is vaccination (Navarro et al. 2016).

We found eleven outbreaks of malignant edema (gas gangrene) in our survey. Interestingly, in one of those, there was 100% of lethality induced by poor husbandry. Alternatively, good husbandry can prevent this clostridial disease.

Malignant edema is a clostridial infection that mainly affects ruminants (Odani et al. 2009), horses (Peek et al. 2003, Raymundo et al. 2010, Farias et al. 2014) and other mammals and birds (Silva et al. 2016b). It is due to contamination of wounds by bacteria of the genus *Clostridium* including one or more of the following: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* type A, *C. perfringens* type A, and *Clostridium sordellii* (Prescott 2016, Silva et al. 2016b). All of these microorganisms are ubiquitous and can be found in the environment

and the intestines of animals and humans (Silva et al. 2016a).

Many authors consider malignant edema and gas gangrene as synonyms (Silva et al. 2016b, Riet-Correa et al. 2007a). Others separate them into two distinct diseases (Cooper & Valentine 2016) with the following explanation for the split: both diseases are associated with subcutaneous and muscular hemorrhagic edema and necrosis; when gas is produced in the lesion the term gas gangrene is appropriated. In the absence of gas and when edema predominates, the disease is referred as malignant edema. According to these authors (Cooper & Valentine 2016) *C. septicum* would be a more common cause of gas gangrene, and *C. perfringens* of malignant edema.

In this paper we consider malignant edema and gas gangrene as synonyms and we favor the use of the term "malignant edema" for the convenience of a single denomination for these conditions and because, in our experience, hemorrhagic edema in the subcutaneous tissue and between the muscles is the most frequent lesion at necropsy; more rarely, lesions occur in the muscles (myonecrosis). The typical lesion is acute cellulitis. An identical clostridial disease induced by *C. novyi* type A is observed in rams which, to increase confusion, is known yet by another sobriquet: "swollen head" (Cooper & Valentine 2016, Prescott 2016).

Cases of malignant edema are observed sporadically. Outbreaks occur when there is collective trauma. It affects animals of any age. It can occur after dipping, shearing, tail docking, castration, deliverance (Odani et al. 2009), or injections with contaminated needles. When the disease is caused by the use of contaminated needles, mortality is very high in the first 48 hours, as occurred in an outbreak observed in this study, where outbreaks caused by syringes contaminated with *C. septicum* caused 100% mortality in calves. In Mato Grosso do Sul, outbreaks of malignant edema with tongue myonecrosis were apparently caused by contamination of wounds caused by grazing coarse grass (Lemos 1998)

For the diagnosis of malignant edema, one must search for recent injuries to the skin (which does not appear in blackleg) and for the characteristic necropsy lesions. The identification of the agent can be performed by immunofluorescence, immunohistochemistry (Assis et al. 2005), or isolation and characterization of the *Clostridium* species (Riet-Correa et al. 2007b) and type. In young cattle (6 months to 2 years old) the disease should be differentiated from blackleg. In blackleg, there is no association with wounds and muscular lesions always predominate.

Affected animals may be treated with high doses of penicillin or broad-spectrum antibiotics. For prophylaxis, it is necessary to avoid contamination, especially with soil, of the instruments and syringes used in the herd. The animals should be vaccinated annually with vaccines containing mainly *C. septicum*, *C. novyi* type B, and *C. sordelli*.

In seven out of the eight botulism outbreaks (7.7% of all clostridial diseases), in the current study, cattle were in a pasture of native grass, and in only one outbreak cattle were supplemented with minerals. The majority of cases (5/8) occurred in the municipality of Rio Grande, RS, in flooded areas, which have not been used for crops since they were submerged for the most part of the year. In three outbreaks there was animal carrion in the pasture. Five outbreaks occurred in the summer (January-February), two in the fall and one in the spring. Morbidity, mortality and lethality were between 0.5-10.8; 0.16-10.8 respectively, and there was an average of 30% lethality (Table 1).

Botulism is a clostridial disease whose main characteristic is flaccid paralysis of various muscle groups. It is usually caused by the ingestion of botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium botulinum* (an anaerobic gram-positive bacterium) found in the soil, water, food, and alimentary system of many animals (Le Marechal et al. 2016)

There are seven potent distinct BoNTs identified by the letters A-G (Dover et al. 2014, Maslanka et al. 2016). BoNTs are the most toxic biological substances that exist (Lamanna 1959); a gram of pure toxin evenly distributed in the feed can kill 400,000 adult cows (Galey et al. 2000). After ingestion and absorption from the intestine, BoNT reaches the bloodstream, is disseminated in the body and exerts its effect on the peripheral somatic motor nerves that supply skeletal muscle. At the neuromuscular junction, the neurotoxin inhibits the exocytosis of acetylcholine, which compromises the stimulus for muscle contraction, resulting in flaccid paralysis, a hallmark of the disease (Fig.12). The central nervous system is spared because it is protected by the blood-brain barrier (Mayhew 2009). There are no gross or histologic lesions associated with botulism (Barros et al. 2006a).

Botulism is endemic in Brazil, mainly in the Midwestern states (Soares et al. 2011) and the BoNTs responsible for the outbreaks in cattle in our country are, mostly, types C and D (Barros et al. 2006a, Silva et al. 2006a). In the last 15-20 years, botulism has emerged as a significant disease in Europe and a bioterrorism threat (Skarin et al. 2013).

Cattle become ingesting the BoNTs from carrion, drinking stagnant water

contaminated with animal carrion (Dutra et al., 2001), degraded food, or food contaminated with carrion from rodent, birds, and cats (Galey et al. 2000).

In cattle, the morbidity is variable, and the lethality is generally 100%, although there are cases of recovery of cattle that ingest small doses and develop mild clinical signs (Barros et al. 2006a, Constable et al. 2017)

In an outbreak in Paraíba, northeastern Brazil, 96.66% of sheep (145/150), 51.77% of goats (233\450), and 96.77% of cattle (30\31) died after the ingestion of chicken litter (Riet-Correa et al. 2003). In a feedlot of 1,700 cattle Mato Grosso do Sul, 1,090 steers died within four days (Guizelini et al. 2019).

Clinical signs of botulism may appear 1-17 days after ingestion of contaminated food (Barros et al. 2006a, Constable et al. 2017). Although most cases are acute, the course of the disease may be hyperacute (less than 24 hours), acute (1-2 days), subacute (3-7 days), or chronic (7-30 days). In the chronic form affected cattle have better chances of survival (Barros et al. 2006a). It is likely that the dose of toxin ingested determines the course of the disease. Larger doses would determine acute conditions, while lower doses would cause chronic disease.

The clinical signs of botulism are quite characteristic so much so as to allow a reliable clinical diagnosis (Barros et al. 2006a). It is characterized by partial or complete flaccid paralysis of the muscles of locomotion, chewing and swallowing. The animals present a decrease, but never a complete absence, of the musculature of the limbs, with flaccid paralysis of two (Fig.13) or four limbs.

The main clinical sign is the difficulty of locomotion, characterized by staggering gait, affecting mainly the hind limbs and evolving to the forelimbs, head and neck. The animal tends to lie in sternal decubitus with the head resting on the flank or with the chin on the ground. Flaccid paralysis affects the tongue (Fig.14) which is easily pulled from the mouth. There is also flaccidity of the tail, which remains the medial and distal portions apart from the body. Bradycardia occurs, and respiration is dyspneic, laborious, diaphragmatic (abdominal), with inspiration in two phases, the second being prolonged. There is flaccidity of chewing muscles, which is observed as inability to seize, chew and swallow the food (Barros et al. 2006a)

Rarely, there are sensory abnormalities, which can be assessed by maintaining cutaneous, paravertebral and limb sensitivity. While cattle lied down for prolonged

periods, they may develop ischemia of large muscle masses. In this case, there will be a loss of sensitivity due to muscle and nerve compression (Barros et al. 2006a)

The diagnosis of the disease is based on the clinical signs, the history, and the absence of significant gross and histological lesions. Botulism should be suspected whenever cattle in good condition, are found in a permanent position. As botulism is a neurological peripheral disease there are no obvious changes in attitude and sensibility. Botulism usually affects cattle of various ages spectrum.

Other techniques can be employed to confirm a clinical diagnosis. Intraperitoneal inoculation in mice (biological assay) of 500 ml of hepatic extract, blood serum, ruminal or intestinal contents is considered the most specific test but still has a very low sensitivity. When the test is positive, one should perform the serum neutralization test (or seroprotection), which is based on the neutralization of the botulinum toxin with the specific antitoxin.

Treatment for botulism in cattle is controversial, but some limited results have been obtained with hyperimmune serum (Guizelini et al. 2019). As an alternative, supportive treatment should be performed (Barros et al. 2006a). The elimination of field carcasses is an important auxiliary measure. Vaccination of the herd is another important form of control and prophylaxis in areas where there is a high incidence of the disease. Animals can be vaccinated from four months of age and revaccinated within 30-40 days, and then annually.

Some final considerations are in order. The five clostridial diseases discussed here have characteristic clinical signs and epidemiological features. Three of them have necropsy findings and histopathology so characteristic that, when associated with clinical signs epidemiology, allow for a diagnosis. Two others do not present anatomopathological findings, but have almost unmistakable clinical signs (Table 2) and laboratory diagnostic techniques that might confirm them are suboptimal or nonexistent. In no way are we advocating against the use of appropriate laboratory diagnostic techniques. These considerations are made to explain that, even although, in the current study we made the diagnoses without the aid of such ancillary techniques, the diagnosis are sound. We admit that a few diagnostic errors may have been committed, but not to the point of damaging the trend of the data provided here. In Table 2, we suggest an approach for a field working diagnosis of these diseases.

CONCLUSIONS

Five clostridial diseases in cattle should be considered in the field diagnosis in southern Rio Grande do Sul, namely tetanus, blackleg, bacillary hemoglobinuria, malignant edema, and botulism. Certain characteristic clinical, epidemiological, necropsy and histopathological findings (or instead, their absence) are fundamental for the diagnosis in the field. Treatment is possible but, in most cases, unsuccessful due to the acute course of these five diseases. Vaccination is the best procedure to prevent any one of them.

Acknowledgements.-The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 305283/2015-4, 431659/2016-8), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (finance code 001) for scientific, financial support and student's scholarship. The authors are also indebted to Dr. Mario Assis Neto for the art of the drawings Figs. 1, 4, 6, 8, and 12. His excellence is very much appreciated.

REFERENCES

- Abreu C.C. & Uzal F.A. 2016. Blackleg, p.231-242. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) Clostridial Diseases of Animals. John Wiley & Sons. Ames.
- Abreu C.C., Edwards E.E., Edwards J.F., Gibbons P.M., Araújo J.L., Rech R.R. & Uzal F.A. 2017. Blackleg in cattle: A case report of fetal infection and a literature review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29:612-621.
- Assis R.A., Lobato F.C.F., Serakidis R., Santos R.L., Dias G.R.C., Nascimento R.A.P., Abreu B.L.V, Parreiras P.M. & Uzal F.A. 2005. Immunohistochemical detection of clostridia species in paraffin-embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. *Pesq. Vet. Bras.* 25:4-8.
- Barros C.S.L. 2016a. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino, p.181-265. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), *Patologia Veterinária*. 2ª ed. Roca, São Paulo.
- Barros C.S.L. 2016b. Sistema muscular, p.663-702. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds.) *Patologia Veterinária*. Roca, São Paulo.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006a. Botulismo, p.57-62. In: *Ibid* (Eds.) *Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil*, Valée, Montes Claros.

- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006b. Tétano, p.59-64. In: Ibid (Eds.) Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil, Valée, Montes Claros.
- Bizzini B. 1989. Axoplasmic transport and transynaptic movement of tetanus toxins, p.203-229. In: Simpson L.L. (Ed.) Botulism Neurotoxin and Tetanus Toxin. Academic Press, New York.
- Bleck T.P. 1989. Clinical aspects of tetanus, p.379-398. In: Simpson L.L. (Ed.) Botulism Neurotoxin and Tetanus Toxin. Academic Press, New York.
- Böhmel H. & Gessler F. 2010. Neurotoxigenic clostridia, p.189-202. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds.) Pathogenesis of Bacterial Disease in Animals. 4th ed., Wiley Blackwell, Ames.
- Constable P.D., Hinchcliff K.W, Done S.H. & Greenberg W. Botulism, 1363-1367. 2017 In: Ibid (Eds.) Veterinary Medicine a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. Elsevier, Philadelphia.
- Cooper B.J. & Valentine B.A. 2016. Malignant edema and gas gangrene, p.232. In: Maxie M.G. (Ed.) Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol. 1. 6th ed. Elsevier, Saint Louis.
- Correa M.W., Correa C.N.M., Lopes C.A.M., Langoni H. & Modolo J.R. 1980. Enfermidades por clostrídios, 1969-1978. Arq. Brasileiro de Med.. Vet. Zoot. 32: 369-374.
- Dover N., Barash J.R., Hill K.K., Xie G. & Arnon S.S. 2014. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. J. Infect. Dis. 209:192-202.
- Driemeier D., Schild A.L., Fernandes J.C., Colodel E.M., Correa A.M., Cruz C.E. & Barros C.S.L. 2007. Outbreaks of tetanus in beef cattle and sheep in Brazil associated with disphenol injection. J. Vet. Med. A, Physiol. Pathol. Clin. Med. 54:333-335.
- Dutra I.S., Döbereiner J., Rosa I.V., Souza L.A.A. & Nonato M. 2001 Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados a ingestão de água contaminada. Pesq. Vet. Bras. 21:43-48.
- Farias L.D., Silva M.A., Tost M.E., De La Côte F.D., Irigoyen L.F., Vargas, A.C. 2014. Acute myonecrosis in horse caused by *Clostridium novyi* type A. Braz. J. Microbiol., 45:221-224.
- Filho E.J.F., Carvalho A.U., Assis R.A., Lobato F.F., Rachid M.A., Carvalho A.A., Ferreira P.M., Nascimento R.A., Fernandes A.A., Vidal J.E. & Uzal F.A. (2009) Clinicopathologic Features of Experimental *Clostridium perfringens* Type D Enterotoxemia in Cattle. Vet. Pathol. 46:1213-1220

- Galey F.D., Terra R., Walker R., Adaska J., Etchebarne M.A., Puschner B., Fisher E., Whitlock R.H., Rocke T., Willoughby D. & Tor E. 2000. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *Vet. Diagn. Invest.* 12:204-209.
- Glastonbury J.R., Searson J.E., Links I.J. & Tuckett L.M. 1988. Clostridial myocarditis in lambs. *Aust. Vet. J.* 65:208-209.
- Guizelini C.C., Lemos R.A.A., de Paula J.L.P., Pupin R.C., Gomes D.C., Barros C.S.L., Neves D.A., Alcântara L.O.B, Silva R.O.S., Lobato F.C.F. & Martins T.B. 2019. Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage. *Anaerobe* 55:103-106.
- Heckler R.F., Lemos R.A.A., Gomes D.C., Dutra I.S., Silva R.O.S., Lobato F.C.F., Ramos C.A.N. & Brumatti R.C. 2018. Blackleg in cattle in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: 59 cases. *Pesq. Vet. Bras.* 38:6-14.
- Helman G., Welsh R.D., Stair E.L. & Ely, R.W. 1997. Diagnosing visceral blackleg as a cause of sudden death in cattle. *Vet. Med.* 92:914-918.
- Kriek N.P.J. & Odendaal M.W. 2004. *Clostridium novyi* type D infection, p.1686-1687. In: Coetzer J.A.W. & Tustin RC. (Eds.) *Infectious Diseases of Livestock*. 3rd. ed. Vol. 3. Oxford Press, Cape Town.
- Lamanna C. 1959. The most poisonous poison. *Science* 130:763-772.
- Le Marechal C., Woudstra C. & Fach P. 2016. Botulism, p.303-330. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons, Ames.
- Lemos R.A.A. 1998. Mionecrose causada por clostrídios, p.388-396. In: *Ibid.* (Ed). *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul*. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- Lobato F.C.F., Assis R.A., Abreu V.L.V., Souza Jr. M.F., Lima C.G.R.D. & Salvarani F.M. 2006. Enterotoxemia em bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 58: 952-954.
- Maslanka S.E., Luquez C., Dykes J.K, Tepp W.H., Pier C.L., Pellett S., Raphael B.H., Kalb S.R., Barr, J.R., Rao A. & Johnson E.A. 2016. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *J. Infect. Dis.* 213:379-385.
- Mayhew J. 2009. Toxic diseases, p.321-359 In: *Ibid* (Ed.) *Large Animal Neurology*, Wiley Blackwell. Ames.

- Mete A., Garcia J., Ortega J., Lane M., Scholes S., & Uzal F.A. 2013. Brain lesions associated with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in a Holstein heifer calf. *Vet. Pathol.* 50:765-768.
- Monaghan M.L. & Sheahan B.J. 1987. Liver biopsy in ragwort poisoning. *Vet. Rec.* 120:374.
- Navarro M, Dutra Quintela, F. & Uzal F.A. 2016. Bacillary hemoglobinuria, p.265-274. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons. Ames.
- Odani J.S., Blanchard P.C., Adaska J.M., Moeller R.B. & Uzal F.A. 2009. Malignant edema in postpartum dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:920-924.
- Odendaal M.W. & Kriek N.P.J. 2004. Tetanus, p. 1878-1884. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds.) *Infectious Diseases of Livestock*. 3rd. ed. Vol. 3. Oxford Press, Cape Town.
- Peek S.F., Semrad S.D. & Perkins G.A. 2003. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). *Equine Vet. J.* 35:86-92.
- Popoff M.R. 2016. Tetanus, p.295-302. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons. Ames.
- Prescott J.F. 2016. Brief description of animal pathogenic clostridia, p.13-19. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons. Ames.
- Quevedo P.S., Ladeira S.R.L., Soares M.P., Marcolongo-Pereira C., Sallis E.S.V., Grecco F.B., Estima-Silva P. & Schild A.L. 2011. Tétano em bovinos no sul do Rio Grande do Sul: estudo de 24 surtos. *Pesq. Vet. Bras.* 31:1066-1070.
- Raposo J.B. 2007. Tétano, p.425-432. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A & Borges J.R.J. (Eds.) *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3rd. ed., Vol. 1. Pallotti, Santa Maria.
- Raymundo D.L., Pavarini S.P., Bezerra Junior P.S., Antoniassi N.A.B., Brecht B.S., Gomes M.J.P. & Driemeier D. 2010. Mionecrose aguda por *Clostridium septicum* em equinos. *Pesq. Vet. Bras.* 30:637-640.
- Riet-Correa F. 2007a. Carbúnculo sintomático, p.264-288. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A & Borges J.R.J. (Eds.) *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3rd. ed., Vol. 1. Pallotti, Santa Maria.
- Riet-Correa F. 2007b. Edema maligno, p.286-265. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds.) *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3rd. ed., Vol. 1. Pallotti, Santa Maria.

- Riet-Correa F., Tabosa L.M., Azevedo E.O., Medeiros R.M.T., Simões S.V.D., Dantas A.F., Alves C.J., Nobre V.M.T., Athayde A.C., Gomes A.A. & Lima E.F. 2003. Doenças dos ruminantes e equinos no semi-árido da Paraíba. *Semi-Árido em Foco*, 1:2-86.
- Rood J.I. 2016. General Physiological and virulence properties of the pathogenic clostridia, p.7-12. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons. Ames.
- Salvador S.C. & Freire C.A. 1998. Ocorrência de tétano epizootico em bovinos no Estado de Minas Gerais *Arqs. Inst. Biol.* 65:95. (Abstract)
- Schild A.L. 2007. Hemoglobinúria bacilar, p.305-308. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds.) *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3rd. ed., Vol. 1. Pallotti, Santa Maria.
- Silva R.O.S., Oliveira Junior C.A., Gonçalves L.A. & Lobato F.C.F. 2016a. Botulism in ruminants in Brazil. *Ciência Rural*. 46:1411-1417.
- Silva R.O.S., Uzal F.A., Oliveira Jr. C.A. & Lobato F.C.F. 2016b. Gas gangrene (malignant edema), p. 243-254. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons. Ames.
- Skarin H., Aberg A.T., Woudstra C., Hansen T., Lofstrom C., Koene M., Bano L., Hedeland M., Anniballi F., De Medici D. & Engvall E.O. 2013. The workshop on animal botulism in Europe, *Biosecur Bioterror* 11: S183eS190,
- Soares M.C., Gaspar A.O., Brumatti R.C., Gomes D.C., Neves D.A., Alcântara L.O.B., Leal P.V. & Lemos R.A.A. 2018. Economic impact of an outbreak of botulism in a cattle feedlot. *Pesq. Vet. Bras.* 38:1365-1370.
- Sojka J.E., Bowersock T.L., Parker J.E., Blevins W.G. & Irigoyen L. 1992. *Clostridium chauvoei* myositis infection in a neonatal calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:201-203.
- Songer J.G. 2010a. Histotoxic clostridia, p.203-209. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds.) *Pathogenesis of Bacterial Disease in Animals*. 4th ed., Wiley Blackwell, Ames.
- Songer J.G. 2010b. Enteric clostridia, p.211-229. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds.) *Pathogenesis of Bacterial Disease in Animals*. 4th ed., Wiley Blackwell, Ames.
- Tessele B., Brum J.S. & Barros C.S.L. 2013. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. *Pesq. Vet. Bras.* 33:873-889.

- Useh N.M., Ibrahim N.D.G., Nok A.J. & Esievo K.A.N. 2006. Relationship between outbreaks of blackleg of cattle and annual rainfall in Zaria, Nigeria. *Vet. Rec.* 158:100-101.
- Uzal F.A., Kelly W.R., Morris W.E. & Assis R.A. 2002. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *J. Comp. Path.* 126:71-75.
- Uzal F.A., Paramidani M., Assis R., Morris W. & Miyakwa M.F. 2003. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. *Vet. Rec.* 152:134-136.
- Valette L. & Petermann H.G. 1988. *Clostridium tetani*, p. 667-688. In: Blobel H. & Schliesser T. (ed.) *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Band II. Gustav Verlag Fischer, Stuttgart.
- Williams B.M. 1977. Clostridial myositis in cattle: Bacteriology and gross pathology. *Vet. Rec.* 100:90-91.

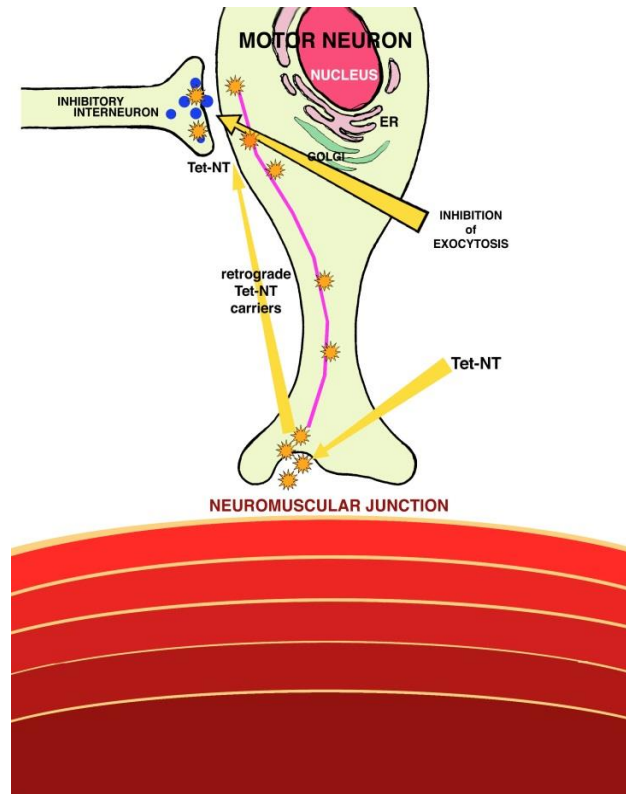


Fig.1. Pathogenesis of tetanus. Tetanus neurotoxin (TetNT, yellow asterisks) is directed by retrograde transport (shown as a purple line) into motor neurons by the action of microtubules and actin microfilaments. TetNT inhibits the exocytosis of specific synaptic vesicles at inhibitory neuronal terminals. Thus the action of the inhibitory neuron is not exerted on the motor neuron, resulting in spasticity (Modified from Mayhew 2009).



Fig.2. Clostridial diseases. Tetanus. Cow with spastic paralysis.



Fig.3. Clostridial diseases. Tetanus. Steer with opisthotonus.

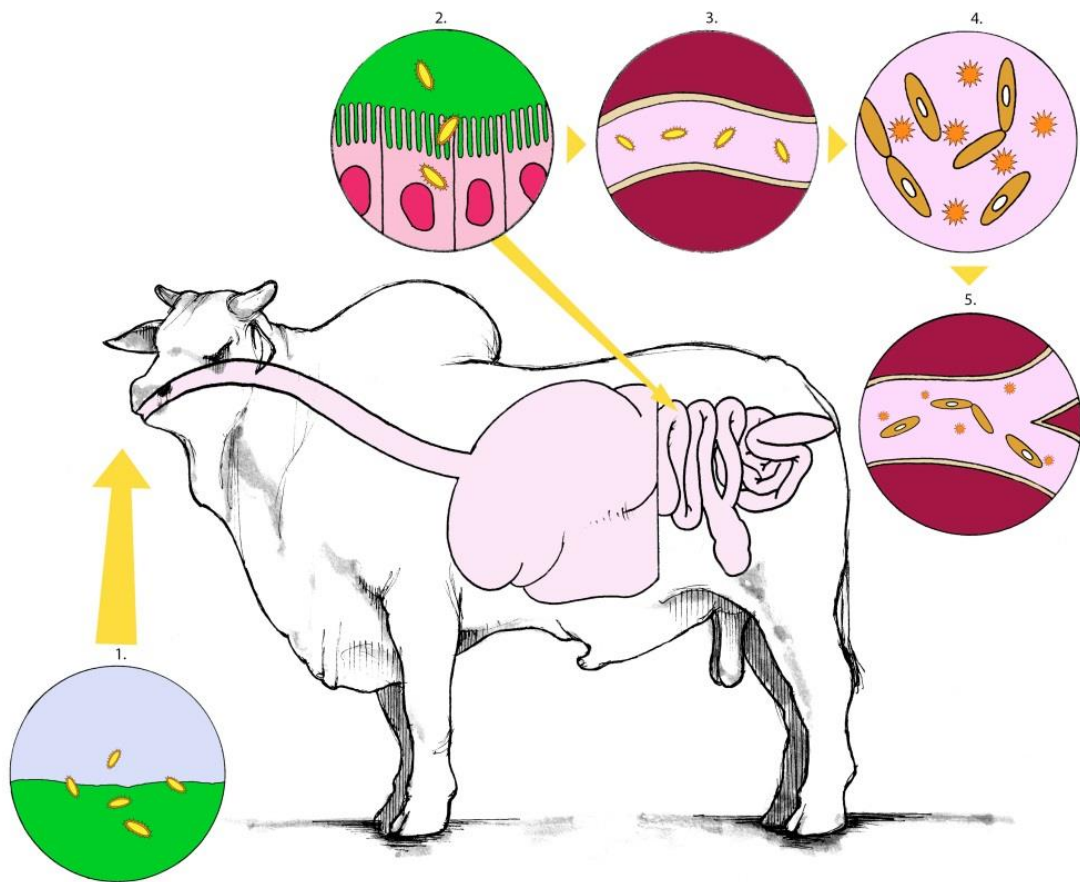


Fig.4. Blackleg. Pathogenesis. *Clostridium chauvoei* spores are ingested from the contaminated soil (1) and absorbed through the intestinal mucosa into the blood circulation (2). The spores are then distributed through various tissues, mainly skeletal muscles, where they become dormant within macrophages (3). When a muscle injury occurs, a favorable anaerobic environment is created, the spores germinate, and the bacteria produce potent exotoxins that cause hemorrhagic necrotizing emphysematous myositis (4). The proliferating bacteria and toxins enter the bloodstream causing exotoxemia and death (5) (Modified from Abreu et al. 2017).



Fig.5. Clostridial diseases. Blackleg. Gross lesions at the hindlimb muscles. The muscle to the right is moist (early lesion). The dark, dry muscle to the left represents a more advanced phase of the lesion. Observe the well-developed gas bubbles in the muscle at the top right.

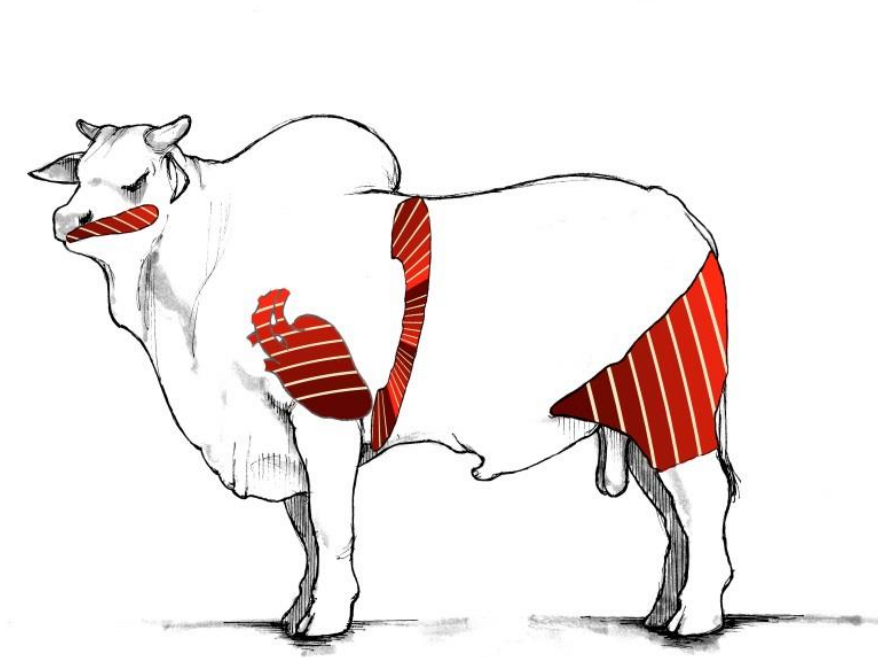


Fig.6. Clostridial diseases. Blackleg. Schematic representation of the anatomical sites where muscle lesions are more commonly seen: muscles of the thigh, diaphragm, heart, and tongue.

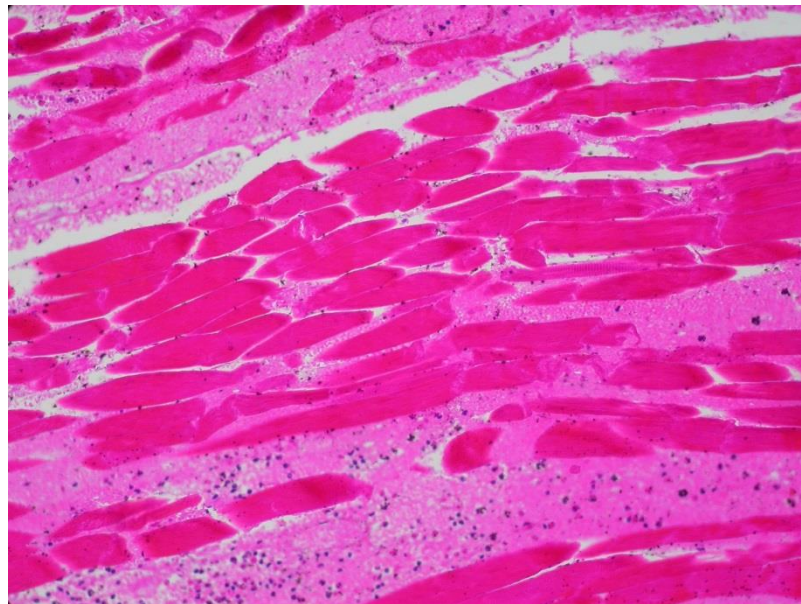


Fig.7. Clostridial diseases. Blackleg. Hemorrhagic necrotizing myositis. A histopathological aspect of the striated muscle lesion. There is hyaline necrosis of myofibers and edema and hemorrhage between myofibers. HE, obj.40x.

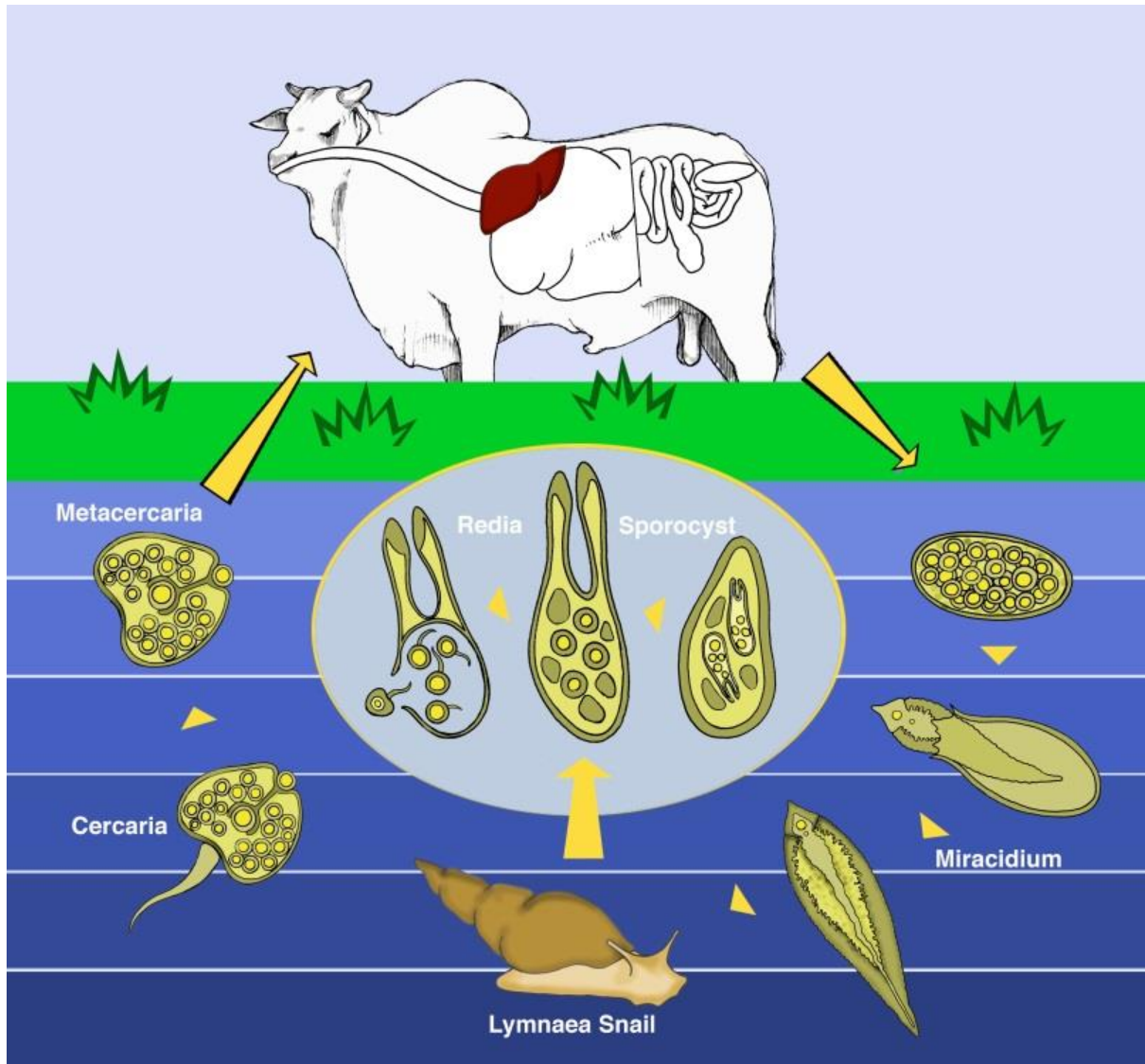


Fig.8. The life cycle of *Fasciola hepatica*. Eggs are shed in the bile and feces. A hatching egg releases the miracidium that survives only in humid environments. The miracidium penetrates actively in the intermediate host (snail of the genus *Lymnaea*). Inside the snail, each miracidium gives rise 5-8 rediae which originate daughter rediae and cercariae. Cercariae leave the snail and set themselves on grass, just below the water level, turning into metacercariae. The final host ingests the metacercariae along with the grass. People and other domestic and wild mammals can also become infected. The ingested metacercariae cross the duodenum of the definitive host and penetrate the intestinal wall, wander through the coelom, penetrate the capsule of the liver, and migrate through the hepatic parenchyma to reach the hepatic ducts (Modified from Tessele et al. 2013)

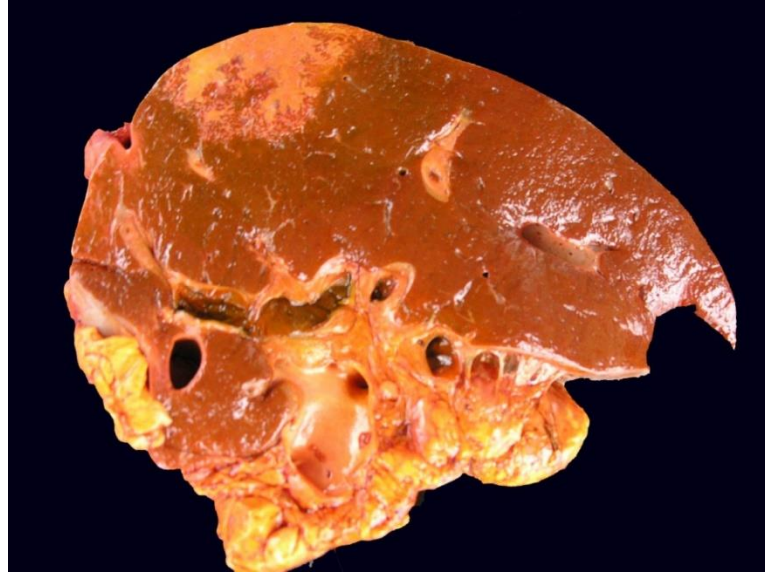


Fig.9. Clostridial diseases. Bacillary hemoglobinuria (BH). Liver, cut surface. The triangular single white area of coagulative necrosis seen to the right is a hallmark lesion of BH. The ducts are thick walled (chronic cholangitis) and some specimens of *Fasciola hepatica* are in their lumen. Migration of *F. hepatica* metacercariae through liver parenchyma favors sporulation of *Clostridium haemolyticum*, the causative agent of BH.

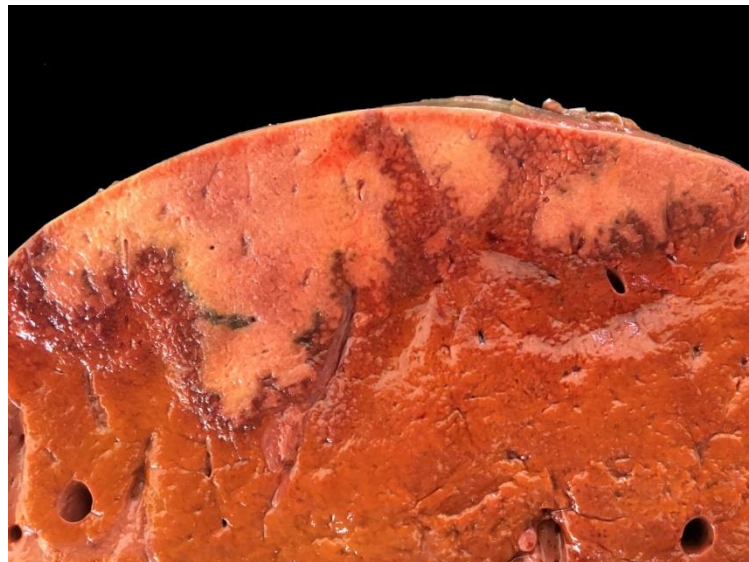


Fig.10. Clostridial diseases. Bacillary hemoglobinuria. Liver, cut surface. Notice the large irregular bordered pale area of coagulative necrosis in the liver parenchyma. A red rim of hemorrhage and inflammation surrounds the necrotic focus.

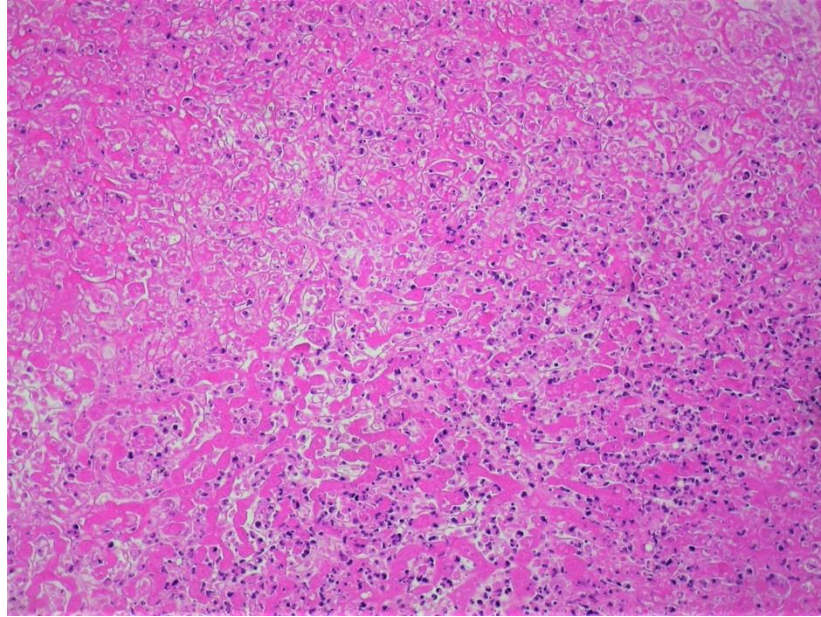


Fig. 11. Clostridial diseases. Bacillary hemoglobinuria. Histopathology. A large area of coagulative necrosis to the right is surrounded by a rim of leucocytes. HE, obj.20x.

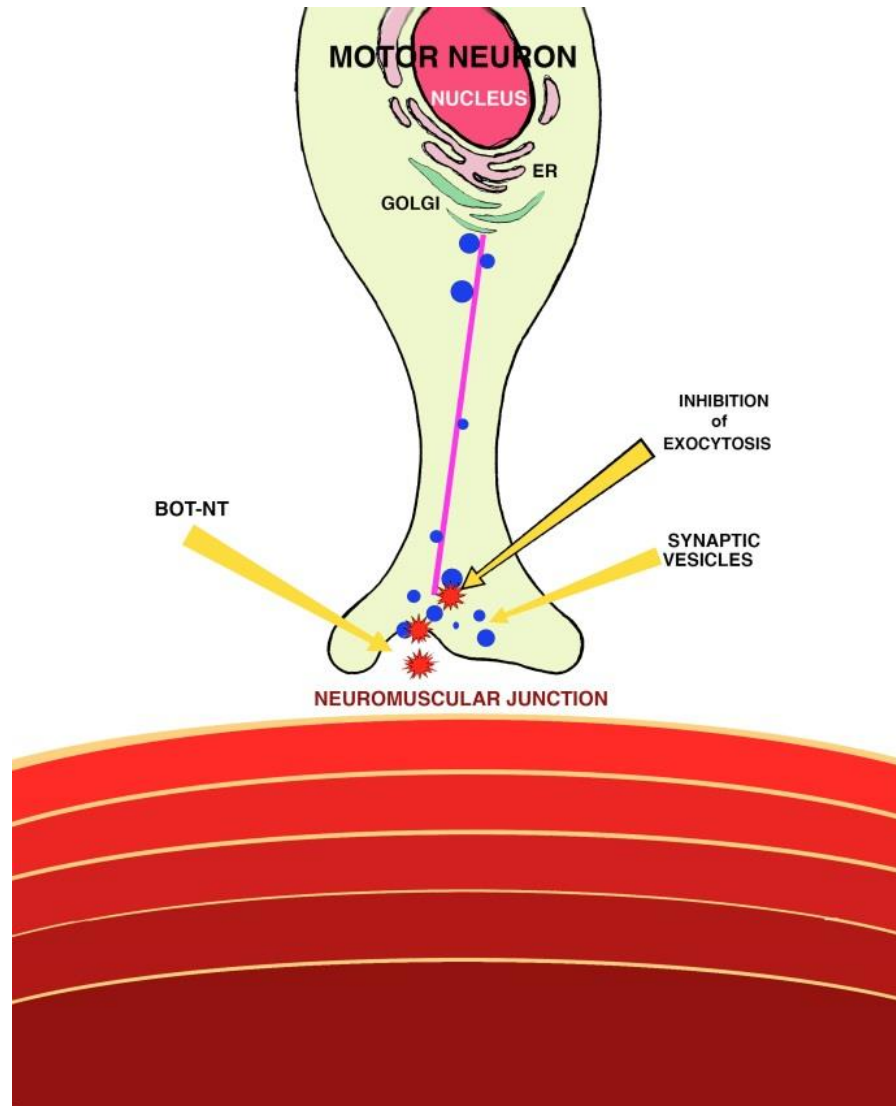


Fig.12. Pathogenesis of botulism. Schematic view of a motor neuron and the neuromuscular junction, The botulinum neurotoxin (BoNTs, shown as red asterisks) are internalized at synapses in endosomal compartments, one of which might attach to synaptic vesicles (blue dots). At the neuromuscular junction, the BoNT inhibits the exocytosis of acetylcholine, which compromises the stimulus for muscle contraction, resulting in flaccid paralysis. The synaptic vesicles are synthesized in the endoplasmic reticulum and released by the Golgi apparatus. (Modified from Mayhew 2009).



Fig. 13. Clostridial diseases. Botulism. Flaccid paralysis in a cow. The lack of tonus in the muscle limbs (flaccidity) prevents the steer from standing.



Fig. 14. Clostridial diseases. Botulism. Flaccid paralysis causes the tongue to protrude from the mouth.

Quadro 1. Epidemiological data on the five outbreaks of clostridial diseases diagnosed in cattle by the Regional Laboratory Diagnostic Laboratory of the Federal University of Pelotas between 1978-2018

Clostridial diseases	Season	Number of outbreaks per season	Total number of outbreaks	Cattle at risk	Maximum-minimum morbidity (%)	Maximum-minimum mortality (%)
Tetanus	Spring	10	35	18.942	0,2-39,5	0,2-39,5
	Summer	3				
	Fall	9				
	Winter	13				
Blackleg	Spring	9	34	7,297	0,06-50	0,06-50
	Summer	3				
	Fall	7				
	Winter	15				
Bacillary hemoglobinúria	Spring	7	23	12,792	0,1-17,3	0,1-17,3
	Summer	3				
	Fall	6				
	Winter	7				
Malignant edema	Spring	3	11	714	0,62-100	0,62-100
	Summer	6				
	Fall	1				
	Winter	1				
Botulism	Spring	1	8	2.735	0,5-10,8	0,16-10,8
	Summer	5				
	Fall	2				
	Winter	0				

Lethality rates were virtually 100% in all outbreaks except for botulism in which lethality averaged 30%

Quadro 2. Approach for the diagnosis of some clostridial diseases

Disease	Clostridia involved	Clues for the diagnosis			
		Epidemiology	Clinical signs	Gross lesions	Histopathology
Tetanus	<i>C. tetani</i>	Skin wounds	Spastic paralysis, prolapse of the third eyelid, acute course	None	None
Blackleg	<i>C. chauvoei</i>	Blunt trauma	Stiffness of the limbs, claudication. Crepitation of affected area. Usually found dead	Hemorrhagic necrotizing emphysematous myositis, same lesion in the myocardium; fibrinous pericarditis, and pleuritis	Hemorrhagic necrotizing emphysematous myositis
Bacillary hemoglobinuria	<i>C. haemolyticum</i>	Pastures with bodies of water, <i>Fasciola hepatica</i>	Jaundice, red urine, bloody liquid feces, fever, acute course	Single large necrotic area in the liver. Red urine. Dark kidneys.	Liver necrosis with intralesional rods
Malignant edema	<i>C. novyi</i> type A, <i>C. perfringens</i> type A, <i>C. sordelli</i> , <i>C. septicum</i>	Skin wound	Swelling, heat and pain in affected area. Acute disease. Sometimes crepitation of affected area.	Hemorrhagic subcutaneous edema, Less frequently emphysematous myonecrosis.	Subcutaneous edema, Necrotic myositis.
Botulism	<i>C. botulinum</i>	Carrion in the food, and pasture, stagnant water contaminated by carrion, degraded food, poultry litter	Flaccid paralysis,	None	None

3 Considerações Finais

Com base nos resultados desse trabalho ficou demonstrado, que a raiva não apresenta sazonalidade na região Sul do Rio Grande do Sul e a medida em que aumentou a incidência da doença nos animais e nas propriedades, houve disseminação geográfica do vírus para a maioria dos municípios da área de influência do LRD/UFPel. A análise espacial demonstrou que a doença se dissemina principalmente pela proximidade geográfica entre municípios e microrregiões vizinhas. Observou-se ainda que esta doença pode ter comportamento tanto endêmico como epidêmico na região do estudo. O combate ao morcego hematófago e a vacinação dos rebanhos devem ser feitos em todos os municípios da região do estudo e não apenas naqueles com casos confirmados de raiva para prevenir a disseminação da doença.

Cinco doenças clostridiais em bovinos devem ser consideradas no diagnóstico de campo no sul do Rio Grande do Sul: tétano, carbúnculo sintomático, hemoglobinúria bacilar, edema maligno e botulismo. Determinados achados clínicos, epidemiológicos, de necropsia e histopatológicos característicos (ou, pelo contrário, sua ausência) são fundamentais para o diagnóstico no campo. O tratamento é possível, mas, na maioria dos casos, sem sucesso devido ao curso agudo dessas cinco doenças. A vacinação é o melhor procedimento para evitar qualquer um deles.

Referências

ABREU C.C. & UZAL F.A. Blackleg, p 231-242. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) Clostridial Diseases of Animals. **John Wiley & Sons. Ames.** 2016

ABREU C.C., EDWARDS E.E., EDWARDS J.F., GIBBONS P.M., ARAÚJO J.L., RECH R.R. & UZAL F.A. Blackleg in cattle: A case report of fetal infection and a literature review. **J. Vet. Diagn. Invest.** 29:612-621. 2017

ANSELIN L. Local Indicators of Spatial Association - LISA. **Geo Analysis.** 27:93–115. 1995.

ASSIS R.A., FACURY FILHO E.J., LOBATO F.C.F., CARVALHO A.U., FERREIRA M.P. & CARVALHO A.V.A Surto de carbúnculo sintomático em bezerros. **Ciência Rural**, Santa Maria 35(4): 945-947. 2005

ASSIS R.A., LOBATO F.C.F., SERAKIDIS R., SANTOS R.L., DIAS G.R.C., NASCIMENTO R.A.P., ABREU B.L.V, PARREIRAS P.M. & UZAL F.A. 2005. Immunohistochemical detection of clostridia species in paraffin- embedded tissues of experimentally inoculated guinea pigs. **Pesq. Vet. Bras.** 25:4-8.

BAPTISTA D.Q., BRUHN F.R.P., DA ROCHA C.M.B.M., TORRES F.C., MACHADO E.D., SÁFADI T. & PEREIRA S.M. Temporal series analyses in equine infectious anemia cases in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 2007 to 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 38(4): 431-438. 2016

BARROS C.S.L. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino, p.181-265. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), **Patologia Veterinária. 2ª ed.** Roca, São Paulo. 2016a.

BARROS C.S.L. Sistema muscular, p. 663-702. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds.) **Patologia Veterinária.** Roca, São Paulo.2016b.

BARROS C.S.L., DRIEMEIER D., DUTRA I.S. & LEMOS R.A.A. Botulismo, p. 57-62. In: Ibid (Eds.) **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**, Valée, Montes Claros. 2006.

BARROS C.S.L., DRIEMEIER D., DUTRA I.S. & LEMOS R.A.A. Tétano, p.59-64. In: Ibid (Eds.) **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**, Valée, Montes Claros. 2006b

BIZZINI B Axoplasmic transport and transynaptic movement of tetanus toxins, p. 203-229. In: Simpson L.L. (Ed.) Botulism Neurotoxin and Tetanus Toxin. **Academic Press**, New York. 1989.

BLECK T.P. Clinical aspects of tetanus, p. 379-398. In: Simpson L.L. (Ed.) Botulism Neurotoxin and Tetanus Toxin. **Academic Press**, New York. 1989.

BÖHMEL H. & GESSLER F.O. Neurotoxigenic clostridia, p.189-202. In: Gyles C.L., Precott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds.) **Pathogenesis of Bacterial Disease in Animals.** 4th ed., Wiley Blackwell, Ames. 201.

BORTMAN M. Elaboración de corredores o canales endémicos mediante planillas de cálculo. Rev PanamSalud Publica/**Pan Am J Public Health**, 5(1):1-8

CONSTABLE P.D., HINCHCLIFF K.W, DONE S.H., & GREENBERG W. BOTULISM, 1363-1367. In: Ibid (Eds.) **Veterinary Medicine a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats.** Elsevier, Philadelphia. 2017.

COOPER B.J. & VALENTINE B.A. Malignant edema and gas gangrene, p.232. In: Maxie M.G. (Ed.), **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals.** Vol.1. 6th ed. Elsevier, Saint Louis. 2016.

CORREA M.W., CORREA C.N.M., LOPES C.A.M., LANGONI H. & MODOLO J.R. Enfermidades por clostrídios, 1969-1978. **Arquivo Brasileiro de Medicina. Veterinária e Zootecnia.** 32(3): 369-374. 1980

DICKEY, D. & FULLER, W. Distribution of the estimators for autoregressive time series with a unit root. **Journal of the American Statistical Association**. 74(366):427-431.1979.

DOGNANI R., PIERRE E.J., SILVA M.C.P., PATRÍCIO M.A.C., COSTA S.C., PRADO J.R., Lisboa J.A.N. Epidemiologia descritiva da raiva dos herbívoros notificados no estado do Paraná entre 1977 e 2012. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 36(12):1145-1154. 2016.

DOVER N., BARASH J.R., HILL K.K., XIE G. & ARNON S.S. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. **J. Infect. Dis**. 209:192-202. 2014;

DRIEMEIER D., SCHILD A.L., FERNANDES J.C.T., COLODEL E.M., CORRÊA A.M.R., CRUZ C.E.F. & BARROS C.S.L. Outbreaks of tetanus in beef cattle and sheep in Brazil associated with disophenol injection. **J. Vet. Med.** A 55: 333-335. 2007

DUTRA I.S., DÖBEREINER J., ROSA I.V., SOUZA L.A.A. & NONATO M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 21(2): 43-48. 2001.

EUA Code of Federal Regulations. Washington: Office of the federal Register National **National Archives and Records Administration** 743 p. 1991

FARIAS L.D., SILVA MA, TOST M.E., DE LA CÔRTE F.D., IRIGOYEN L.F., VARGAS, A.C. Acute myonecrosis in horse caused by *Clostridium novyi* type A. **Braz. J. Microbiol.**, 45: 221-224. 2014.

FERNANDES C.G. & RIET-CORREA F. RAIVA, P.184-198. IN: RIET-CORREA F., SCHILD A.L., LEMOS R.A.A. & BORGES J.R.J. (EDS), **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. Vol.1. Pallotti, Santa Maria. 719p. 2007.

FILHO E.J.F., CARVALHO A.U., ASSIS R.A., LOBATO F.F., RACHID M.A., CARVALHO A.A., FERREIRA P.M., NASCIMENTO R.A., FERNANDES A.A., VIDAL J.E. & UZAL F.A. Clinicopathologic Features of Experimental *Clostridium perfringens* Type D Enterotoxemia in Cattle. **Vet. Pathol.** 46:1213–1220.2009.

GALEY F.D., TERRA R., WALKER R., ADASKA J., ETCHEBARNE M.A., PUSCHNER B., FISHER E., WHITLOCK R.H., ROCKE T., WILLOUGHBY D. & TOR

E. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. **Vet. Diagn. Invest.** 12: 204-209. 2000;

GALIZA G.J.N., SILVA M.L.C.R., DANTAS A.F.M., SIMÕES S.V.D. & RIET-CORREA F. Doenças do sistema nervoso central de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 30(3):267-276. 2010.

GAVA A. **Comunicação Pessoal.** (CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC). 1998.

GETIS A, ORD JK. The analysis of spatial association by use of distance statistics. **Geo Analysis.** 24:189–206. 1992.

GLASTONBURY J.R., SEARSON J.E., LINKS I.J. & TUCKETT L.M. Clostridial myocarditis in lambs. *Aust. Vet. J.* 65:208-209. 1988;

GOMES M.N., MONTEIRO A.M.V. & ESCADA M.I.S. Raiva bovina segundo os mosaicos de uso e cobertura da terra no estado de São Paulo entre 1992 e 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 63(2):287-295. 2011

GUIZELINI C.C, LEMOS R.A.A., DE PAULA J.L.P., PUPIN R.C., GOMES D.C., BARROS C.S.L., NEVES D.A., ALCÂNTARA L.O.B, SILVA R.O.S., LOBATO F.C.F. & MARTINS T.B. Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage. **Anaerobe** 55: 103-106. 2019.

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

HELMAN G., WELSH R.D., STAIR E.L. & ELY, R.W. Diagnosing visceral blackleg as a cause of sudden death in cattle. **Vet. Med.** 92:914-918. 1997.

HUDSON L.C., WEINSTOCK D. & JORDAN T. Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine.** 43(2):85-95. 1996

IBGE 2018. Produção da Pecuária Municipal - 2014 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>>.

IBGE 2017. Rebanho bovino predomina no centro oeste e mato grosso lidera entre os estados – 2017. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia->>

sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22648-ppm-2017-rebanho-bovino-predomina-no-centro-oeste-e-mato-grosso-lidera-entre-os-estados

JUNQUEIRA, JOSÉ R. C.; ALFIERI, AMAURI A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 289-298, abr./jun., 2006.

KRIEK N.P.J. & ODENDAAL M.W. Botulism, p. 1885-1902. In: Coetzer J.A.W. & Tustin RC. (Eds.) **Infectious Diseases of Livestock**. 3rd. ed. Vol. 3. Oxford Press, Cape Town. 2004a.

KRIEK N.P.J. & ODENDAAL M.W. Clostridium novyi ty D infection, p.1686-1687. In: Coetzer J.A.W. & Tustin RC. (Eds.) **Infectious Diseases of Livestock**. 3rd. ed. Vol. 3. Oxford Press, Cape Town. 2004b.

LAMANNA C. The most poisonous poison. Science 130:763-772. Le Marechal C., Woudstra C. & Fach P 2016. Botulism, in: In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) **Clostridial Diseases of Animals**. John Wiley & Sons, Ames.1959.

LEMOS RA.A. Mionecrose causada por clostrídios, p.388-396. In: Ibid. (Ed). **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 1998.

LIMA E.F., RIET-CORREA F., CASTRO R.S., GOMES A.A.B. & LIMA F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso central e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 25(4):250-264. 2005

LOBATO F.C.F., MORO E., UMEHARA O., ASSIS R.A., MARTINS N.E. & GONÇALVES L.C.B. Avaliação da resposta de anti-toxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por 6 vacinas comerciais no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 52: 313-318. 2000

LOBATO F.C.F., ASSIS R.A., BALSAMÃO G.M., ABREU V.L.V., NASCIMENTO R.A.P. & NEVES R.D. Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. **Ciência Rural** 34: 439-442. 2004

LOBATO F.C.F., ASSIS R. A., ABREU V.L.V., SOUZA JR. M.F., LIMA C.G.R.D. & SALVARANI F.M. Enterotoxemia em bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 58(5): 952-954. 2006

LOBATO F.C.F., SALVARANI F.M., GONÇALVES L.A., PIRES P.S., SILVA R.O.S., ALVES G.G., NEVES M., JÚNIOR C.A.O., PEREIRA P.L.L. Clostridioses dos animais de produção. **Veterinária e Zootecnia. 20 (Edição Comemorativa):** 29-48. 2013

MASLANKA S.E., LUQUEZ C., DYKES J.K, TEPP W.H., PIER C.L., PELLETT S., RAPHAEL B.H., KALB S.R., BARR, J.R., RAO A. & JOHNSON E.A.. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. **J. Infect. Dis.** 213:379-385. 2016.

MAPA 2002. Regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas contra o botulismo. *Instrução Normativa 23/2002*. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=612413058>

MAPA 2017. Controle da Raiva dos Herbívoros e Encefalopatia Espongiforme Bovina EEB Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animale-vegetal/saude-animale-vegetal/programas-de-saude-animale-vegetal/prog-nacional-de-controle-da-raiva-dos-herbivoros-e-outras-encefalopatias>. Acesso em 24/7/2018.

MAYHEW J. **Toxic diseases**, p. 321-359 In: *Ibid* (Ed.). Large Animal Neurology, Wiley Blackwell. Ames. 2009.

MONAGHAN M.L. & SHEAHAN B.J. Liver biopsy in ragwort poisoning. **Vet. Rec.** 120: 374. 1987.

MARCOLONGO-PEREIRA C., SALLIS E.S.V., GRECCO F.B., RAFFI M.B., MAURO P.S., SCHILD A.L. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 31(4):331-335. 2011

MENEZES F.L., SILVA J.A., MOREIRA E.C., MENESES J.N.C., MAGALHÃES D.F., BARBOSA A.D. & OLIVEIRA C.S.F. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais, 1998 a 2006. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 60(3):566-573. 2008

MORETTIN P. A. & TOLOI C. M. C. **Análise de séries temporais.** 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, p. 2006. 729. 2006

MORI A.E. & LEMOS R.A.A. Raiva, p.47-58. 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. 1998

NASCIMENTO R.A.P., LOBATO F.C.F., ABREU V.L.V., MARTINS N.E., ASSIS R.A., CARVALHO FILHO M.B. Evaluation of vaccines against *Clostridium novyi* type B. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 56(1): 1-6. 2004

NAVARRO M, DUTRA QUINTELA, F. & UZAL F.A. Bacillary hemoglobinuria, p.265-274. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) **Clostridial Diseases of Animals**. John Wiley & Sons. Ames. 2016.

NEVES D.A. Sazonalidade e ciclicidade da raiva em herbívoros domésticos no estado do Mato Grosso do Sul, 1998 a 2006. **Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS**. 84p. 2008

ODANI J.S., BLANCHARD P.C., ADASKA J.M., MOELLER R.B. & UZAL F.A. Malignant edema in postpartum dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:920-924. 2009.

ODENDAAL M.W. & KRIEK N.P.J. TETANUS, P. 1878-1884. In: coetzer j.a.w. & tustin rc. (Eds.) **Infectious Diseases of Livestock**. 3rd. ed. Vol. 3. Oxford Press, Cape Town. 2004a.

ODENDAAL M.W. & KRIEK N.P.J. 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.2004b.

PEEK S.F., SEMRAD S.D. & PERKINS G.A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). **Equine Vet. J.** 35:86-92. 2003.

POPOFF M.R. Tetanus, p.295-302. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) **Clostridial Diseases of Animals**. John Wiley & Sons. Ames.2016.

PÓVOAS D.R., CHAVES N.P., BEZERRA D.C., ALMEIDA V.M., SARAIVA L.Q. Rabies in herbivorous in the state of Maranhão: a retrospective study. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**. 19(2): 86-89.2012.

PRESCOTT J.F. Brief description off animal pathogenic clostridia, p.13-19. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) **Clostridial Diseases of Animals**. John Wiley & Sons. Ames.2016.

QUEVEDO P.S., LADEIRA S.,R.L., SOARES M.P., MARCOLONGO-PEREIRA C., SALLIS E.S.V., GRECCO F.B., ESTIMA-SILVA P., SCHILD A.L. Tétano em bovinos no sul do Rio Grande do Sul: estudo de 24 surtos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**. 31(12):1066-1070.2011.

QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London. 648p. 1994

RAPOSO J.B Tétano, p.425-432. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A & Borges J.R.J. (Eds.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3rd. ed., vol. 1. Pallotti, Santa Maria. 2007.

RAYMUNDO D.L., PAVARINI S.P., BEZERRA JUNIOR P.S., ANTONIASSI N.A.B.,BRECHT, B.S, GOMES M.J.P. & DRIEMEIER D. Mionecrose aguda por Clostridium septicum em equinos. **Pesq. Vet. Bras**. 30:637-640.2010.

RECH R.R., RISSI D.R., PIEREZAN F., INKELMANN M.A. & BARROS C.S.L. Raiva em herbívoros: 27 casos. **Endivet, Campo Grande**, MS. (Resumo). 2006.

RIBAS N.L.K.S., CARVALHO R.I., SANTOS A.C., VALENÇOELA R.A., GOUVEIA A.F., CASTRO M.B., MORI A.E. & LEMOS R.A.A. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33(10):1183-1194. 2013

RIET-CORREA F. 2002. Clostridioses em ruminantes. Perguntas e respostas, p. 281-290. In: Lemos R.A.A., Barros N. & Brum K.B (Ed) **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte**. Editora UFMS, Campo Grande.2002

RIET-CORREA F Carbúnculo sintomático, p.264-288. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A & Borges J.R.J. (Eds.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3rd. ed., vol. 1. Pallotti, Santa Maria.2007^a.

RIET-CORREA F.. Edema maligno, p.286-265. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A & Borges J.R.J. (Eds.) Doenças de Ruminantes e Equídeos. 3rd. ed., vol. 1. Pallotti, Santa Maria. 2007^b.

RIET-CORREA F., TABOSA L.M., AZEVEDO E.O., MEDEIROS R. M.T., SIMÕES S.V.D., DANTAS F., ALVES C.J., NOBRE V.M.T., ATHAYDE A.C., GOMES A.A., LIMA E.F. Doenças dos ruminantes e equinos no semi-árido da Paraíba. *Semi-Árido em Foco*, 1:2-86. 2003.

ROEHE P.M., CUNHA A.C., RODRIGUES R.R., GONÇALVES A.R. & RIBEIRO C.L.G. Diagnóstico laboratorial de raiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana** 102(5):464-475. 1987

ROOD J.I. 2016. General Physiological and virulence properties of the pathogenic clostridia, p.7-12. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons. Ames 2016.

SALVADOR S.C & FREIRE C.A. Ocorrência de tétano epizootico em bovinos no Estado de Minas Gerais. **Arqs. Inst. Biol.** 65:95. (Abstract).1998.

SANCHES A.W.D., LANGOHR I.M., STIGGER A.L. & BARROS C.S.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 20(3):113-118. 2000.

SCHILD A.L.. Hemoglobinúria bacilar, p.305-308. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A & Borges J.R.J. (Eds.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3rd. ed., Vol. 1. Pallotti, Santa Maria.2007.

SCHILD A.L., RIET-CORREA F., FERREIRA J.L.M., MÉNDEZ M.C. & FERNANDES C.G Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1995 e comentários sobre algumas doenças. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico** no.16, Pelotas. 108p. 1996.

SCHILD A.L., MARQUES L.S., COELHO A.C.B., ECHENIQUE J.Z., LEMOS B.S., ESTIMA-SILVA P., OLIVEIRA P.A. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**. Principais diagnósticos realizados em ruminantes e equinos no Laboratório Regional de Diagnóstico entre 1978-2016. 39:48-51. 2017

SCHLESINGER, Sergio. **O gado bovino no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: FASE, 2010.

SILVA J.A., MOREIRA E.C., HADDAD J.P.A., MODENA C.M., TUBALDINI M.A.S. 2001. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53(3). 2001

SOARES M.C., GASPAR A.O., BRUMATTI R.C., GOMES D.C., NEVES D.A., ALCÂNTARA L.O.B., LEAL P.V., LEMOS R.A.A. Economic impact of an outbreak of botulism in a cattle feedlot. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 38(7):1365-1370. 2018

SILVA R.O.S., OLIVEIRA JUNIOR C.A., GONÇALVES L.A. & LOBATO F.C.F. Botulism in ruminants in Brazil. **Ciência Rural**. 46:1411-1417. 2016.

SILVA R.O.S., UZAL F.A., OLIVEIRA JR. C.A. & LOBATO F.C.F. Gas gangrene (malignant edema), p. 243-254. In: Uzal F., Prescott J., Songer G. & Popoff M. (Eds.) **Clostridial Diseases of Animals**. John Wiley & Sons. Ames. 2016.

SOJKA J.E., BOWERSOCK T.L., PARKER J.E., BLEVINS W.G. & IRIGOYEN L. *Clostridium Chauvoei* myositis infection in a neonatal calf. **J Vet. Diagn. Invest.** 4: 201-203. 1992.

SONGER J.G. Histotoxic clostridia, p.203-209. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds.) **Pathogenesis of Bacterial Disease in Animals**. 4th ed., Wiley Blackwell, Ames.2010a.

SONGER J.G. Enteric clostridia, p.211-229. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds.) **Pathogenesis of Bacterial Disease in Animals**. 4th ed., Wiley Blackwell, Ames.2010b.

TESSELE B., BRUM J.S. & BARROS C.S.L. Lesões parasitárias encontradas em bo-vinos abatidos para consumo humano. **Pesq. Vet. Bras.** 33:873-889.2013.

TOKARNIA C.H., DÖBEREINER J., PEIXOTO P.V. & CANELLA C.F.C. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 20(3): 127-138.2000.

TEIXEIRA T.F., HOLZ C.L., CAIXETA S.P.M.B., DEZEN D., CIBULSKI S.P., SILVA J.R., ROSA J.C.A., SCHMIDT E., FERREIRA J.C., BATISTA H.B.C.R., CALDAS E., FRANCO A.C. & ROEHE P.M. Diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul, Brasil, de 1985 a 2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 28:515-520. 2008.

TEIXEIRA L.H.M, TOMAZ L.A.G., LINHARES G.F.C., SANTOS M.F.C., JAYME V.S. Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. **Ciência animal brasileira**. 16 (1):144-157. 2015.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Beef 2007-08, Prevalence and Control of Bovine Viral Diarrhea Virus on U.S. Cow-calf Operations, 2007-08, 2010

UZAL F.A., KELLY W.R., MORRIS W.E. & ASSIS R.A. 2002. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. **J. Comp. Path.** 126:71-75. 2002.

UZAL F.A., PARAMIDANI M., ASSIS R., MORRIS W. & MIYAKWA M.F.. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. **Vet. Rec.** 152:134-136.2003.

VALETTE L. & PETERMANN H.G.. *Clostridium tetani*, p. 667-688. In: **Blobel H. & Schliesser T.** (ed.) *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Band II. Gustav Verlag Fischer, Stuttgart. 1988.

WILLIAMS B.M. . Clostridial myositis in cattle: Bacteriology and gross pathology. *Vet. Rec.* 100:90-91 1977.

VERGARA E.N. Seção de Gestão dos Processos e da Informação. Fiscal Estadual Agropecuário- IF 2372568. **Secretaria Estadual da Agricultura Pecuária e Abastecimento (SEAPA/RS)**. Av. Getúlio Vargas, 1384 - Menino Deus, Porto Alegre - RS, 90150-004.201

WHITLOCK R.H., ROCKE T., WILLOUGHBY D. & TOR E.. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. **Vet. Diagn. Invest.** 12: 204-209. 2000