

DIEGO MEDEIROS DE OLIVEIRA

**PARATUBERCULOSE E ENCEFALOMALACIA SIMÉTRICA FOCAL EM
CAPRINOS E OVINOS**

PATOS-PB

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos-PB, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa

PATOS-PB
2010

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

O48p

2010

Oliveira, Diego Medeiros

Paratuberculose e encefalomalacia simétrica focal em caprinos e ovinos / Diego Medeiros Oliveira – Patos-PB CSTR/UFCG, 2010.

74p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientador (a): Franklin Riet-Correa

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária -) Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 - Doenças infecciosas - Dissertação. 2 – Paratuberculose. 3- Encefalomalacia simétrica focal. I - Título.

CDU: 616.9:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PARATUBERCULOSE E ENCEFALOMALACIA SIMÉTRICA FOCAL EM
CAPRINOS E OVINOS

Dissertação de Mestrado elaborada por

DIEGO MEDEIROS DE OLIVEIRA

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Franklin Riet-Correa
UAMV da UFCG/CSTR/HV - PATOS/PB

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Sara Vilar Dantas Simões
UAMV da UFCG/CSTR/HV - PATOS/PB

PATOS-PB, 2010

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, irmãos e toda a minha família pela companhia, incentivo e confiança que depositaram em mim durante o curso.

Aos amigos da Universidade, pela contribuição, nesta dissertação.

Aos professores pela colaboração no meu aprendizado e incentivo ao estudo.

Aos funcionários que realmente trabalham valeu pelo esforço.

SUMÁRIO

1. Lista de figuras	
Introdução.....	07
Referências.....	08
2. Capítulo I – Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil	
Abstract	
Resumo	
2.1. Introdução.....	13
2.2. Material e métodos.....	14
2.3. Resultados.....	16
2.4. Discussão.....	23
2.5. Referências.....	24
3. Capítulo II – Encefalomalacia simétrica focal em caprino	
Abstract	
3.1. Comunicação breve.....	29
3.2. Referências.....	36
4. Capítulo III – Encefalomalacia simétrica focal em ovino	
Abstract	
Resumo	
4.1. Introdução.....	40
4.2. Material e métodos.....	41
4.3. Resultados.....	42
4.4. Discussão.....	45
4.5. Referências.....	47
Conclusões.....	50
.	
Anexos.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil	
Figura 1 Cabra com caquexia, devido à paratuberculose (Caprino 1.1).....	18
Figura 2 Ovelha com caquexia, em consequência da paratuberculose (Ovino 2.1).....	18
Figura 3 Mucosa do íleo espessada, irregular e enrugada formando pregas transversais, semelhante às circunvoluções cerebrais (Ovino 2.1).....	21
Figura 4 Na metade esquerda da figura, a mucosa, submucosa e lâmina própria, do jejuno do Ovino 2.1, apresentam espessamento segmentar. HE, visão submacroscópica.....	21
Figura 5 Lesão multibacilar difusa no íleo do Caprino 1.1. (A) Bacilos álcool-ácido resistentes, no citoplasma de macrófagos. Coloração de Ziehl-Neelsen, obj.40x. (B) Marcação positiva para <i>Mycobacterium</i> spp. Imuno-histoquímica, obj.40x.....	22
CAPÍTULO II. Encefalomalacia simétrica focal em caprino	
Figura 1 Caprino. Encefalomalacia simétrica focal. A e B) Fotografia submacroscópica apresentando áreas de malacia no tálamo (A) e cápsula interna (B). C) Área de malacia no tálamo, além disso, apresenta tumefação das células endoteliais dos vasos. D) Maior aumento da lesão mostrado em C, apresentando necrose das células gliais e neurônios (seta). Esferóides axonais (cabeça de seta) também foram observados. Hematoxilina e eosina.....	33
CAPÍTULO III. Encefalomalacia simétrica focal em ovino	
Figura 1 Encefalomalacia simétrica focal em ovino. (A) Herniação cerebelar. (B) Cerebelo com herniação cerebelar (esquerda) comparado com o cerebelo do ovino controle (direito). (C) Cápsula interna e (D) colículo rostral com malacia simétrica focal.....	44
Figura 2 Encefalomalacia simétrica focal em ovino. (A) Áreas multifocais de necrose são observadas na cápsula interna. HE, obj.10x. (B) Edema perivascular no tálamo HE,obj.20x.....	44

INTRODUÇÃO

No semiárido brasileiro, as doenças infecciosas de caprinos e ovinos são importantes e o seu conhecimento é de fundamental importância para estabelecer medidas eficientes na prevenção e controle. Entre as doenças que se destacam nessas espécies, estão a linfadenite caseosa, provocada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Riet-Correa et al. 2007), rinite micótica provocada pelo *Pythium insidiosum* e *Conidiobolus* spp (Silva et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007), ectima contagioso (Nóbrega Jr. et al. 2008), abscessos do sistema nervoso central, dermatofilose, listeriose, tétano, enterotoxemia e dermatite interdigital (Riet-Correa et al. 2003, Guedes et al. 2007) e micoplasmose (Azevedo et al. 2006).

A paratuberculose (doença de Johne), causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* é uma doença crônica e incurável, responsável por importantes perdas econômicas em ruminantes (Radostits et al. 2007, Riet-Correa & Driemeier 2007, Moravkova et al. 2008), que pode também afetar o homem (Chiodini & Rossiter 1996, Chamberlin et al. 2001). No Brasil, têm sido diagnosticados casos da enfermidade, apenas em bovinos (Mota et al. 2007, Riet-Correa & Driemeier 2007, Oliveira et al. 2008, Mota et al. 2009), mas não há dados sobre sua prevalência. No país, não há relatos de casos espontâneos em caprinos e ovinos, mas há relatos da reprodução experimental da doença com isolamentos provenientes de bovinos (Silva 1968, Poester & Ramos 1994).

Encefalomalacia simétrica focal (ESF) é uma forma esporádica da enterotoxemia em ovinos, caracterizada por lesões de malacia, simétrica e focal, do sistema nervoso central, provocada pela toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D, encontrado normalmente no trato gastrintestinal de alguns animais sadios (Hartley 1956, Gay et al. 1975, Riet-Correa et al. 2007, Zachary 2007, Uzal & Songer 2008). No Brasil há relatos de casos espontâneos de ESF em ovinos (Riet-Correa et al. 2007, Guedes et al. 2007, Márcio B. Castro, 2008, dados não publicados), mais não há relatos espontâneos em caprinos, no mundo.

Este trabalho é dividido em 3 capítulos. O primeiro trabalho, aceito na Pesquisa Veterinária Brasileira relata, pela primeira vez no Brasil, paratuberculose espontânea em caprinos e ovinos. O segundo trabalho enviado a Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, descreve pela primeira vez no mundo, ESF em caprinos. O terceiro trabalho, enviado a Pesquisa Veterinária Brasileira, descreve um surto de ESF em ovinos.

Referências

- [Azevedo E. O.](#), Alcântara M. D. B., [Nascimento E. R.](#), [Tabosa I. M.](#), Barreto M. L., Almeida J. F., [Araujo M. D.](#), Rodrigues A. R. O., Riet-Correa F. & Castro R. S. 2006. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz. J. Microb.* 37:576-581.
- Chamberlin W., Graham D.Y., Hulten K., El-Zimaity H.M.T., Schwartz M.R., Naser S., Shafran I. & El-Zaatari F.A.K. 2001. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15(3):337-346.
- Chiodini R.J. & Rossiter C.A. 1996. Paratuberculosis: A potential zoonosis? *Vet. Clin. North. Am., Food. Anim. Pract.* 12(2):457-467.
- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Miranda Neto E.G., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* 27:29-38.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.T. 2007. Paratuberculosis (Johnes Diseases), p.1017-1044. In: *Ibid.* (Eds), *Veterinary Medicine*. 10th ed. Saunders, Elsevier, Edinburgh.
- Hartley WJ. 1956. A focal symmetrical encephalomalacia of lambs. *N. Z. Vet. J.* 4:129-135.
- Moravkova M., Hlozek P., Beran V., Pavlik I., Preziuso S., Cuteri V. & Bartos M. 2008. Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res. Vet. Sci.* 85(2):257-264.
- Mota P.M.P.C., Pires P.S., Assis R.A. Salvarani F.M., Leite R.M.H., Dias L.D., Leite R.C., Lobato F.C.F., Guedes R.M.C. & Lage, A.P. 2009. Paratuberculosis in a dairy gyr herd in the state of Paraíba, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 29(9):703-706.
- Mota R.A., Pinheiro Junior J.W., Gomes M.J.P., Peixoto R.M., Maia F.C.L., Brito M.F., Chies J.A.B., Snel G.G.M., Bercht B.S. & Juffo G.D. 2007. Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no estado de Pernambuco, PE. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 74(2):73-79.
- Nóbrega Jr J.E., Macêdo J.T.S.A., Araújo J.A.S., Dantas A.F.M., Soares M.P. & Riet-Correa F. 2008. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1):135-139.

- Oliveira D.M., Pimentel L.A., Rodrigues T.A., Dantas A.F.M., Neto E.G.M., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2008. Paratuberculose em bovinos no estado da Paraíba. Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário (Endivet), Campo Grande, MS, p.203-204. (Resumo).
- Pignata W.A., Alves C.J., Azevedo S.S., Dantas A.F.M., Gomes A.A.B., Remígio F.R. & Lima F.S. 2009. Prevalência da tuberculose caprina no semi-árido paraibano. *Pesq. Vet. Bras.* 29(7):526-532.
- Poester F.P. & Ramos E.T. 1994. Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. *Ciência Rural* 24(2):333-337.
- Riet-Correa F. & Driemeier D. 2007. Paratuberculose, p.407-414. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. 2007. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS. p.722.
- Silva N.M. 1968. Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. *Pesq. Agropec. Bras.* 3:285-289.
- Silva S.M.M.S., Castro R.S., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C., Batista M.C.S., Riet-Correa F. & Carvalho E.M.S. 2007. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. *Pesq Vet Bras* 27(4):184-190,
- Uzal F.A. & Songer J.G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:253–265.
- Zachary J.F. 2007. Nervous System, p.833-971. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic basis of veterinary disease*, 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.

CAPITULO I

PARATUBERCULOSE EM CAPRINOS E OVINOS NO BRASIL

(Enviado e aceito pela revista: Pesquisa Veterinária Brasileira)

Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil¹

Diego M. Oliveira², Franklin Riet-Correa^{2*}, Glauco J.N. Galiza², Adriana C.O. Assis²,
Antônio F.M. Dantas², Paulo M. Bandarra³ e Felício Garino Jr²

ABSTRACT.- Oliveira D.M., Riet-Correa F., Galiza G.J.N., Assis A.C.O., Dantas A.F.M., Bandarra P.M. & Garino Jr F. 2010. [**Paratuberculosis in goats and sheep in Brazil.**] Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(1):67-72. Hospital Veterinário, CSTR, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brazil. E-mail: franklin.riet@pq.cnpq.br

This paper reports paratuberculosis in sheep and goats for the first time in Brazil. On Farm 1 in a flock of 33 goats and 13 sheep, one adult female goat presented progressive weight loss during about one year, and soft feces during one month before death. All the animals from the flock were submitted to the comparative tuberculin test. One sheep was positive to the avian tuberculin (2.2%) and in two the results were inconclusive. On Farm 2, in a flock of 200 sheep and 80 goats, one adult ewe presented progressive weight loss during about one year, and soft feces during 20 days before death. All sheep older than four months of age and 23 goats were submitted to tuberculin test with avian tuberculin; 47 (25.4%) sheep were positive, 115 (61.5%) had inconclusive results, and 25 (13.4%) were negative. No positive tuberculin test were observed in the goats, but in 11 (47.8%) the test was inconclusive and in 12 (52.2%) was negative. At necropsy both affected animals had enlarged mesenteric lymph nodes. In the affected sheep, the gut wall was thickened and corrugated, mainly in the ileum and ileocecal valve. Histologically, granulomas with mainly foamy macrophages were observed in the lamina propria and submucosa of the gut, in mesenteric lymph nodes, and in the goat also in the liver. One tuberculin positive sheep and one tuberculin negative goat from Farm 1 were euthanized and necropsied. A mild thickened of the intestinal wall was observed grossly in both animals. Inflammatory infiltrate with mainly lymphocytes was

¹ Recebido em 25 de julho de 2009.

Aceito para publicação em 4 de setembro de 2009.

² Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-000 Patos, PB, Brasil. *Autor para correspondência: franklin.riet@pq.cnpq.br

³ Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

observed on the submucosa and lamina propria of the gut. In the four cases acid-alcohol positive rods, positive for *Mycobacterium* spp. on immunohistochemical examination were observed in macrophages and lymphocytes. New studies are necessary to know the prevalence and economical impact of paratuberculosis in goats and sheep in Brazil, to determine control measures, and to evaluate the risk of human transmission.

INDEX TERMS: Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, paratuberculosis, sheep, goats.

RESUMO.- Este trabalho relata, pela primeira vez no Brasil, no Estado da Paraíba, paratuberculose em dois rebanhos com criação conjunta de caprinos e ovinos. Na Fazenda 1, de um rebanho de 33 caprinos e 13 ovinos, uma cabra adulta apresentou emagrecimento progressivo por aproximadamente um ano e fezes pastosas um mês antes da morte. Todos os animais do rebanho foram tuberculinizados com a prova comparativa. Um ovino (2,2%) teve resultado positivo à tuberculina aviar e em dois o teste foi inconclusivo. Na Fazenda 2, com 200 ovinos e 80 caprinos, foi afetada uma ovelha adulta que apresentou emagrecimento progressivo por aproximadamente um ano e fezes pastosas por aproximadamente 20 dias. Todos os ovinos com mais de 4 meses de idade e 23 caprinos foram tuberculinizados com tuberculina aviar; em 47 (25,4%) o resultado foi positivo, em 115 (61,5%) inconclusivo e em 25 (13,4%) negativo. Entre as cabras não houve nenhuma positiva à tuberculina aviar, mas em 11 (47,8%) o teste foi inconclusivo e em 12 (52,2%) foi negativo. Na necropsia dos dois animais com sinais clínicos os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de tamanho e edemaciados. O ovino afetado da Fazenda 2, apresentou espessamento e enrugamento da mucosa do intestino, principalmente no íleo e válvula íleo-cecal. Microscopicamente o caprino e o ovino com sinais clínicos apresentaram lesões semelhantes, caracterizadas por granulomas com predominância de macrófagos espumosos, na lâmina própria e submucosa do intestino e linfonodos mesentéricos. O ovino positivo à tuberculina e um caprino negativo na Fazenda 1 foram eutanasiados e apresentaram discreto espessamento da mucosa do íleo. Na histologia foi observado infiltrado preferentemente linfocítico. Em todos os casos dentro de macrófagos e linfócitos havia presença de bacilos ácido-álcool-resistentes, positivos na imuno-histoquímica para *Mycobacterium* spp. Sugere-se a necessidade de estudar a prevalência de paratuberculose em rebanhos de caprinos e ovinos no Brasil, determinar medidas de controle e avaliar a possibilidade de transmissão para humanos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: doença de Johne, paratuberculose, caprinos, ovinos, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

INTRODUÇÃO

A paratuberculose (doença de Johne) é uma enfermidade infecciosa crônica, incurável, que ocorre em todos os continentes, afetando principalmente ruminantes domésticos e, com menor frequência, ruminantes selvagens, eqüinos, suínos, lebres, raposas e roedores. O agente etiológico é *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que causa enterite e linfadenite granulomatosas (Clarke 1997, Harris & Barletta 2001, Barker 2007, Riet-Correa & Driemeier 2007, Moravkova et al. 2008).

A doença é responsável por grandes perdas econômicas. Nos EUA o prejuízo anual com esta enfermidade é estimado em US\$ 200-250 milhões (Ott et al. 1999). Há fortes indícios de que MAP seja o agente causal da ileocolite granulomatosa de humanos conhecida como doença de Crohn (Chiodini & Rossiter 1996, Chamberlin et al. 2001).

Em ruminantes, a infecção geralmente ocorre logo após o nascimento (Clarke & Little 1996), principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados e leite e colostro de animais infectados. Há também transmissão pela via intra-uterina (Silva 1968, Radostits et al. 2007). Os sinais clínicos ocorrem, muitas vezes, logo após estresse relacionado ao transporte, parto e aleitamento, diminuição na ingestão alimentar, imunossupressão e doenças intercorrentes. Os animais criados em sistema intensivo e aqueles que estão em solos ácidos são mais suscetíveis (Taylor et al. 1981, Radostits et al. 2007).

Em ovinos e caprinos a doença clínica geralmente se manifesta em animais acima de um ano de idade (Clarke 1997). Só ocasionalmente animais mais jovens são afetados (Kumar et al. 2007, Singh et al. 2007). A doença manifesta-se principalmente, por emaciação progressiva. Em ambas as espécies, a diarreia não é grave ou está ausente, um aspecto diferente dos bovinos nos quais a diarreia é um sinal clínico característico (Radostits et al. 2007).

Em ovinos que apresentam sinais clínicos, as lesões histológicas variam, ocorrendo duas formas da doença: (1) a tuberculóide (lesão paucibacilar) com uma forte resposta imunológica celular, e com poucas micobactérias ou mesmo ausência delas nas lesões; (2) a lepromatosa (lesão multibacilar) com forte resposta imunológica humoral, contendo numerosas micobactérias intracelulares. As duas formas associadas, chamadas

de formas limítrofes (*borderline forms*), tendem a apresentar os sinais clínicos mais graves (Clarke & Little 1996, Pérez et al. 1996). Em caprinos as lesões podem ser classificadas como focais ou difusas do tipo multibacilar, linfocítica ou mista (Corpa et al. 2000).

No Brasil, têm sido diagnosticados casos de paratuberculose, em bovinos importados e naqueles nascidos no país, filhos de pais importados, nas regiões sul e sudeste (Ilha et al. 1998, Riet-Correa & Driemeier 2007), mas não há dados sobre a prevalência da enfermidade. No nordeste, em Pernambuco e Paraíba, também ocorre a paratuberculose em bovinos, sem histórico de importação (Mota et al. 2007, Oliveira et al. 2008). No Brasil, não há relatos de casos espontâneos em caprinos e ovinos, mas a paratuberculose foi reproduzida experimentalmente em ovinos (Silva 1968) e caprinos (Poester & Ramos 1994) com isolamentos de micobactérias de origem bovina.

O objetivo deste trabalho é relatar a ocorrência de paratuberculose em caprinos e ovinos no nordeste do Brasil e descrever o quadro clínico-patológico da enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados epidemiológicos foram coletados junto aos produtores, em duas fazendas (1 e 2), no semi-árido da Paraíba, onde foi diagnosticada a doença. Na Fazenda 1 havia um rebanho de 33 caprinos da raça Moxotó e cruzas, e 13 ovinos da raça Santa Inês, com idade entre quatro meses a oito anos. Os animais eram mantidos em confinamento e alimentados com concentrados (farelos de trigo e de milho e ração comercial) e feno de capim Tifton (*Cynodon dactylon*). Na Fazenda 2 havia 80 caprinos cruzas e 200 ovinos, da raça Santa Inês, de um mês à seis anos de idade. Os animais eram confinados e suplementados com concentrado à noite e durante o dia permaneciam a campo.

De um caprino e um ovino com sinais clínicos, foram coletadas fezes da ampola retal para a contagem dos ovos por grama (OPG) de fezes de parasitas gastrintestinais. Foram também realizados nesses animais, raspados de pele, em áreas de alopecia, para diagnóstico de dermatomicose, por esfregaço direto, e de dermatofilose pela coloração de azul de metileno.

Foi realizado teste de tuberculina nos ovinos e caprinos acima de 4 meses de idade. Na Fazenda 1 todos os animais dessa faixa etária foram submetidos ao teste, sendo 13 ovinos e 33 caprinos. Na fazenda 2 foram tuberculinizados 187 ovinos e 23 caprinos. O teste da tuberculinização foi feito após tricotomia; em seguida era mensurada a espessura da dobra da pele com o cutímetro. Após 72 horas foi feita outra

medida da espessura da dobra da pele. Na Fazenda 1 foi utilizado o teste cutâneo comparativo, na região da escápula média, com inoculação dos derivados protéico aviário (0,1 ml, com 2.500UI) e bovino (0,1 ml, com 5.000UI). Foram considerados positivos animais com reação à tuberculina aviar de mais de 4 mm do que a reação da tuberculina bovina. Reações com diferença entre a bovina e a aviária menores que 2 mm foram consideradas negativas e entre 2 e 3,9 mm inconclusivas. Na Fazenda 2 apenas a tuberculina aviária (PPD-aviário) foi utilizada. Animais com aumento da espessura da pele de menos de 2 mm foram considerados negativos e com mais de 4 mm, positivos. Leituras intermediárias foram consideradas inconclusivas.

O Ovino 2.1, da Fazenda 2, que apresentava sinais clínicos, o Ovino 1.1 e o Caprino 1.2, da Fazenda 1, que não apresentavam sinais, foram eutanasiados e necropsiados. Também foi necropsiado o Caprino 1.1, da Fazenda 1 que morreu espontaneamente. Do Caprino 1.1 foram coletadas amostras de íleo, jejuno, linfonodos mesentéricos, fígado, abomaso, pulmão, rins, baço, coração e pele. Dos demais animais (Caprino 1.2 e Ovinos 1.1 e 2.1) foram coletados fragmentos do duodeno (5 cm de distância do piloro), jejuno (amostras, da porção inicial, média e final), íleo (amostras, com 5 e 10 cm de distância da válvula ileocecal, válvula ileocecal, ceco, cólon, reto (a 10 cm do ânus), linfonodos mesentéricos, pré-escapular, retrofaríngeos, mediastínicos, hepático, supra-mamário e ilíaco medial, fígado, vesícula biliar, baço, pâncreas, estômago e pré-estômagos, adrenal, rins, pulmão, coração, aorta, tireóide, útero, glândula mamária e sistema nervoso central. Todos os órgãos coletados foram fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação as amostras foram incluídas em parafina, cortadas a 5µm e coradas com Hematoxilina e Eosina. Os fragmentos de íleo, válvula ileocecal e linfonodo mesentérico foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, como também o fígado do Caprino 1.1.

Cortes histológicos de íleo, válvula ileocecal e linfonodos mesentéricos foram submetidas à imuno-histoquímica. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com protease XIV² durante 15 minutos. Para a diminuição das ligações inespecíficas (“background”), as lâminas foram tratadas com leite desnatado³ 5% em água destilada durante 15 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal

⁴ Sigma Chemical Company, Poole, United Kingdom (UK).

⁵ Molico, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Genetex, GTX20905) na diluição de 1:200 em PBS durante uma hora à 37°C. Em seguida, foi utilizado anticorpo secundário biotinalado por 20 minutos e depois tratados com o conjugado estreptavidina-peroxidase⁴ por mais 20 minutos. Como cromógeno foi utilizado o DAB (3,3 - diaminobenzidina⁵. Controles positivos foram utilizados simultaneamente no procedimento.

RESULTADOS

Epidemiologia e sinais clínicos

Na Fazenda 1, a doença foi diagnosticada em uma cabra (Caprino 1.1), de 3 anos de idade, que apresentava emagrecimento há aproximadamente um ano. No momento do exame estava caquética (Fig.1), com desidratação de aproximadamente 5%, mucosas oculares pálidas, dispnéia mista, tosse seca, arritmia cardíaca, edema submandibular e apetite caprichoso. O pêlo estava sem brilho, áspero e quebradiço e apresentava áreas de alopecia bilateral, com formação de crostas na região toracolombar. Foi realizada tuberculinização com PPD bovino, com resultado negativo. A cabra morreu após um mês, durante o qual apresentou fezes estavam pastosas.

O Ovino 2.1, proveniente da Fazenda 2, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da UFCG em Patos, por apresentar emagrecimento. Tinha 3 anos de idade e os sinais tinham se agravado 20 dias após o parto. Ao exame clínico observou-se caquexia (Fig.2), fezes pastosas e áreas bilaterais, de alopecia na região dorsal. No teste de tuberculina com PPD aviária, o resultado foi positivo.

Os esfregaços da pele do Caprino 1.2 e do Ovino 2.1 foram negativos para fungos e *Dermatophilus* spp. O Caprino 1.1 apresentava infestação moderada de *Eimeria* spp. e as fezes dos dois animais foram negativas para parasitas gastrintestinais.

Tuberculinização

Na Fazenda 1, um ovino (Ovino 1.1), com idade de 4 anos e estado corporal bom, foi positivo a PPD aviária (1/46; 2,2%), na prova comparativa. Em um caprino e um ovino o resultado foi inconclusivo. Na Fazenda 2, 47 (25,1%) ovinos com idade variando de 5 meses a 5 anos e estado corporal regular a bom foram positivos a PPD aviária; em 115 (61,5%) o resultado foi inconclusivo e em 25 (13,4%) foi negativo. Nos caprinos foi obtido resultado inconclusivo em 11 (47,8%) e resultado negativo em 12 (52,2%).

⁴ Estreptavidina-peroxidase LSAB, Dako, Carpinteria, California, United States of America (USA).

⁵ 3,3 - diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, California, USA.



Fig.1. Cabra com caquexia devido a paratuberculose (Caprino 1.1.)



Fig.2. Ovelha com caquexia, em consequência da paratuberculose (Ovino 2.1).

Alterações macroscópicas

Todos os animais apresentavam os linfonodos mesentéricos, aumentados de volume, edemaciados e ao corte, nódulos esbranquiçados salientes no córtex, de intensidade leve a acentuada. No Caprino 1.1 e Ovino 2.1 foi observada atrofia da serosa da gordura pericárdica. O Caprino 1.1 apresentava edema do mesentério e o Ovino 2.1, além desta alteração, também apresentava 700 ml de líquido na cavidade abdominal, de coloração citrina e consistência gelatinosa. O Ovino 2.1 apresentava segmentos, variando de 2-22 cm de comprimento, do jejuno e íleo com a mucosa espessada (com até 0,5cm de espessura), irregular e enrugada (Fig.3 e 4), formando pregas transversais que não desapareciam ao se tracionar o intestino, semelhante às circunvoluções cerebrais. Nessas áreas, ao corte do intestino, observava-se pigmento marrom-alaranjado na submucosa e lâmina própria. Áreas multifocais com ulcerações da mucosa e nódulos esbranquiçados na serosa foram observados tanto no intestino grosso quanto no delgado. O Caprino 1.2 e o Ovino 1.1, que não apresentavam sinais clínicos da enfermidade, tinham a mucosa do íleo e jejuno discretamente enrugado com até 0,2cm de espessura. O Caprino 1.2 apresentava a mucosa do duodeno levemente avermelhada. Todos os animais com exceção do Caprino 1.2 tinham os vasos linfáticos do mesentério dilatados. Todos os animais apresentavam *Cysticercus tenuicollis* na cavidade abdominal.

Alterações microscópicas.

No Caprino 1.1 o jejuno e o íleo estavam com a lâmina própria e a submucosa distorcida e distendida por infiltrado inflamatório difuso e acentuado, constituído predominantemente por macrófagos espumosos e poucos linfócitos e plasmócitos (Fig.5). No Ovino 2.1, tanto no intestino delgado quanto no ceco, a lâmina própria e submucosa estavam distendidas e distorcidas por infiltrado inflamatório difuso ou em aglomerados, compostos por macrófagos espumosos, por vezes com pigmento marrom no citoplasma, células epitelióides, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e, no duodeno, raras células gigantes. Havia edema na mucosa do ceco e reto. O cólon e reto apresentavam discreto infiltrado predominante linfoplasmocitário difuso na lâmina própria. O mesmo infiltrado foi ocasionalmente observado ao redor de vasos na serosa. Havia hiperplasia das placas de Peyer.

No Ovino 1.1, positivo à tuberculina aviária, e no Caprino 1.2, negativo, ambos sem sinais clínicos da enfermidade, a lâmina própria do intestino delgado e ceco apresentavam infiltrado difuso de leve a moderado, preferentemente de linfócitos e com menor frequência, macrófagos, plasmócitos e eosinófilos.

Nos linfonodos mesentéricos do Ovino 2.1. observaram-se aglomerados de macrófagos espumosos ocasionalmente com pigmento amarronzado no interior do citoplasma, células epitelióides, eosinófilos, células gigantes e áreas de necrose, na região cortical, medular e seios perinodulares. Os linfonodos mesentéricos do Caprino 1.1. apresentavam características semelhantes aos do Ovino 2.1., mais com ausência de células gigantes. Nos linfonodos mesentéricos do Caprino 1.1 e do Ovino 2.1 havia depleção linfóide.

No fígado do Caprino 1.1 havia microgranulomas multifocais distribuídos aleatoriamente, constituídos por macrófagos espumosos e linfócitos. No rim do mesmo caprino havia cilindros hialinos e gotas hialinas no interior de túbulos contornados. No miocárdio do Caprino 1.2 havia áreas multifocais, discretas, de infiltrado linfohistiocitário. Hiperqueratose ortoqueratótica e acantose da epiderme foram observadas nas áreas alopécicas da pele do Caprino 1.1 e Ovino 2.1.

Nas secções coradas com método de Ziehl-Neelsen encontravam-se bacilos álcool-ácido resistentes, no citoplasma de macrófagos (Fig.5A) e linfócitos. Na imunohistoquímica foi observada marcação positiva para *Mycobacterium* spp. no interior do citoplasma de macrófagos (Fig4B) e outros tipos de células linfóides.



Fig.3. A mucosa do íleo está espessada, irregular e enrugada formando pregas transversais, semelhante às circunvoluções cerebrais (Ovino 2.1).



Fig.4. Na metade esquerda da figura, a mucosa, submucosa e lâmina própria, do jejuno do Ovino 2.1, apresentam espessamento segmentar. HE, visão submacroscópica.

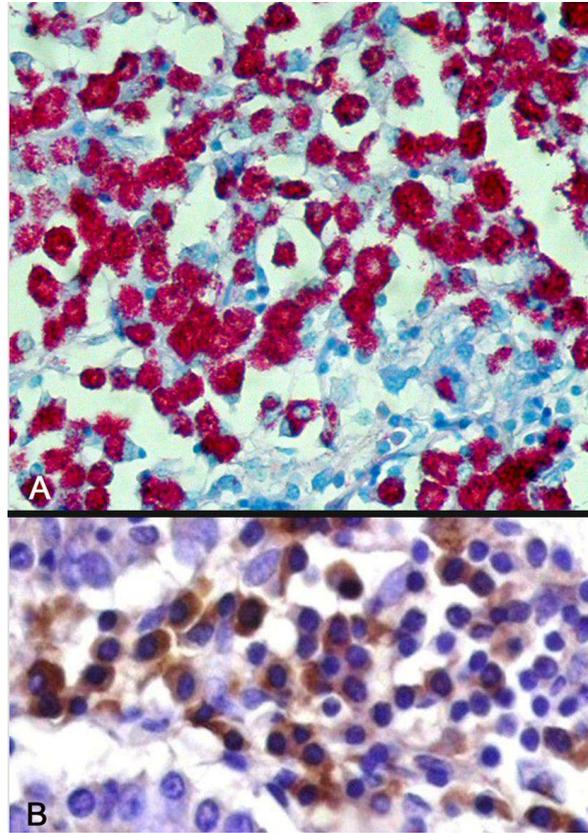


Fig.5. Lesão multibacilar difusa no íleo do Caprino 1.1. (A) Bacilos álcool-ácido resistentes, no citoplasma de macrófagos. Coloração de Ziehl-Neelsen, obj.40x. (B) Marcação positiva para *Mycobacterium* spp. Imuno-histoquímica, obj.40x.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui confirmam a existência da paratuberculose em caprinos e ovinos na Paraíba e alertam para a possível ocorrência da doença nessas espécies de pequenos ruminantes em outras regiões do Brasil. O sinal clínico mais característico dessa doença em caprinos e ovinos é o emagrecimento acentuado, na maioria das vezes sem diarreia, o que facilita a confusão com diversas doenças infecciosas, parasitárias e nutricionais. Novos trabalhos deverão ser realizados para determinar a prevalência e os prováveis prejuízos econômicos da enfermidade.

Um aspecto importante a ser levado em consideração é o da saúde pública. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* é provavelmente a causa da doença de Crohn e uma das mais prováveis vias de transmissão é o leite de vacas contaminadas e seus subprodutos (Slana et al. 2009). Em consequência do fato da doença afetar caprinos leiteiros, o consumo de leite de cabras poderia representar risco de transmissão para o homem. Outras possíveis vias de transmissão da doença dos pequenos ruminantes para o homem devem ser também consideradas.

As lesões macroscópicas observadas são características da enfermidade. O espessamento segmentar observado na ovelha foi descrito por Carringa & Seaman (1990) e Clarke & Little (1996). A pigmentação de cor amarelo-laranja na mucosa do intestino é relatada em ovinos, especialmente na Inglaterra, sendo causadas por estirpes de micobactérias pigmentadas (Clarke & Little 1996). A ausência das lesões macroscópicas do intestino, como observada no Caprino 1.1, é comum nos caprinos (Corpa et al. 2000, Barker 2007), daí a importância do exame histopatológico do íleo, válvula ileocecal e linfonodos mesentéricos.

Em relação à classificação das lesões intestinais e dos linfonodos mesentéricos dos animais que apresentaram a forma clínica da doença, o Caprino 1.1 apresentou uma lesão multibacilar difusa (Corpa et al. 2000) e o Ovino 2.1 uma forma lepromatosa do Tipo 3b (Pérez et al. 1996). Nos animais com a forma subclínica ficou caracterizada uma enterite linfocítica difusa (Pérez et al. 1996, Corpa et al. 2000). As lesões de paratuberculose no fígado do Caprino 1.1 provavelmente são conseqüentes à diminuição da imunidade celular associada à progressão da enfermidade (Sweeney et al. 1992).

Neste trabalho o diagnóstico foi realizado pela presença de enterite e linfadenite granulomatosa, que são lesões características da doença, e pela presença de bacilos álcool-ácido resistentes, com marcação positiva para *Mycobacterium* spp. na imuno-histoquímica. Os resultados da tuberculinização, observados tanto na técnica

comparativa quanto na simples para *M. avium*, considerando o alto número de animais com diagnóstico inconclusivo nas fazendas 1 e 2, e a não detecção de um animal com lesões na Fazenda 1, sugerem que esse método é pouco eficiente para o diagnóstico da doença subclínica.

Para o futuro do controle da doença, assim como para avaliar e diminuir os riscos de contaminação humana, deverão ser desenvolvidas outras técnicas de diagnóstico, incluindo a determinação de anticorpos séricos pelo ELISA e a técnicas de PCR para identificação do MAP em leite (Kumar et al. 2007, Radostits et al. 2007, Riet-Correa & Driemeier 2007). Sem a utilização dessas ou outras técnicas para a identificação de animais afetados subclínicamente é difícil estabelecer formas de controle da doença nas fazendas onde foi diagnosticada a mesma. Apesar disso devem ser recomendadas medidas gerais, como a eliminação de animais que apresentem emagrecimento progressivo, higiene adequada das instalações e outras medidas que evitem o contato com matérias fecais, principalmente dos cordeiros e cabritos.

Agradecimentos.- O primeiro autor agradece à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. Este projeto foi financiado pelo CNPq (Proc. 471783/2008-0).

REFERÊNCIAS

- Barker I.K. 2007. The alimentary system, p. 1-296. In: Maxie M.G., Jubb Kennedy & Palmer (Eds), Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Elsevier, Oxford, p.222-225.
- Carrigan M.J. & Seaman J.T. 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. Aust.Vet. J. 67(2):47-50.
- Chamberlin W., Graham D.Y., Hulten K., El-Zimaity H.M.T., Schwartz M.R., Naser S., Shafran I. & El-Zaatari F.A.K. 2001. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. Aliment. Pharmacol. Ther. 15(3):337-346.
- Chiodini R.J. & Rossiter C.A. 1996. Paratuberculosis: A potential zoonosis? Vet. Clin. North. Am., Food. Anim. Pract. 12(2):457-467.
- Clarke C.J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species: A review. J. Comp. Pathol. 116(3):217-261.

- Clarke C.J. & Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114(4):419-437.
- Corpa J.M., Garrido J., García Marín J.F. & Pérez V. 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122(4):255-265.
- Harris N.B. & Barletta R.G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol.* 14(3):489-512.
- Ilha M.R.S., Barros C.S.L., Bezerra P.S. & Langohr I.M. 1998. Paratuberculose em um bovino no Rio Grande do Sul. 13º. Jornada Acadêmica Integrada, Santa Maria, RS, p. 450. (Resumo)
- Kumar P., Singh S.V., Bhatiya A.K., Sevilla I., Singh A.V., Whittington R.J., Juste R.A., Gupta V.K., Singh P.K., Sohal J.S. & Vihan V.S. 2007. Juvenile capriparatuberculosis (JCP) in India: Incidence and characterization by six diagnostic tests. *Small Rum. Res.* 73(1-3):45-53.
- Moravkova M., Hlozek P., Beran V., Pavlik I., Preziuso S., Cuteri V. & Bartos M. 2008. Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res. Vet. Sci.* 85(2):257-264.
- Mota R.A., Pinheiro Junior J.W., Gomes M.J.P., Peixoto R.M., Maia F.C.L., Brito M.F., Chies J.A.B., Snel G.G.M., Bercht B.S. & Juffo G.D. 2007. Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no estado de Pernambuco, PE. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 74(2):73-79.
- Oliveira D.M., Pimentel L.A., Rodrigues T.A., Dantas A.F.M., Neto E.G.M., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2008. Paratuberculose em bovinos no estado da Paraíba. Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário (Endivet), Campo Grande, MS, p.203-204. (Resumo).
- Ott S.L., Wells S.J. & Wagner B.A. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40(3-4):179-192.
- Pérez V., García Marín J.F. & Badiola J.J. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114(2):107-122.
- Poester F.P. & Ramos E.T. 1994. Infecção experimental em caprinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. *Ciência Rural* 24(2):333-337.

- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.T. 2007. Paratuberculosis (Johne's Diseases), p.1017-1044. In: Ibid. (Eds), Veterinary Medicine. 10th ed. Saunders, Elsevier, Edinburgh.
- Riet-Correa F. & Driemeier D. 2007. Paratuberculose, p.407-414. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Silva N.M. 1968. Estudos sobre a paratuberculose. IV. Infecção experimental de ovinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. Pesq. Agropec. Bras. 3:285-289.
- Singh S.V., Singh A.V., Singh P.K., Gupta V.K., Kumar S. & Vohra J. 2007. Seroprevalence of paratuberculosis in young kids using 'Bison type', *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen in plate ELISA. Small Rum. Res. 70(2-3):89-92.
- Slana I., Liapi M., Moravkova M., Kralova A. & Pavlik I. 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. Prev. Vet. Med. 89(3/4):223-226.
- Sweeney R.W., Whitlock, R.H. & Rosenberger, A.E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. Am. J. Vet. Res. 53:477-480.
- Taylor T.K., Wilks C.R. & McQueen D.S. 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec. 109(12):532-533.

CAPITULO II

ENCEFALOMALACIA SIMÉTRICA FOCAL EM CAPRINO

(Enviado à Journal of Veterinary Diagnostic Investigation)

Encefalomalacia Simétrica Focal em Caprino

Diego M. Oliveira, Luciano A. Pimentel, André F. Pessoa, Antônio F.M. Dantas,
Francisco Uzal e Franklin Riet-Correa

Autor para correspondência: Franklin Riet-Correa. Hospital Veterinário, Universidade
Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Paraíba, CEP 58700-000.

franklin.riet@pq.cnpq.br

ENCEFALOMALACIA SIMÉTRICA FOCAL EM CAPRINO

Diego M. Oliveira¹, Luciano A. Pimentel, André F. Pessoa, Antônio F.M. Dantas,
Francisco Uzal e Franklin Riet-Correa²

Resumo. Encefalomalacia simétrica focal (ESF) é a lesão mais proeminente observada na forma crônica da enterotoxemia em ovinos, causada pelo *Clostridium perfringens* tipo D. Esta lesão não tem sido reportada em caprinos, associada a enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D. Este trabalho relata um caso de ESF em caprino no estado da Paraíba, no semiárido brasileiro. Segundo informação do fazendeiro, de um rebanho de 150 caprinos, 30 animais com 4-48 meses de idade morreram depois de apresentarem sinais nervosos incluindo decúbito lateral e cegueira, por um período variando entre 1 a 14 dias. O rebanho estava em pastagem nativa e era suplementado com farelo de milho e trigo. As cabras em lactação, adicionalmente, eram suplementadas com farelo de soja. Um caprino com 4 meses de idade com sinais nervosos foi clinicamente examinado e necropsiado, após 3 dias do início dos sinais clínicos. Áreas focais, simétricas e bilaterais de descoloração amarronzada eram observadas na cápsula interna e tálamo. As lesões histológicas consistiam de malacia bilateral, multifocal com pouco neutrófilos, tumefação das células endoteliais dos vasos sanguíneos, edema perivascular, e hemorragias. A etiologia destas lesões não foi determinada. No entanto, ESF é considerada patognomônica da enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D e especula-se que esta bactéria foi o agente etiológico deste caso. Esses animais tinham sido vacinados contra enterotoxemia do tipo D somente uma vez, aproximadamente 3 meses antes do começo do surto. Imunidade insuficiente, devido ao protocolo de vacinação incorreto e /ou baixa eficácia da vacina usada, e alimentação com grande quantidade de carboidratos altamente fermentáveis devem ser considerados como fatores predisponentes para esta doença.

Palavras chave: *Clostridium perfringens* tipo D, toxina épsilon, enterotoxemia, malacia.

¹ From Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 58700-000. Brazil (DMO, LAP, AFP, AFMD, FRC), and California Animal Health and Food Safety, School of Veterinary Medicine University of California, Davis 105 W Central Ave, San Bernardino, CA 92408, USA (FU).

² Corresponding author: Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 58700-000. Brazil. franklin.riet@pq.cnpq.br

Enterotoxemia é uma doença frequente em ovinos e caprinos causado pelo *Clostridium perfringens* tipo D.^{11,12,21} Esta bactéria é encontrada no habitat normal do intestino em um pequeno número de animais sadios.^{11,12} Alterações no ambiente intestinal, causadas por alterações repentinas da dieta, principalmente da ingestão de carboidratos altamente fermentáveis, estão associadas com a proliferação do *C. perfringens* tipo D e produção da protoxina épsilon. A toxina épsilon, que é ativada no intestino pela tripsina e outras proteases, é responsável pelas alterações clínicas e patológicas desta doença.^{11,12,19,21}

Em ovinos a doença é mais frequentemente aguda ou sub-aguda e os órgãos alvo principais da toxina épsilon são o encéfalo e pulmões, onde causa aumento da permeabilidade vascular, levando ao edema. Edema perivascular proteináceo no encéfalo é a lesão característica e diagnóstica da forma aguda e sub-aguda da enterotoxemia em ovinos. A forma crônica da enterotoxemia em ovinos é raramente observada e ela é caracterizada principalmente por encefalomalacia simétrica focal (ESF), a lesão consiste de focos de malacia simétricos e bilaterais afetando principalmente núcleos da base, tálamo e pedúnculos cerebelares.^{1,2,7,8,14,21,22}

Em caprinos, a enterotoxemia do tipo D pode ser aguda, sub-aguda ou crônica. As formas aguda e sub-aguda da doença podem ser similares as formas correspondente em ovinos, embora edema perivascular no encéfalo não é frequentemente observado, e enterocolite ou colite podem também ser observado na forma sub-aguda. Enterotoxemia crônica em caprinos é caracterizado por enterocolite ou colite, sem sinais clínicos ou lesões do encéfalo ou outro sistema. ESF não é descrita em qualquer forma de enterotoxemia em caprinos, nem em nenhuma outra doença nesta espécie animal.

Este trabalho descreve um surto de doença neurológica crônica em caprinos no estado da Paraíba, nordeste brasileiro, e relata o primeiro caso nesta espécie de lesões de ESF em um caprino desse surto.

O surto de doença neurológica ocorreu em uma fazenda no município de Boa Vista, Paraíba, em Abril-Junho (período chuvoso) de 2009. Trinta e quatro de 150 caprinos morreram em um período de 3 meses. A idade dos animais no rebanho variava entre 1 dia e 7 anos. Os animais afetados com 4 a 48 meses de idade eram mestiços das raças Anglonubiano, Saanen e Pardo Alpino.

A maioria dos caprinos tinha sido vacinada contra enterotoxemia do tipo D, três meses antes do começo do surto. Posteriormente foram revacinados mais tarde em

Abril, (depois de acontecer as primeiras mortes), Maio, e Junho (depois da última morte). O rebanho estava pastando em pastagem nativa e suplementado *ad libitum* com concentrado de farelo de milho e trigo. As cabras em lactação também estavam sendo suplementadas *ad libitum* com farelo de soja. O fazendeiro relatou que os caprinos que morreram apresentaram decúbito e outros sinais neurológicos incluindo cegueira por até 2 semanas antes da morte. No ano anterior, 25 caprinos de diferentes idades, tinham morrido após apresentar cólica abdominal e diarreia, após um curso clínico de menos de 24 horas.

Um Caprino, Saanen, macho, com 4 meses de idade, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, na cidade de Patos, estado da Paraíba, Brasil, 24 horas após ter sido encontrado em decúbito.

No exame clínico, este caprino apresentou espasticidade dos 4 membros, opistotono, ausência de resposta ao reflexo de ameaça e cegueira, seguido por marcada depressão e diminuição dos reflexos da deglutição. O animal foi tratado com 10mg/kg de tiamina intramuscular e 0,2 mg/kg de dexametasona intravenoso. Este tratamento foi repetido 12 horas mais tarde, mas o caprino não apresentou melhora clínica e morreu 3 dias depois do início dos sinais.

A necropsia foi realizada logo após a morte. Amostras de intestino delgado, cólon, pré-estômagos, abomaso, linfonodos mesentéricos, adrenal, baço, fígado, coração, pulmão, gânglio trigêmio e hipófise foram fixados em formol a 10% em solução tamponada. O encéfalo e a medula vertebral inteira foram também fixados em formol tamponado a 10% e amostras foram obtidas da medula vertebral cervical, torácica e lombar, medula oblonga, ponte, colículo rostral e caudal, tálamo, núcleos da base, córtex, pedúnculo cerebelar e cerebelo. Todos os tecidos foram embebidos em parafina, cortados entre 4-5 μ m e corados com hematoxilina e eosina.

A carcaça estava em boa condição nutricional. A serosa e a mucosa do cólon estavam levemente vermelhas, e um excesso de fluido claro foi observado no saco pericárdico. Áreas acastanhadas, multifocais e bilaterais de 0,1-1,0cm de diâmetro foram observadas na cápsula interna e tálamo. Outras alterações macroscópicas significativas não foram observadas no resto da carcaça.

Lesões histológicas no encéfalo foram observadas em áreas que apresentavam alterações macroscópicas. Elas consistiam em áreas de malacia, bilaterais e aproximadamente simétricas, caracterizadas por palidez e rarefação do neurópilo (Fig.

1A, B e C) com necrose das células da glia e neurônios (Fig 1D). Tumefação axonal (esferóides) (Fig. 1D) também foram observados. Ocasionalmente, eram observados edema perivascular proteináceo e/ou hemorragia e tumefação das células endoteliais vasculares (Fig.1C). Por vezes poucos neutrófilos também eram observados na lesão necrótica. Congestão dos vasos sanguíneos na mucosa intestinal e pulmão também foram vistos. Outras alterações histológicas significativas não foram observadas nos demais tecidos examinados.

Este trabalho relata um caso de encefalomalacia simétrica focal (ESF) em um caprino. No entanto, o nome ESF é considerado errado porque as lesões são geralmente multifocais.²¹ O nome mais apropriado deveria ser encefalomalacia simétrica multifocal. Em ovinos, ESF é patognomônica da forma crônica da enterotoxemia pelo *C. perfringens* tipo D e a lesão é considerada diagnóstica para a doença. Em caprinos, ESF não tem sido descrita em casos de enterotoxemia ou em qualquer outra doença^{17,20} e este é, no melhor do nosso conhecimento, o primeiro relato de ESF nesta espécie.

A etiologia da ESF no nosso caprino não foi definitivamente determinada, embora se especulasse que tenha sido causada pela toxina épsilon do *C. perfringens* tipo D. Isto por que ESF é considerada lesão patognomônica de enterotoxemia crônica em ovinos. Situação similar ocorreu em bovinos, espécie na qual ESF foi descrita em animais com sinais neurológicos espontâneos^{3,5} mas a associação do *C. perfringens* tipo D e ESF não foi demonstrada em casos espontâneos^{3,5} Recentemente, ESF foi produzida experimentalmente com a infusão do *C. perfringens* tipo D no duodeno de um bezerro,⁶ o que proporciona suporte a hipótese que os casos espontâneos de ESF descritos antes em bovinos eram de fato produzidos pelo *C. perfringens* tipo D.

Infelizmente, não foram realizados exames complementares em amostras deste caprino, incluindo investigação da toxina épsilon pelo *C. perfringens* tipo D do conteúdo intestinal. No entanto, a detecção da toxina épsilon no conteúdo intestinal é considerado diagnóstico nas formas aguda e sub-aguda de enterotoxemia pelo *C. perfringens* tipo D, mas não na forma crônica em ovinos. ESF é uma manifestação da forma crônica da enterotoxemia pelo *C. perfringens* tipo D e a toxina épsilon não é usualmente encontrada no conteúdo intestinal de animais com esta forma da doença.¹³ O diagnóstico de enterotoxemia crônica em ovinos é realizado somente com a observação das alterações macroscópicas e histológicas de ESF, localizadas principalmente na cápsula interna, tálamo, mesencéfalo e/ou pedúnculos cerebelares. Deve ser feito o

diagnóstico diferencial com outras doenças do sistema nervoso, incluindo polioencefalomalacia, listeriose, raiva e toxemia da prenhez, as quais foram todas descartadas com base nos achados histológicos. Além do mais, o isolamento do *C.*

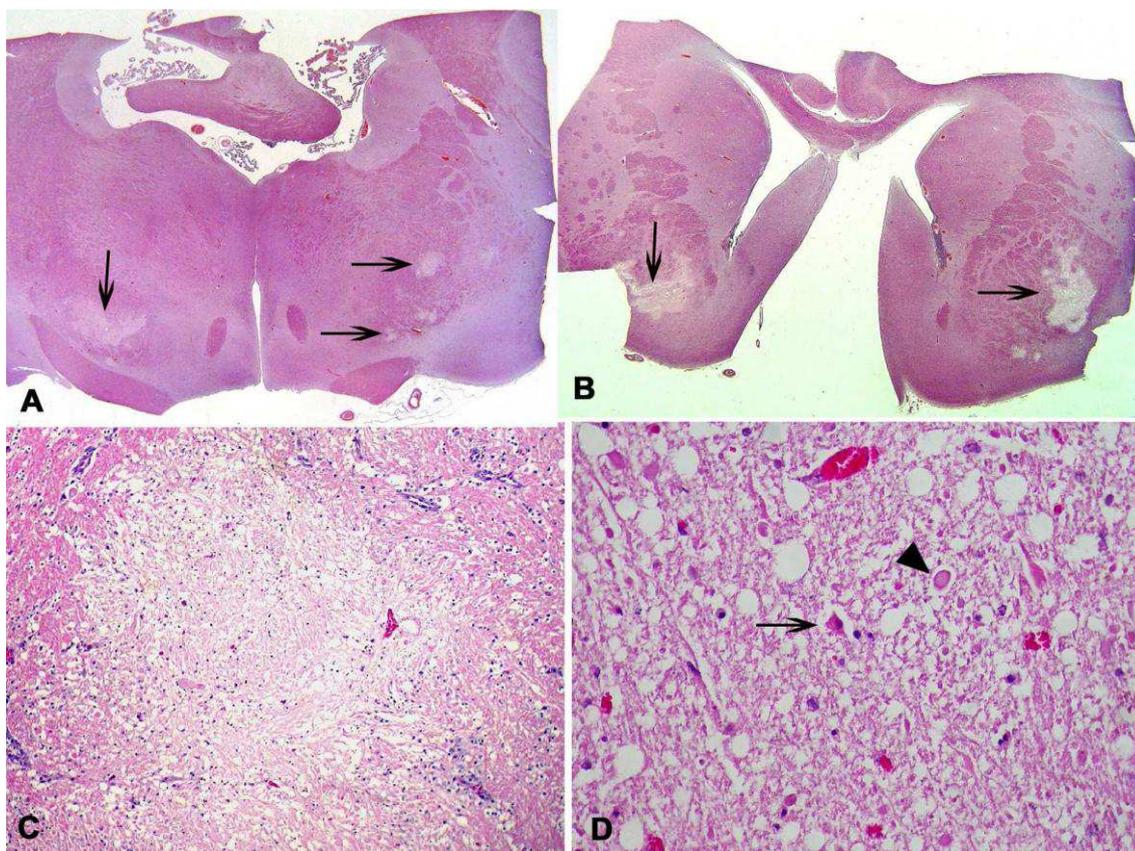


Fig. 1. Caprino. Encefalomalacia simétrica focal. A e B) Fotografia submacroscópica apresentando áreas de malacia no tálamo (A) e cápsula interna (B). C) Área de malacia no tálamo, além disso, apresenta tumefação das células endoteliais dos vasos. D) Maior aumento da lesão mostrado em C, apresentando necrose das células gliais e neurônios (seta). Esferóides axonais (cabeça de seta) também foram observados. Hematoxilina e eosina.

perfringens tipo D do intestino é de pouco ou nenhum valor diagnóstico nos casos de enterotoxemia em qualquer espécie, porque esta bactéria pode ser um habitante normal da flora do trato intestinal de animais saudáveis. Portanto, é provável que nem a detecção da toxina épsilon nem a cultura do *C. perfringens* tivessem ajudado no diagnóstico do caso descrito neste trabalho, mesmo com lesões de ESF produzidas pelo *C. perfringens* tipo D. Outras formas de necrose simétrica focal no encéfalo de outras espécies animais são a necrose simétrica da substância *nigra* e *globus palidus* causada por *Centaurea* spp. em equinos,¹⁷ e necrose simétrica dos núcleos cerebelares e vestibular em suínos intoxicados com *Aeschynomene indica*.¹⁵ Essas intoxicações não tem sido relatadas em caprinos e as plantas mencionadas não estão presente na região onde ocorreu a doença.

No surto descrito aqui, o fazendeiro relatou a morte de outros 30 caprinos com sinais neurológicos similares aos do caprino examinado, sugerindo que os outros animais também foram afetados pela ESF. O motivo no qual alguns ovinos sobrevivem à enterotoxemia e desenvolvem ESF não é completamente entendida. Foi especulado que ESF ocorre em animais com baixas concentrações da toxina épsilon no intestino ou que estão parcialmente imunizados.¹⁷ Baixas concentrações da toxina no intestino podem ocorrer em animais vacinados inadequadamente ou em animais que tenham algum grau de resistência induzido naturalmente por baixas doses de produção da toxina épsilon no intestino. Neste surto o rebanho tinha sido vacinado contra enterotoxemia do tipo D, com uma única dose de uma vacina comercial mista de clostridioses, antes de ocorrer a doença. Adicionalmente, os caprinos foram vacinados novamente depois de começar o surto, 1 mês mais tarde e depois do final do surto, o qual se estendeu por 3 meses. As mortes pararam somente depois da terceira vacinação. É possível que as duas primeiras doses da vacina induziram baixas concentrações de antitoxina no soro, as quais protegeram contra enterotoxemia, mais não contra ESF. No Brasil uma avaliação das vacinas de enterotoxemia tipo D mostrou que somente duas entre seis vacinas comerciais induziram níveis de proteção de anticorpo para toxina épsilon.¹⁰ Além disso, caprinos vacinados com vacinas comerciais tem mais baixos e menos persistentes títulos de antitoxina que os ovinos,¹⁸ pelo que é necessária a revacinação a cada 4 meses.⁴

Outro fator associado com o surto foi o alto nível nutricional devido a boa pastagem durante o período chuvoso, juntamente com a suplementação de grãos ou

subprodutos contendo carboidratos altamente fermentáveis, os quais são fatores de risco bem conhecidos para a ocorrência da enterotoxemia e ESF.^{7,9,13,16,22}

Pesquisas futuras precisam ser feitas para determinar a etiologia e prevalência da ESF nos caprinos do semiárido brasileiro.

Agradecimentos.- O primeiro autor agradece à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

1. Barlow R: 1958, Focal symmetrical encephalomalacia in lambs. *Vet Rec* 70:884.
2. Brown CC, Baker DC, Barker LK: 2007, The alimentary system. *In: Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*, ed. Maxie MG, 5th ed., pp. 1-296. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
3. Buxton D, Macleod NSM, Nicolson TB: 1981, Focal symmetrical encephalomalacia in young cattle. *Vet Rec* 108:459.
4. Colodel EM, Driemeier D, Schmitz M, et al.: 2003, Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. [Caprine enterotoxaemia in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Pesq Vet Bras* 23:173-178. In Portuguese. Abstract in English.
5. Fairley RA: 2005, Lesions in the brains of three cattle resembling the lesions of enterotoxaemia in lambs. *N Z Vet J* 53:356-358.
6. Filho EJJ, Carvalho AU, Assis RA, et al.: 2009, Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Vet Pathol* 46:1213-1220
7. Gay CC, Blood DC, Wilkinson JS: 1975, Clinical observations of sheep with focal symmetrical encephalomalacia. *Aust Vet J* 51:266-269.
8. Hartley WJ: 1956, A focal symmetrical encephalomalacia of lambs. *N Z Vet J* 4:129-135.
9. Hazlett M, Reid S: 2002, Focal symmetrical encephalomalacia in two lambs. *AHL Newsletter* 6:30.
10. Lobato FCF, Moro E, Umehara O, et al.: 2000, Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. [Cattle and rabbits immune response against beta

and epsilon *Clostridium perfringens* toxins induced by six commercial vaccines in Brazil]. Arq Bras Med Vet Zootec 52:313-318. In Portuguese. Abstract in English.

11. McDonel JL: 1980, *Clostridium perfringens* (type A, B, C, D, E). Pharmacol Ther 10:617-655.
12. Niilo L: 1980, *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. Can Vet J 21:141-148.
13. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PT: 2007, Veterinary Medicine, 10th ed., Saunders, Elsevier, Edinburgh.
14. Riet-Correa F: 2007, Enterotoxemia e necrose simétrica focal. In: Doenças de Ruminantes e Eqüinos [Diseases of ruminants and horses], ed. Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ, 3th ed., pp. 288-293. Pallotti, Santa Maria, RS. In Portuguese.
15. Riet-Correa F, Timm CD, Barros SS, Summers BA: 2003, Symmetric focal degeneration in the cerebellar and vestibular nuclei in swine caused by ingestion of *Aeschynomene indica* seeds. Vet Pathol 40:311-316.
16. Sattler N, Fecteau G, Desnoyers M, et al.: 1998, Focal symmetrical encephalomalacia in a 6-month-old dorset sheep. Can Vet J 39:434-437.
17. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A: 1995, Veterinary neuropathology. Mosby Year Book, St. Louis, MO.
18. Uzal FA, Boderó DAV, Kelly WR, Nielsen K: 1998, Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. Vet Rec 143:472-474.
19. Uzal FA, Kelly WR: 1997, Effects of the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. J Comp Path 116:63-71.
20. Uzal FA, Porcel JO, Arenas JMC: 2008, Enterotoxemia ovina y caprina. [Enterotoxemia in sheep and goat]. Cuadernos de campo. IVOMECA, 157p. In Spanish.
21. Uzal FA, Songer JG: 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J Vet Diagn Invest 20:253-265.
22. Zachary JF: 2007, Nervous system. In: Pathologic basis of veterinary disease, ed. McGavin MD, Zachary JF, 4th ed., pp.833-972, Mosby Elsevier, St Louis

CAPITULO III

ENCEFALOMALACIA SIMÉTRICA FOCAL EM OVINO

(Enviado a revista: Pesquisa Veterinária Brasileira)

Encefalomalacia simétrica focal em ovino¹

Luciano A. Pimentel², Diego M. Oliveira², Glauco J.N. Galiza², Antônio F.M. Dantas²
and Franklin Riet-Correa^{2*}

ABSTRACT.- Pimentel L.A., Oliveira D.M., Galiza G.J.N., Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2010. [**Focal symmetrical encephalomalacia in sheep.**] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, CSTR, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brazil. E-mail: franklin.riet@pq.cnpq.br

Focal symmetrical encephalomalacia (FSE) is the most prominent lesion seen in the subacute or chronic forms of enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type D. This paper reports FSE in sheep in the state of Paraíba in the Brazilian semiarid. In an outbreak, six deaths occurred in a flock of 70 4-30 month-old Santa Inês sheep, grazing in a paddock of irrigated sprouting *Cynodon dactylon* (Tifton grass), and supplemented, *ad libitum*, with a concentrate of soybean, corn and wheat. Nervous signs included blindness and recumbence. A 19 month-old sheep was examined clinically and necropsied after a clinical course of three days. Gross lesions were herniation of the cerebellar vermis and multifocal, bilateral, symmetric brownish areas in the internal capsule, thalamus and cerebellar peduncles. Histologic lesions were multifocal, bilateral malacia with some neutrophils, swelling of blood vessels endothelium, perivascular edema, and hemorrhages. The flock was vaccinated, before the outbreak, with only one dose of *Clostridium perfringens* type D vaccine. Two factors are suggested to be important for the occurrence of the disease: insufficient immunity due to the incorrect vaccination; and high nutritional levels by the supplementation with highly fermentable carbohydrates.

INDEX TERMS: *Clostridium perfringens* tipo D, epsilon toxin, enterotoxemia, malacia.

¹ Received on December 12. 17, 2009.

Accepted for publication on

² Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-000 Patos, PB, Brazil. *Corresponding author: franklin.riet@pq.cnpq.br

RESUMO.- [Encefalomalacia focal simétrica em ovino]. Encefalomalacia focal simétrica (EFS) é a lesão mais proeminente vista nas formas subaguda ou crônica da enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D. Este trabalho relata EFS em ovinos no semiárido do estado da Paraíba. Seis ovinos morreram, dentro de um rebanho de 70 animais, da raça Santa Inês, entre 4-30 meses de idade, que pastavam em piquete de *Cynodon dactylon* (capim Tifton), que estava rebrotando. Os ovinos eram suplementados com um concentrado de soja, trigo e milho. Os sinais nervosos incluíam cegueira e decúbito lateral. Um ovino de 19 meses de idade foi examinado clinicamente e necropsiado, depois de um curso clínico de 3 dias. Macroscopicamente foram observadas herniação do cerebelo e áreas acastanhadas, multifocais, simétricas e bilaterais na cápsula interna, tálamo e pedúnculo cerebelar. Histologicamente observou-se malacia, bilateral e simétrica, com alguns neutrófilos, tumefação das células endoteliais dos vasos sanguíneos, edema perivascular e hemorragia. O rebanho foi vacinado, antes do surto, com uma única dose de vacina para *Clostridium perfringens* tipo D. Dois fatores são sugestivos quanto a importância da ocorrência da enfermidade: imunidade insuficiente devida à vacinação incorreta; e altos níveis nutricionais da suplementação com carboidratos altamente fermentáveis.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Clostridium perfringens* tipo D, toxina épsilon, enterotoxemia, malacia.

INTRODUÇÃO

Enterotoxemia é uma doença frequente em ovinos e caprinos causado pelo *Clostridium perfringens* tipo D (McDonel 1980, Niilo 1980, Uzal & Songer 2008) esta bactéria é encontrada no habitat normal do intestino em um pequeno número de animais sadios (McDonel 1980, Niilo 1980). Alterações no ambiente intestinal, causadas por alterações repentinas da dieta, principalmente pela ingestão de carboidratos altamente fermentáveis, estão associadas com a proliferação do *C. perfringens* tipo D e a produção da protoxina épsilon, a qual é ativada no intestino pela tripsina e outras proteases. A toxina épsilon é responsável pelas alterações clínicas e patológica desta doença (McDonel 1980, Niilo 1980, Uzal & Kelly 1997, Uzal & Songer 2008).

A doença nos ovinos na maioria das vezes se apresenta na forma aguda e os efeitos da toxina causam edema perivascular proteináceo no encéfalo. Em caprinos a doença pode ser aguda, sub-aguda ou crônica. As formas sub-aguda e crônica causam

principalmente lesões intestinal (Uzal & Songer 2008, Uzal et al. 2008) mas podem ocasionalmente apresentar lesões no encéfalo (Uzal & Kelly 1997, Uzal et al. 1997, Colodel et al. 2003).

Encefalomalacia simétrica focal (ESF) é uma forma esporádica da enterotoxemia sub-aguda ou crônica que afeta ovinos, principalmente cordeiros e menos frequentemente ovinos adultos, causando lesões simétricas de malacia afetando principalmente a cápsula interna, mesencéfalo, tálamo e pedúnculos cerebelares (Hartley 1956, Gay et al. 1975, Brown et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007, Zachary 2007, Uzal & Songer 2008). A doença também é reportada em bovinos com lesões similares a dos ovinos (Buxton et al. 1981). Recentemente foi demonstrado que nesta espécie a ESF e, também, uma forma sub-aguda da enterotoxemia do tipo D (Facury Filho et al. 2009). ESF foi relatado recentemente pela primeira vez em caprinos (Oliveira et al. 2010).

ESF em ovinos ocorre em diferentes regiões do mundo (Hartley 1956, Barlow 1958, Niilo 1980, Brown et al. 2007). No Brasil a doença é relatada no Rio Grande do Sul (Riet-Correa 2007), Paraíba (Guedes et al. 2007) e Brasília (Castro 2008), mas a descrição detalhada dos surtos não é relatada. Este trabalho visa relatar um surto de ESF em ovino no estado da Paraíba, nordeste brasileiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um ovino afetado foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, na cidade de Patos, estado da Paraíba. O animal foi clinicamente examinado e necropsiado após morte espontânea. Amostras de intestino, pré-estômago, abomaso, linfonodos mesentéricos, adrenal, baço, fígado, coração, pulmão, gânglio trigêmio e hipófise foram fixados em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina e cortadas em seções de 4-8 μ m. O encéfalo completo e a medula espinhal também foram fixadas em formol tamponado a 10% e cortes transversais da medula espinhal cervical, torácica e lombar, medula oblonga, ponte, colículos rostrais e caudal, tálamo, núcleos da base, córtex, pedúnculos cerebelares e cerebelo foram examinados histologicamente. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. Seções selecionadas do SNC foram corados com PAS e luxol fast blue. Esfregaços da mucosa intestinal fixada em formol do ovino afetado e com o ovino controle foram corados com coloração de Gram para a observação das bactérias semelhantes a *Clostridium*.

RESULTADOS

O surto ocorreu em maio de 2008, durante o período chuvoso em uma fazenda do município de São Domingos, estado da Paraíba, com um rebanho de 70 ovinos da raça Santa Inês, com 4 a 30 meses de idade. O rebanho pastava em pasto nativo durante a maioria do dia, mais durante uma hora por dia tinham acesso a uma área de uma hectare, irrigada, de *Cynodon dactylon* (capim Tifton) que estava rebrotando, depois de ter sido cortado duas semanas antes de ocorrer a doença. O rebanho era suplementado, no final do dia, *ad libitum*, com ração concentrada que incluía farelo de soja, milho e trigo. O fazendeiro informou que cinco ovinos, com 19 a 30 meses de idade, apresentaram diarreia e após 1-2 dias foram encontrados mortos. Os ovinos tinham chegado recentemente na fazenda e foram vacinados, 15 dias antes do surto, contra enterotoxemia tipo D com uma vacina comercial.

Um ovino com 19 meses de idade foi encaminhado ao Hospital Veterinário depois de passar um dia na fazenda apresentando marcha descoordenada e dificuldade para se levantar, seguido de diarreia e decúbito lateral. No exame clínico realizado no Hospital Veterinário apresentou 2 movimentos ruminais em 5 minutos, frequência cardíaca de 160 por minuto, 24 movimentos respiratórios por minuto e temperatura retal de 39,9°C. Outros sinais clínicos foram apatia, mucosas congestionadas, decúbito lateral, nistagmo, estrabismo, decréscimo nos reflexos de ameaça e pupilar, gemidos, decréscimo na sensibilidade da face e movimentos de pedalagem. No dia seguinte também apresentou decréscimo do tônus da língua, trismo mandibular e decréscimo no reflexo anal. O ovino morreu após um curso clínico de 3 dias. O animal foi tratado sem sucesso com 10 mg/kg de tiamina, intramuscular, e 0,2 mg/kg de dexametasona, intravenoso, com 12 horas de intervalo durante 2 dias.

Na necropsia o ovino estava em boa condição corporal. O verme cerebelar apresentava herniação através do forame magno (Fig.1A e B). Áreas amarronzadas, multifocais, bilaterais, com 0,1-1,0cm de diâmetro foram observadas na cápsula interna, tálamo, e pedúnculos cerebelares (Fig.1C e D). Cavidades pequenas, amolecimento do tecido com aspecto gelatinoso e, ocasionalmente, múltiplos pontos vermelho também eram observado nestas áreas.

No exame histológico as lesões do encéfalo consistiram de áreas de malacia multifocal, simétricas e bilaterais, caracterizadas com palidez e rarefação do neurópilo

com necrose das células da glia (Fig.2A) e neurônios e esferóides axonais. Ocasionalmente, edema perivascular proteináceo ou hemorragias foram observados, assim como tumefação do endotélio vascular (Fig.2B). Outras lesões foram congestão do pulmão e cilindros hialinos nos rins. Não foram observadas lesões significativas em outros órgãos. Não foi observado número significativo de bactérias semelhantes à *Clostridium* nos esfregaços da mucosa intestinal.

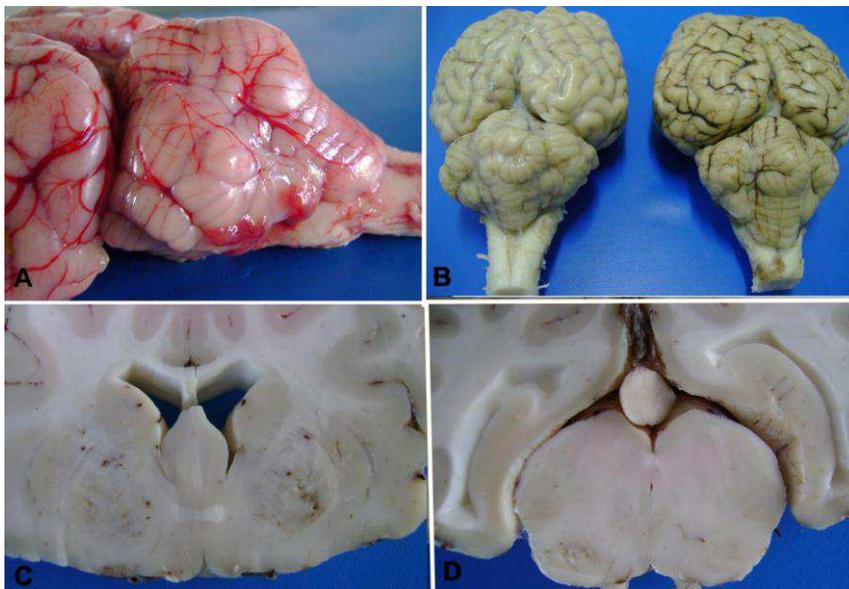


Fig.1. Encefalomalacia simétrica focal em ovino. (A) Herniação cerebelar. (B) Cerebelo com herniação cerebelar (esquerda) comparado com o cerebelo do ovino controle (direito). (C) Cápsula interna e (D) colículo rostral com malacia simétrica focal.

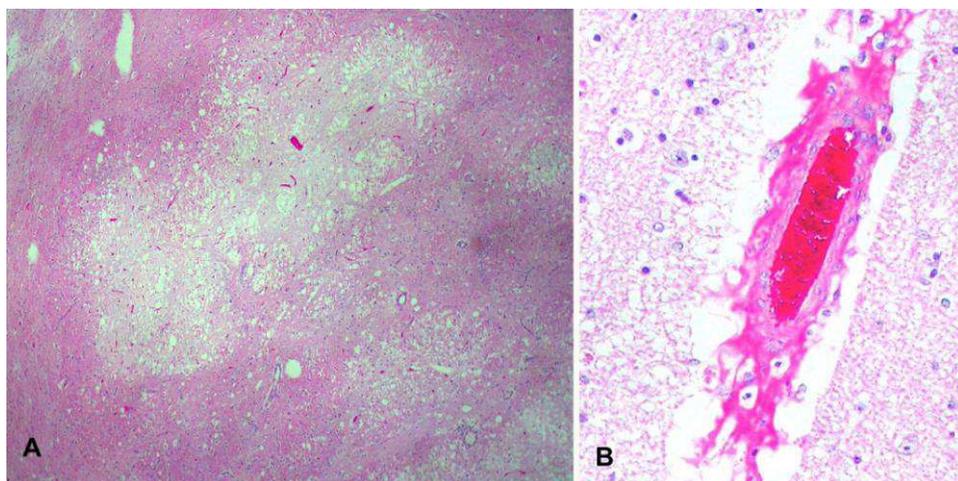


Fig.2. Encefalomalacia simétrica focal em ovino. (A) Áreas multifocais de necrose são observadas na cápsula interna. HE, obj.10x. (B) Edema perivascular no tálamo HE, obj.20x.

DISCUSSÃO

Este trabalho relata aspectos clínicos e epidemiológicos e patologia da encefalomalacia simétrica focal em ovinos no Brasil. A doença foi diagnosticada baseada nas lesões do sistema nervoso central, que são consideradas patognomônica (Hartley 1956, Gay et al. 1975, Buxton & Morgan 1976, Uzal & Songer 2008). ESF é uma lesão sub-aguda a crônica, pelo que a toxina épsilon não é normalmente encontrada no intestino (Radostits et al. 2007). A doença foi ocasionalmente relatada em diferentes países (Hartley 1956, Barlow 1958, Gay et al 1975, Sattler et al. 1998, Hazlett & Reid 2002). No semiárido brasileiro, enterotoxemia e ESF são doenças raramente reportadas. Entre janeiro de 2000 e agosto de 2009 o Hospital Veterinário de Patos diagnosticou um surto de enterotoxemia e dois de ESF, de um total de 414 diagnósticos de diferentes doenças em ovinos.

O proprietário dos ovinos do presente relato mencionou a ocorrência de quatro outros ovinos afetados, os quais foram observados com diarreia e achados mortos no dia seguinte. É difícil saber se estes casos eram devido a enterotoxemia, ESF ou outras doenças. ESF têm sido associada com baixas concentrações da toxina épsilon no intestino ou com imunização parcial dos ovinos (Summers et al. 1995). Concentrações baixas da toxina no intestino podem ocorrer em animais inadequadamente vacinados ou em animais com certo grau de resistência induzida naturalmente com baixas doses de toxina produzida no intestino. No surto reportado aqui o rebanho tinha sido vacinado contra enterotoxemia do tipo D, com uma única dose da vacina clostridial mista, antes da ocorrência da doença. É possível que a vacinação induzisse baixas concentrações de antitoxina no soro, as quais protegeram contra enterotoxemia, mas não contra ESF. No Brasil uma avaliação das vacinas de enterotoxemia tipo D mostrou que somente duas entre seis vacinas comerciais induziram níveis de proteção de anticorpo para as toxinas épsilon e beta em coelhos e bezerros (Lobato et al. 2000).

Outro fator associado com o surto foi o alto nível nutricional devido a boa pastagem durante o período chuvoso, juntamente com a suplementação de grãos ou subprodutos contendo carboidratos altamente fermentáveis, os quais são fatores de risco bem conhecidos para a ocorrência da enterotoxemia e ESF (Gay et al. 1975, Sattler et al. 1998, Hazlett & Reid 2002, Radostits et al. 2007, Zachary 2007).

A literatura é por vezes confusa quanto a definição de ESF e enterotoxemia causado por *C. perfringens* tipo D. Em ovinos ESF foi reportada antes da demonstração

que ela é causada pela toxina épsilon (Hartley 1956, Barlow 1958). Depois da demonstração que a doença é causada pela toxina épsilon, deve ser ressaltado que ESF e enterotoxemia são a mesma doença, com curso clínico variando de poucas horas (aguda) a uma semana (sub-agudo) ou mais (crônico). As lesões no encéfalo podem também variar, de um edema perivascular proteináceo nas primeiras 24 horas (enterotoxemia) a áreas de malacia com infiltrado de células gitter e cavitação depois de uma semana (ESF). Em consequência é difícil determinar se um determinado caso é enterotoxemia ou ESF, pois, além disso, ambos são devidas à produção da toxina épsilon no intestino com a proliferação do *C. perfringens* tipo D. ESF causa manifestação clínica por um período de 1-14 dias com a maioria dos casos sobrevivendo de 5 a 7 dias (Gay et al. 1975, Radostits et al. 2007). No caso relatado neste trabalho o período da manifestação clínica foi de aproximadamente três dias, caracterizando uma forma sub-aguda da doença. Apesar de se tratar da mesma doença, parece conveniente manter o termo ESF nos casos sub-agudo ou crônicos de enterotoxemia, pois as técnicas de diagnóstico e o diagnóstico diferencial são diferentes. Enterotoxemia tem que ser diagnosticada com a presença da toxina épsilon no intestino, o edema perivascular cerebral é a principal lesão, e a presença de grande quantidade de bacilos no esfregaço do intestino e glicosuria é também sugestivo da doença. No caso de ESF descrito neste trabalho, o diagnóstico foi feito pela observação de lesões macroscópicas e histológicas de encefalomalacia simétrica focal localizadas principalmente na cápsula interna, tálamo, mesencéfalo e pedúnculos cerebelares. É importante o diagnóstico diferencial com outras doenças do sistema nervoso de ovinos, incluindo polioencefalomalacia, listeriose, raiva e toxemia da prenhez. Além disso, enterotoxemia é uma doença principalmente de cordeiros e ESF pode afetar ovinos de diferentes idades, como observado no surto reportado aqui. A herniação do cerebelo, observado no ovino, foi descrito como uma lesão característica de enterotoxemia e ESF em ovino (Buxton & Morgan 1976, Uzal & Songer 2008, Uzal et al. 2008) e também foi observada experimentalmente em ratos (Fernandez-Miyakawa et al. 2007).

Após o diagnóstico de ESF ou enterotoxemia do tipo D o rebanho deve ser vacinado imediatamente e medidas nutricionais têm que ser adotado até que se estabeleça uma boa imunidade. Para a profilaxia da doença, cordeiros nascidos de ovelhas não vacinadas tem que ser vacinados aos 1-2 meses de idade, e cordeiros nascido de ovelhas vacinadas devem ser vacinados aos 2-3 meses de idade. Em ovelhas

as revacinações devem ser realizadas três meses antes do parto (Radostits et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007, Uzal et al. 2008).

Agradecimentos.- O primeiro autor agradece ao CNPQ (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

- Barlow R. 1958. Focal symmetrical encephalomalacia in lambs. Vet. Rec. 70:884.
- Brown C.C., Baker D.C. & Barker L.K. 2007. The alimentary system, p.1-296. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Buxton D., Macleod N.S.M. & Nicolson T.B. 1981. Focal symmetrical encephalomalacia in young cattle. Vet. Rec. 108:459.
- Buxton D. & Morgan K.T. 1976. Studies of lesions produced in the brains of colostrum deprived lambs by *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) type D toxin. J. Comp. Pathol. 86:435-447.
- Castro M. B. 2008. Personal communication (School of Veterinary Medicine, University of Brasília).
- Colodel E.M., Driemeier D., Schmitz M., Germer M., Nascimento R.A.P., Assis R.A., Lobato F.C.F. & Uzal F.A. 2003. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 23:173-178.
- Fernandez-Miyakawa M.E., Sayeed S., Fisher D.J., Poon R., Adams V., Rood J.I., McClane B.A., Saputo J. & Uzal F.A. 2007. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D. Infect. Immun. 75:4282-4288.
- Facury Filho E.J., 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.
- Gay C.C., Blood D.C. & Wilkinson J.S. 1975. Clinical observations of sheep with focal symmetrical encephalomalacia. Aust. Vet. J. 51:266-269.

- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Miranda Neto E.G., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Brás.* 27:29-38.
- Hartley W.J. 1956. A focal symmetrical encephalomalacia of lambs. *N. Z. Vet. J.* 4:129-135.
- Hazlett M. & Reid S. 2002. Focal symmetrical encephalomalacia in two lambs. *AHL Newsletter* 6:30.
- Lobato F.C.F., Moro E., Umehara O., Assis R.A., Martins N.E. & Gonçalves L.C.B. 2000. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52:313-318.
- McDonel J.L. 1980. *Clostridium perfringens* (type A, B, C, D, E). *Pharmacol. Ther.* 10:617-655.
- Oliveira D.M., Pimentel L.A., Pessoa A.F., Dantas A.F.M., Uzal F. & Riet-Correa F. 2010. Focal symmetrical encephalomalacia in goats in the Brazilian semiarid region. *J. Vet. Diag. Invest.* (Submitted)
- Niilo L. 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. *Can. Vet. J.* 21:141-148.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.* 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Riet-Correa F. 2007. Enterotoxemia e necrose simétrica focal, p.288-293. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equinos.* Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Sattler N., Fecteau G., Desnoyers M., Quesnel A. & Chénier S. 1998. Focal symmetric encephalomalacia in a 6-month-old dorset sheep. *Can. Vet. J.* 39:434-437.
- Summers B.A., Cummings J.F. & de Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology.* Mosby, St Louis, p.258-161.
- Uzal F.A., Glastonbury J.R.W., Kelly W.R. & Thomas R. 1997. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. *Vet. Rec.* 141:224-226.
- Uzal F.A. & Kelly W.R. 1997. Effects of the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. *J. Comp. Pathol.* 116:63-71.

- Uzal F.A. Porcel J.O.M. & Arenas J.M.C. 2008. Enterotoxemia ovina y caprina. Cuadernos de Campo, IVOMECA. 157p.
- Uzal F.A. & Songer J.G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J. Vet. Diagn. Invest. 20:253–265.
- Zachary J.F. 2007. Nervous System, p.833-971. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.

CONCLUSÕES

- A paratuberculose provocada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, ocorre no semiárido brasileiro em caprinos e ovinos e são necessários estudos para determinar a sua distribuição geográfica, frequência e importância econômica, assim como formas adequadas de controle e profilaxia.
- A encefalomalacia simétrica focal afeta ovinos na região semiárida e a doença deve ser considerada no diagnóstico diferencial das doenças do sistema nervoso desta espécie.
- Em caprinos ocorrem lesões de necrose simétrica focal, semelhantes às observadas nas formas subagudas e crônicas da enterotoxemia em ovinos, que provavelmente sejam causadas, também, pela toxina épsilon em animais com imunidade parcial.
- É necessário estudar a epidemiologia da encefalomalacia simétrica focal em caprinos e ovinos no semiárido.

ANEXOS

CAPITULO II

FOCAL SYMMETRICAL ENCEPHALOMALACIA IN A GOAT

(Enviado à Journal of Veterinary Diagnostic Investigation)

Focal symmetrical encephalomalacia in a goat

Diego M. Oliveira, Luciano A. Pimentel, André F. Pessoa, Antônio F.M. Dantas,
Francisco Uzal and Franklin Riet-Correa

Corresponding author: Franklin Riet-Correa. Veterinary Hospital, Federal University of
Campina Grande, Campus de Patos, Patos, Paraíba, CEP 58700-000.

franklin.riet@pq.cnpq.br

FOCAL SYMMETRICAL ENCEPHALOMALACIA IN A GOAT

Diego M. Oliveira⁶, Luciano A. Pimentel, André F. Pessoa, Antônio F.M. Dantas,
Francisco Uzal and Franklin Riet-Correa⁷

Abstract. Focal symmetrical encephalomalacia (FSE) is the most prominent lesion seen in the chronic form of enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type D in sheep. This lesion however, has not been reported in goats, associated to type D enterotoxemia or any other condition. This paper reports a case of FSE in a goat of the state of Paraíba in the Brazilian semiarid region. Thirty, 4-48 months old animals of a flock of 150 goats died after showing nervous signs including blindness and recumbence, for periods variable between of 1 and 14 days, as reported by the farmer. The flock was grazing native pastures and it was supplemented with wheat and corn bran. Additionally, lactating goats were supplemented with soybeans. A 4 month old goat with nervous signs was examined clinically and necropsied 3 days after the onset of clinical signs. Bilateral, focal symmetrical areas of brown discoloration were observed in the internal capsule and thalamus. Histologic lesions consisted of multifocal, bilateral malacia with a few neutrophils, endothelial swelling of blood vessels, perivascular edema, and hemorrhages. The etiology of these lesions was not determined. However, FSE is considered pathognomonic for *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia and it is speculated that this microorganism was the etiologic agent in this case. This animal had been vaccinated against type D enterotoxemia only once, approximately 3 months before the beginning of the outbreak. Insufficient immunity due to the incorrect vaccination protocol and/or low efficacy of the vaccine used; and feeding large amounts of highly fermentable carbohydrates were considered to be predisposing factors for this outbreak.

Key words: *Clostridium perfringens* type D, epsilon toxin, enterotoxemia, malacia.

⁶ From Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 58700-000. Brazil (DMO, LAP, AFP, AFMD, FRC), and California Animal Health and Food Safety, School of Veterinary Medicine University of California, Davis 105 W Central Ave, San Bernardino, CA 92408, USA (FU).

⁷ Corresponding author: Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 58700-000. Brazil. franklin.riet@pq.cnpq.br

Enterotoxemia is a frequent disease of sheep and goats caused by *Clostridium perfringens* type D^{11,12,21} a bacterium that can be found as a normal inhabitant of the intestine in a small number of healthy animals.^{11,12} Alterations in the intestinal environment caused by sudden changes in diet, mainly consisting of ingestion of highly fermentable carbohydrates are associated with proliferation of *C. perfringens* type D and production of an epsilon protoxin, which is then activated by intestinal trypsin and other proteases. Epsilon toxin is responsible for the clinical and pathologic findings of the disease.^{11,12,19,21}

In sheep the disease is most frequently acute or sub-acute and the main target organs of epsilon toxin are the lungs and brain where it causes increased vascular permeability leading to edema. Perivascular proteinaceous edema of the brain is a characteristic and diagnostic lesion of the acute and sub-acute forms of sheep enterotoxemia. The chronic form of enterotoxemia in sheep is rarely observed and is mainly characterized by focal symmetric encephalomalacia (FSE), a lesion consisting of bilateral and roughly symmetrical foci of malacia affecting mainly the corpus striatum, thalamus, and cerebellar peduncles.^{1,2,7,8,14,21,22}

In goats, type D enterotoxemia can be acute, subacute or chronic. The acute and sub-acute forms of the disease can be similar to the corresponding forms in sheep, although perivascular edema of the brain is not as frequently observed, and enterocolitis or colitis can be also observed in the sub-acute form. Chronic enterotoxemia in goats is characterized by enterocolitis or colitis without brain or other systemic clinical signs or lesions. FSE has not been described in any form of caprine enterotoxemia, nor it has been described associated to any other disease in this animal species.

This paper describes an outbreak of chronic neurological disease in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil, and reports for the first time in this species lesions of FSE in one goat originating from that outbreak.

An outbreak of neurological disease occurred in a farm of the Municipality of Boa Vista, Paraíba, in April-June (considered to be the rainy season), 2009. Thirty four out of 150 goats died in a period of 3 months. The age of the animals in the flock varied between one day and seven years. Affected animals were 4 to 48 months old Nubian, Saanen and American Alpina cross breeds. Most goats had been vaccinated against type D enterotoxemia three months before the beginning of the outbreak. Boosters were applied later in April (after the first deaths occurred), May, and June (after the last death

occurred). The flock was grazing a native pasture and supplemented *ad libitum* with a concentrate of wheat and corn bran. Lactating goats were also supplemented *ad libitum* with soybeans. The farmer reported that the goats that died in the farm showed recumbence and other neurological signs including blindness for up to two weeks before death. In the previous year, 25 goats of different ages died with signs of abdominal pain and diarrhea after a clinical manifestation period of less than 24 hours.

A 4-month-old, male Saanen goat that had been recumbent for 24 hours was submitted to the Veterinary Hospital at the Federal University of Campina Grande, in the city of Patos, state of Paraíba, Brazil. On clinical examination, this goat showed rigidity of the four legs, opisthotonos, absence of menace reflex and blindness, followed by marked depression and decreased swallowing reflex. The animal was treated with 10 mg/kg of intramuscular thiamine and 0.2 mg/kg of intravenous dexamethasone. This treatment was repeated 12 hours later, but the goat did not show clinical improvement and died 3 days after onset of clinical disease.

A necropsy was performed soon after death. Samples of small intestine, colon, fore stomachs, abomasum, mesenteric lymph nodes, adrenal, spleen, liver, heart, lung, trigeminal ganglion and pituitary gland were fixed in buffered 10% formalin. The whole brain and spinal cord were also fixed in 10% buffered formalin and sub-samples were obtained from the cervical, thoracic and lumbar spinal cord, medulla oblongata, pons, rostral and caudal colliculi, thalamus, corpus striatum, cortex, cerebellar peduncles and cerebellum. All tissues were embedded in paraffin, cut into 4-5 μm sections and stained with hematoxylin and eosin.

The carcass was in good nutritional condition. The serosa and mucosa of the colon were slightly red, and an excess of clear pericardial fluid was observed in the pericardial sac. Multifocal, bilateral, brownish areas of ~ 0.1-1.0 cm diameter were observed in the internal capsule and thalamus. No other significant gross abnormalities were observed in the rest of the carcass.

Histologic lesions in the brain were observed in areas where gross abnormalities were present. They consisted of roughly symmetrical, bilateral, multifocal areas of malacia characterized by pallor and rarefaction of the neuropil (Fig. 1A, B and C) with necrosis of glial cells and neurons (Fig. 1D). Axonal swellings (spheroids) (Fig. 1D) were also observed. Occasionally, perivascular proteinaceous edema and/or hemorrhages were observed, and the vascular endothelial cells were hypertrophic

(Fig.1C). Occasionally few neutrophils were also observed within the necrotic lesion. Congestion of blood vessels in the intestinal mucosa and lung was also observed. No other significant histological abnormalities were observed in any of the tissues examined.

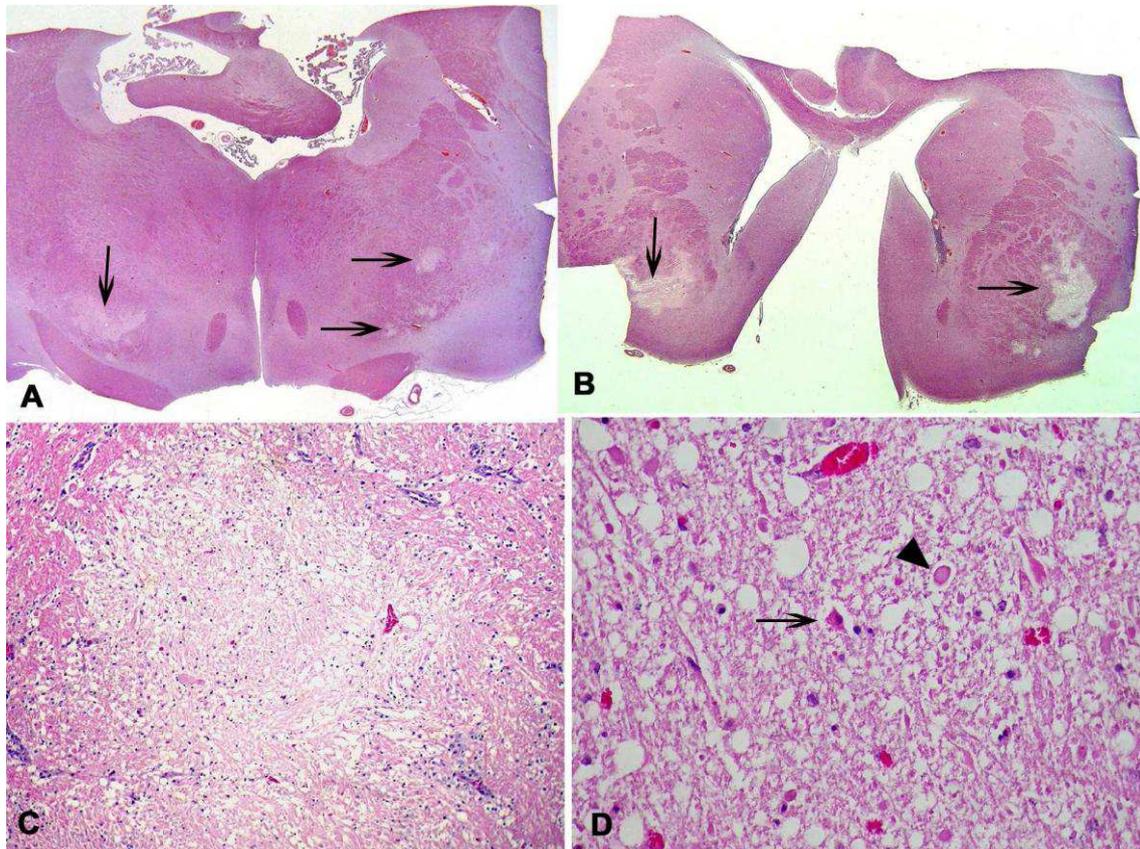


Fig. 1. Goat. Multifocal symmetric encephalomalacia. A and B) Submacroscopic photograph showing areas of malacia in the thalamus (A) and internal capsule (B). C) Area of malacia in the thalamus showing also hypertrophy of vascular endothelial cells in the blood vessels around the lesion. D) Enlargement of the lesion displayed in C, showing necrosis of the plexiform layer, glial cells and neurons (arrow). Axonal spheroids are also observed (arrowhead). Hematoxylin and eosin.

This paper reports a case of the so called, focal symmetric encephalomalacia (FSE) in a goat. However, FSE is considered to be a misnomer as the lesions are generally multifocal.²¹ A more appropriate name should be multifocal symmetrical encephalomalacia. In sheep, FSE is pathognomonic for the chronic form of *C. perfringens* type D enterotoxemia and this lesion is considered diagnostic for the disease. In goats, however, FSE has not been described before in cases of enterotoxemia or any other disease^{17,20} and this is, to the best of our knowledge the first report of FSE in this species.

The etiology of FSE in our goat was not determined, although it is speculated that it was produced by epsilon toxin of *C. perfringens* type D, because FSE is considered a pathognomonic lesion of chronic *C. perfringens* type D enterotoxemia in sheep. A similar situation occurs in cattle, a species in which natural FSE has been described in animals with neurological signs^{3,5} but for which a definitive causal association between this *C. perfringens* type D and FSE has not been demonstrated.^{3,5} However, natural FSE in cattle has long been suspected to be produced by *C. perfringens* type D. Recently, FSE was experimentally produced by infusion of *C. perfringens* type D in the duodenum of one calf,⁶ which lends support to the hypothesis that the natural cases of FSE described before in cattle were indeed produced by *C. perfringens* type D.

Unfortunately, no ancillary tests were performed on samples from this goat, including investigation of epsilon toxin *C. perfringens* type D in the intestinal content. However, detection of epsilon toxin in intestinal content is considered diagnostic for type D enterotoxemia in the acute and sub-acute, but not in chronic form of the disease in sheep. FSE is a manifestation of the chronic form of type D enterotoxemia and epsilon toxin is usually not found in intestinal contents of animals with this form of the disease.¹³ A diagnosis of chronic enterotoxemia in sheep is done only by the observation of gross and histologic manifestations of FSE located mainly in the internal capsule, thalamus, mesencephalon and/or cerebellar peduncles. The diagnosis is further confirmed by ruling out other disease of the nervous system, including polioencephalomalacia, listeriosis, rabies and pregnancy toxemia, all of which were ruled out here based on the histological findings. Furthermore, isolation of *C. perfringens* type D from the intestine is of little, if any, diagnostic value for cases of enterotoxemia in any species because this microorganism can be a normal inhabitant of

the intestinal tract in normal animals. Therefore, it is likely that neither epsilon toxin detection nor *C. perfringens* culture would have been of much diagnostic help in the case presented here, even if the FSE lesions were produced by *C. perfringens* type D. Other causes of symmetric focal necrosis in the brain in other animal species are nigropallidal encephalomalacia caused by *Centaurea* spp. in horses,¹⁷ and symmetrical necrosis of cerebellar and vestibular nuclei in pigs intoxicated by *Aeschynomene indica*.¹⁵ These poisonings had not been reported in goats and those plants were not present in the region where the disease occurred. Symmetric lesions are also observed in the spinal cord and few brain stem nuclei in poliomyelomalacia induced by selenium toxicosis in pigs, which is also non reported in ruminants.¹⁷

In the outbreak reported here the farmer reported the death of other 30 goats with neurological signs similar to those observed in the goat, suggesting that those animals were also suffering from FSE. The reason why some sheep survive long enough to develop the chronic form of enterotoxemia and FSE is not fully understood. It has been speculated that FSE occurs in animals in which there are low concentrations of epsilon toxin in the gut or that are partially immunized.¹⁷ Low toxin concentrations in the intestine can occur in animals improperly vaccinated or in animals that have some degree of resistance induced naturally by low doses of epsilon toxin production in the intestine. In this outbreak the flock had been vaccinated against type D enterotoxemia, with only one dose of a commercial mixed clostridial vaccine, before the occurrence of the disease. In addition, the goats were vaccinated again after the onset of the outbreak, one month later, and after the end of the outbreak, which extended for three months. The deaths only stopped after the third vaccination. It is possible that the first two doses of vaccine induced low antitoxin serum concentration, which protected against enterotoxemia but not against FSE. In Brazil an evaluation of type D enterotoxemia vaccines showed that only two out of six commercial vaccines induced protecting levels of antibodies to epsilon toxin.¹⁰ Also goats vaccinated with commercial vaccines have lower and less persistent titers of antitoxin than sheep¹⁸ and should be re-vaccinated every four months.⁴

Another factor associated with the outbreak was the high nutritional levels due to the good pastures during the rainy period together with supplementation with grains or their by products containing highly fermentable carbohydrates, which are well known risk factors for the occurrence of enterotoxemia and FSE.^{7,9,13,16,22}

Future research should be done to determine the etiology and prevalence of FSE in goats in the Brazilian semiarid.

Acknowledgments.- To CAPES for the scholarship given to the first author.

REFERENCES

23. Barlow R: 1958, Focal symmetrical encephalomalacia in lambs. *Vet Rec* 70:884.
24. Brown CC, Baker DC, Barker LK: 2007, The alimentary system. *In: Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*, ed. Maxie MG, 5th ed., pp. 1-296. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
25. Buxton D, Macleod NSM, Nicolson TB: 1981, Focal symmetrical encephalomalacia in young cattle. *Vet Rec* 108:459.
26. Colodel EM, Driemeier D, Schmitz M, et al.: 2003, Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. [Caprine enterotoxaemia in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Pesq Vet Bras* 23:173-178. In Portuguese. Abstract in English.
27. Fairley RA: 2005, Lesions in the brains of three cattle resembling the lesions of enterotoxaemia in lambs. *N Z Vet J* 53:356-358.
28. Filho EJJ, Carvalho AU, Assis RA, et al.: 2009, Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Vet Pathol* 46:1213-1220
29. Gay CC, Blood DC, Wilkinson JS: 1975, Clinical observations of sheep with focal symmetrical encephalomalacia. *Aust Vet J* 51:266-269.
30. Hartley WJ: 1956, A focal symmetrical encephalomalacia of lambs. *N Z Vet J* 4:129-135.
31. Hazlett M, Reid S: 2002, Focal symmetrical encephalomalacia in two lambs. *AHL Newsletter* 6:30.
32. Lobato FCF, Moro E, Umehara O, et al.: 2000, Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. [Cattle and rabbits immune response against beta and epsilon *Clostridium perfringens* toxins induced by six commercial vaccines in Brazil]. *Arq Bras Med Vet Zootec* 52:313-318. In Portuguese. Abstract in English.
33. McDonel JL: 1980, *Clostridium perfringens* (type A, B, C, D, E). *Pharmacol Ther* 10:617-655.

34. Niilo L: 1980, *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. Can Vet J 21:141-148.
35. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PT: 2007, Veterinary Medicine, 10th ed., Saunders, Elsevier, Edinburgh.
36. Riet-Correa F: 2007, Enterotoxemia e necrose simétrica focal. *In: Doenças de Ruminantes e Eqüinos [Diseases of ruminants and horses]*, ed. Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ, 3th ed., pp. 288-293. Pallotti, Santa Maria, RS. In Portuguese.
37. Riet-Correa F, Timm CD, Barros SS, Summers BA: 2003, Symmetric focal degeneration in the cerebellar and vestibular nuclei in swine caused by ingestion of *Aeschynomene indica* seeds. Vet Pathol 40:311-316.
38. Sattler N, Fecteau G, Desnoyers M, et al.: 1998, Focal symmetrical encephalomalacia in a 6-month-old dorset sheep. Can Vet J 39:434-437.
39. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A: 1995, Veterinary neuropathology. Mosby Year Book, St. Louis, MO.
40. Uzal FA, Boderó DAV, Kelly WR, Nielsen K: 1998, Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. Vet Rec 143:472-474.
41. Uzal FA, Kelly WR: 1997, Effects of the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. J Comp Path 116:63-71.
42. Uzal FA, Porcel JO, Arenas JMC: 2008, Enterotoxemia ovina y caprina. [Enterotoxemia in sheep and goat]. Cuadernos de campo. IVOMECA, 157p. In Spanish.
43. Uzal FA, Songer JG: 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J Vet Diagn Invest 20:253-265.
44. Zachary JF: 2007, Nervous system. *In: Pathologic basis of veterinary disease*, ed. McGavin MD, Zachary JF, 4th ed., pp.833-972, Mosby Elsevier, St Louis.

CAPITULO III

FOCAL SYMMETRICAL ENCEPHALOMALACIA IN SHEEP

(Enviado a revista: Pesquisa Veterinária Brasileira)

Focal symmetrical encephalomalacia in sheep¹

Luciano A. Pimentel², Diego M. Oliveira², Glauco J.N. Galiza², Antônio F.M. Dantas²
and Franklin Riet-Correa^{2*}

ABSTRACT.- Pimentel L.A., Oliveira D.M., Galiza G.J.N., Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2010. [**Focal symmetrical encephalomalacia in sheep.**] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário, CSTR, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB 58700-000, Brazil. E-mail: franklin.riet@pq.cnpq.br

Focal symmetrical encephalomalacia (FSE) is the most prominent lesion seen in the subacute or chronic forms of enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type D. This paper reports FSE in sheep in the state of Paraíba in the Brazilian semiarid. In an outbreak, six deaths occurred in a flock of 70 4-30 month-old Santa Inês sheep, grazing in a paddock of irrigated sprouting *Cynodon dactylon* (Tifton grass), and supplemented, *ad libitum*, with a concentrate of soybean, corn and wheat. Nervous signs included blindness and recumbence. A 19 month-old sheep was examined clinically and necropsied after a clinical course of three days. Gross lesions were herniation of the cerebellar vermis and multifocal, bilateral, symmetric brownish areas in the internal capsule, thalamus and cerebellar peduncles. Histologic lesions were multifocal, bilateral malacia with some neutrophils, swelling of blood vessels endothelium, perivascular edema, and hemorrhages. The flock was vaccinated, before the outbreak, with only one dose of *Clostridium perfringens* type D vaccine. Two factors are suggested to be important for the occurrence of the disease: insufficient immunity due to the incorrect vaccination; and high nutritional levels by the supplementation with highly fermentable carbohydrates.

INDEX TERMS: *Clostridium perfringens* tipo D, epsilon toxin, enterotoxemia, malacia.

¹ Received on December 12. 17, 2009.

Accepted for publication on

² Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, 58700-000 Patos, PB, Brazil. *Corresponding author: franklin.riet@pq.cnpq.br

RESUMO.- [Encefalomalacia focal simétrica em ovino]. Encefalomalacia focal simétrica (EFS) é a lesão mais proeminente vista nas formas subaguda ou crônica da enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D. Este trabalho relata EFS em ovinos no semiárido do estado da Paraíba. Seis ovinos morreram, dentro de um rebanho de 70 animais, da raça Santa Inês, entre 4-30 meses de idade, que pastavam em piquete de *Cynodon dactylon* (capim Tifton), que estava rebrotando. Os ovinos eram suplementados com um concentrado de soja, trigo e milho. Os sinais nervosos incluíam cegueira e decúbito lateral. Um ovino de 19 meses de idade foi examinado clinicamente e necropsiado, depois de um curso clínico de 3 dias. Macroscopicamente foram observadas herniação do cerebelo e áreas acastanhadas, multifocais, simétricas e bilaterais na cápsula interna, tálamo e pedúnculo cerebelar. Histologicamente observou-se malacia, bilateral e simétrica, com alguns neutrófilos, tumefação das células endoteliais dos vasos sanguíneos, edema perivascular e hemorragia. O rebanho foi vacinado, antes do surto, com uma única dose de vacina para *Clostridium perfringens* tipo D. Dois fatores são sugestivos quanto a importância da ocorrência da enfermidade: imunidade insuficiente devida à vacinação incorreta; e altos níveis nutricionais da suplementação com carboidratos altamente fermentáveis.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Clostridium perfringens* tipo D, toxina épsilon, enterotoxemia, malacia.

INTRODUCTION

Enterotoxemia is a frequent disease of sheep and goats caused by *Clostridium perfringens* type D (McDonel 1980, Niilo 1980, Uzal & Songer 2008) a bacterium that can be found as a normal inhabitant of the intestine in a small number of healthy animals (McDonel 1980, Niilo 1980). Alterations in the intestinal environment caused by sudden changes in diet, mainly in animals ingesting highly fermentable carbohydrates are associated with proliferation of *C. perfringens* type D and production of a epsilon prototoxin, which is then activated by intestinal trypsin and other proteases. Epsilon toxin is responsible for the clinical and pathologic findings of the disease (McDonel 1980, Niilo 1980, Uzal & Kelly 1997, Uzal & Songer 2008).

In sheep the disease is most times acute and the toxin affects the brain causing perivascular proteinaceous edema. In goats the disease can be acute, subacute or chronic. The subacute and chronic forms cause mainly intestinal lesions (Uzal & Songer

2008, Uzal et al. 2008) and the subacute and chronic forms may occasionally show brain lesions (Uzal & Kelly 1997, Uzal et al. 1997, Colodel et al. 2003).

Focal symmetric encephalomalacia is a sporadic form of subacute or chronic enterotoxemia affecting sheep, mainly lambs and less frequently older sheep, causing symmetric lesions of malacia affecting mainly the internal capsule, mesencephalon, thalamus, and cerebellar peduncles (Hartley 1956, Gay et al. 1975, Brown et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007, Zachary 2007, Uzal & Songer 2008). The disease was also reported in cattle with similar lesions as in sheep, (Buxton et al. 1981) and recently it was demonstrated that in this species the FSE is also a subacute form of type D enterotoxemia (Facury Filho et al. 2009). FSE has recently been reported for the first time in goats (Oliveira et al. 2010).

FSE of sheep occurs in different regions of the world (Hartley 1956, Barlow 1958, Niilo 1980, Brown et al. 2007). In Brazil the disease is reported from Rio Grande do Sul (Riet-Correa 2007), Paraíba (Guedes et al. 2007) and Brasília (Castro 2008), but detailed documentation of outbreaks are not reported. This paper aimed to report one outbreak of FSE in sheep in the state of Paraíba, Northeastern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

One affected sheep was submitted to the Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande, in the city of Patos, state of Paraíba. The animal was examined clinically and after spontaneous death it was necropsied. Samples of intestine, fore stomachs, abomasum, mesenteric lymph nodes, adrenal, spleen, liver, heart, lung, trigeminal ganglion and pituitary gland were fixed in buffered 10% formalin, embedded in paraffin and cut on 4-8 μ m sections. The whole brain and spinal cord was also fixed in 10% buffered formalin and transverse sections of the cervical, thoracic and lumbar spinal cord, medulla oblongata, pons, rostral and caudal colliculi, thalamus, corpus striatum, cortex, cerebellar peduncles and cerebellum were examined histologically. All tissues were stained with hematoxylin and eosin. Selected sections of the CNS were stained with PAS and luxol fast blue. Smears of the formaline fixed intestinal mucosa of the affected sheep and from a control sheep were stained by Gram stain to observed *Clostridium*-like bacteria.

RESULTS

The outbreak occurred in May 2008, during the rainy period in a farm in the municipality of São Domingos, state of Paraíba, in a flock of 70, four to 30-month-old hair sheep of the Santa Inês breed. The flock was grazing during most of the day on a native pasture, but during one hour per day it had also access to an one hectare irrigated paddock of sprouting *Cynodon dactylon* (Tifton grass), which had been cut two weeks before the occurrence of the disease. A concentrate ration including soybean, wheat and corn bran was feed *ad libitum* at the end of the day. The farmer informed that five, 19 to 30-month-old sheep, showed diarrhea and in the following 1-2 days were found dead. The sheep had arrived recently to the farm and were vaccinated, 15 days before the outbreak, against enterotoxemia type D with a commercial vaccine.

The 19 month-old sheep sent to the Veterinary Hospital after being affected for one day on the farm showed uncoordinated gait and rising difficulties, followed by diarrhea and lateral recumbence. On clinical examination at the hospital it showed two ruminal movements in five minutes, cardiac frequency of 160 bites per minute, 24 respiratory movements per minute and rectal temperature of 39.9°C. Other clinical signs were apathy, congested mucosa, lateral recumbence, nystagmus, strabismus, decreased menace and pupillary consensual reflexes, groaning, decreased sensibility of the face, and pedaling movements. In the next day it also showed decreased tongue tonus, mandible trismus, and decreased anal reflex. The sheep died after a clinical course of three days. The sheep was treated unsuccessfully with 10mg/kg of thiamine, intramuscular, and 0.2mg/kg of dexamethasone, intravenous, at 12 hours interval during two days.

At necropsy the sheep was in good body condition. The cerebellar vermis was herniated through the foramen magnum (Fig.1A,B). Multifocal, bilateral, brownish areas with 0.1-1.0cm in diameter were observed in the internal capsule, dorsum-lateral thalamus, and cerebellar peduncles (Fig.1C,D). Small cavities, softening of the tissue with gelatinous aspect, and occasionally multiples red small spots were also observed in those areas.

On histologic examination brain lesions consisted of symmetric, bilateral, multifocal areas of malacia characterized by pallor and rarefaction of the neuropil with necrosis of glial cells (Fig.2A) and neurons and axonal spheroids. Occasionally, perivascular proteinaceous edema or hemorrhages were observed, and the vascular

endothelium was swollen (Fig.2B). Other lesions were lung congestion and hyaline casts in the kidneys. No significant lesions were observed in other organs. No significant numbers of *Clostridium*-like bacteria were observed in the smears from the intestinal mucosa.

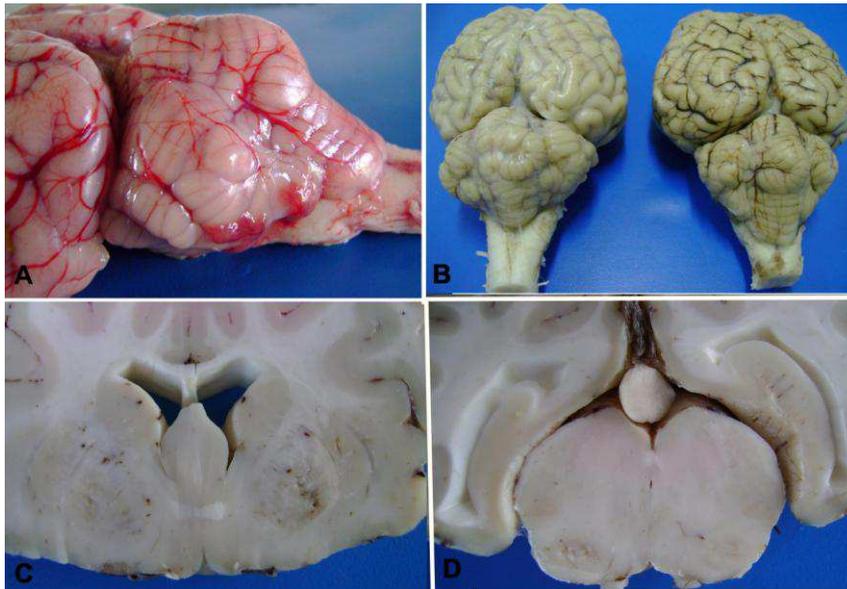


Fig.1. Focal symmetrical encephalomalacia in sheep. **(A)** Cerebellar herniation. **(B)** The herniated cerebellum, at left, is compared with a cerebellum from a control sheep. **(C)** Internal capsule. **(D)** Rostral colliculi with symmetric malacic foci.

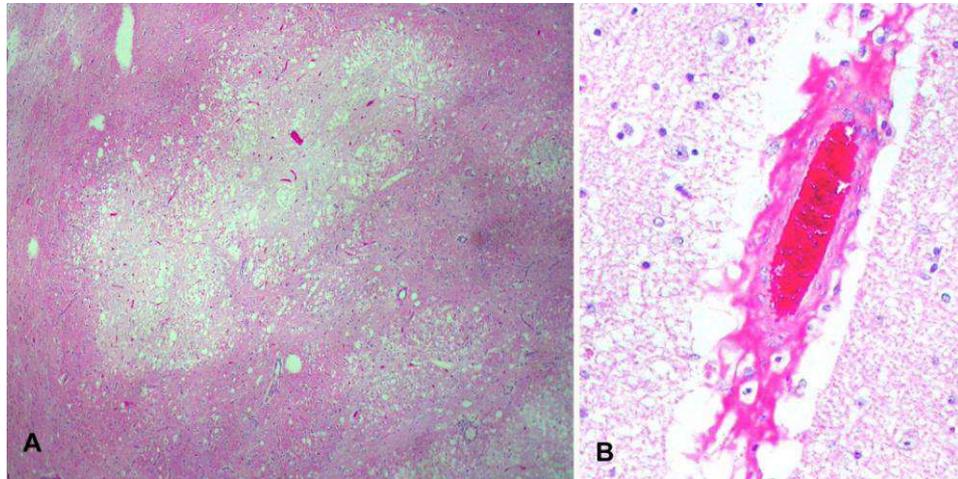


Fig.2. Focal symmetrical encephalomalacia in sheep. **(A)** Multifocal areas of necrosis are observed in the internal capsule. HE, obj.10x. **(B)** Perivascular edema in the thalamus HE, obj.20x.

DISCUSSION

This paper reports epidemiologic and clinical aspects and pathology of focal symmetric encephalomalacia in sheep in Brazil. The disease was diagnosed based in the lesions of the central nervous system, which are considered pathognomonic (Hartley 1956, Gay et al. 1975, Buxton & Morgan 1976, Uzal & Songer 2008). Because FSE is usually a subacute to chronic lesion, epsilon toxin is not frequently found (Radostits et al. 2007). The disease has been occasionally reported from different countries (Hartley 1956, Barlow 1958, Gay et al 1975, Sattler et al. 1998, Hazlett & Reid 2002). In the Brazilian semiarid region enterotoxemia and FSE are seldom reported; between January 2000 and August 2009 the Veterinary Hospital in Patos reported one outbreak of enterotoxemia and two of FSE out of 414 sheep diseases diagnosed.

The owner of the sheep of this report mentioned the occurrence of other four sheep affected, which were observed with diarrhea and were found dead in the other day. It is difficult to know if these cases were due to enterotoxemia, FSE or other disease. FSE has been associated with low concentrations of epsilon toxin in the gut or with partially immunized sheep (Summers et al. 1995). Low toxin concentrations in the intestine can occur in animals improperly vaccinated or in animals that have some degree of resistance induced naturally by low doses of toxin production in the intestine. In the outbreak reported here the flock had been vaccinated against type D enterotoxemia, with only one dose of a mixed clostridial vaccine, before the occurrence of the disease. It is possible that the vaccination induced low antitoxin serum concentration, which protected against enterotoxemia but not against FSE. In Brazil an evaluation of type D enterotoxemia vaccines showed that only two out of six commercial vaccines induced neutralizing antibodies to the epsilon and beta toxins in rabbits and calves (Lobato et al. 2000).

Another factor associated with the outbreak was the high nutritional levels due to the good pastures during the rainy period together with supplementation with grains or byproducts containing highly fermentable carbohydrates, which are well known risk factors for the occurrence of enterotoxemia and FSE (Gay et al. 1975, Sattler et al. 1998, Hazlett & Reid 2002, Radostits et al. 2007, Zachary 2007).

The literature is sometimes confusing about the definition of FSE and enterotoxemia caused by *C. perfringens* type D. In sheep FSE was reported before the demonstration that it is caused by epsilon toxin (Hartley 1956, Barlow 1958). After the

demonstration that the disease is caused by epsilon toxin, it is obvious that FSE and enterotoxemia are the same disease with a clinical course varying from few hours (acute) to one week (subacute) or more (chronic). Also the brain lesion can vary from a perivascular proteinaceous edema in the first 24 hours (enterotoxemia) to areas of malacia with infiltration of gitter cells and cavitation after a week (FSE). In consequence it is difficult to determine if a given case is enterotoxemia or FSE, also because both are due to epsilon toxin produced in the gut by proliferating *C. perfringens* type D. FSE has a clinical manifestation period of 1-14 days with most cases surviving for 5-7 days (Gay et al. 1975, Radostits et al. 2007). In the case reported in this paper the clinical manifestation period was of approximately three days, characterizing a subacute form of the disease. Despite the fact of being the same disease it looks convenient to maintain the term FSE for subacute or chronic cases of enterotoxemia because the diagnosis techniques and differential diagnosis are different. Enterotoxemia has to be diagnosed by the presence of epsilon toxin in the intestine, the cerebral perivascular edema is the main lesion, and the presence of large amounts of Gram-positive rods in gut smears and glycosuria are also suggestive of the disease. In the case of FSE diagnosis is done only by the observation of gross and histologic lesions of symmetric multifocal encephalomalacia located mainly in the internal capsule, thalamus, mesencephalon and cerebellar peduncles, and is important the differential diagnosis with other disease of the nervous system in sheep, including polioencephalomalacia, listeriosis, rabies and pregnancy toxemia. Also enterotoxemia is a disease of mainly lambs and FSE can affect sheep of different ages, as it was observed in the outbreak reported here. The cerebellar herniation, observed in a sheep, has been reported as a characteristic lesion of enterotoxemia and FSE in sheep (Buxton & Morgan 1976, Uzal & Songer 2008, Uzal et al. 2008) and was also observed in experimental cases in rats (Fernandez-Miyakawa et al. 2007).

After the diagnosis of FSE or type D enterotoxemia the flock has to be vaccinated immediately and nutritional measures has to be adopted until the establishment of a good immunity. For the prophylaxis lambs born from non vaccinated sheep has to be vaccinated at 1-2 months of age, and lambs born from vaccinated ewes should be vaccinated at 2-3 months. In sheep later vaccinations are annually, three months before parturition in ewes (Radostits et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007, Uzal et al. 2008).

Acknowledgements.- To CNPQ (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the scholarship given to the first author.

REFERENCES

- Barlow R. 1958. Focal symmetrical encephalomalacia in lambs. *Vet. Rec.* 70:884.
- Brown C.C., Baker D.C. & Barker L.K. 2007. The alimentary system, p.1-296. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Buxton D., Macleod N.S.M. & Nicolson T.B. 1981. Focal symmetrical encephalomalacia in young cattle. *Vet. Rec.* 108:459.
- Buxton D. & Morgan K.T. 1976. Studies of lesions produced in the brains of colostrum deprived lambs by *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) type D toxin. *J. Comp. Pathol.* 86:435-447.
- Castro M. B. 2008. Personal communication (School of Veterinary Medicine, University of Brasília).
- Colodel E.M., Driemeier D., Schmitz M., Germer M., Nascimento R.A.P., Assis R.A., Lobato F.C.F. & Uzal F.A. 2003. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 23:173-178.
- Fernandez-Miyakawa M.E., Sayeed S., Fisher D.J., Poon R., Adams V., Rood J.I., McClane B.A., Saputo J. & Uzal F.A. 2007. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D. *Infect. Immun.* 75:4282-4288.
- Facury Filho E.J., 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.
- Gay C.C., Blood D.C. & Wilkinson J.S. 1975. Clinical observations of sheep with focal symmetrical encephalomalacia. *Aust. Vet. J.* 51:266-269.
- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Miranda Neto E.G., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Brás.* 27:29-38.

- Hartley W.J. 1956. A focal symmetrical encephalomalacia of lambs. N. Z. Vet. J. 4:129-135.
- Hazlett M. & Reid S. 2002. Focal symmetrical encephalomalacia in two lambs. AHL Newsletter 6:30.
- Lobato F.C.F., Moro E., Umehara O., Assis R.A., Martins N.E. & Gonçalves L.C.B. 2000. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52:313-318.
- McDonel J.L. 1980. *Clostridium perfringens* (type A, B, C, D, E). Pharmacol. Ther. 10:617-655.
- Oliveira D.M., Pimentel L.A., Pessoa A.F., Dantas A.F.M., Uzal F. & Riet-Correa F. 2010. Focal symmetrical encephalomalacia in sheep and goats in the Brazilian semiarid region. J. Vet. Diag. Invest. (Submitted)
- Niilo L. 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. Can. Vet. J. 21:141-148.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh.
- Riet-Correa F. 2007. Enterotoxemia e necrose simétrica focal, p.288-293. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Sattler N., Fecteau G., Desnoyers M., Quesnel A. & Chénier S. 1998. Focal symmetric encephalomalacia in a 6-month-old dorset sheep. Can. Vet. J. 39:434-437.
- Summers B.A., Cummings J.F. & de Lahunta A. 1995. Veterinary Neuropathology. Mosby, St Louis, p.258-161.
- Uzal F.A., Glastonbury J.R.W., Kelly W.R. & Thomas R. 1997. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. Vet. Rec. 141:224-226.
- Uzal F.A. & Kelly W.R. 1997. Effects of the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. J. Comp. Pathol. 116:63-71.
- Uzal F.A. Porcel J.O.M. & Arenas J.M.C. 2008. Enterotoxemia ovina y caprina. Cuadernos de Campo, IVOMECA. 157p.

- Uzal F.A. & Songer J.G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J. Vet. Diagn. Invest. 20:253–265.
- Zachary J.F. 2007. Nervous System, p.833-971. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.