

DIAGNÓSTICO CLÍNICO-PATOLÓGICO E LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS ENFERMIDADES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS



**Álvaro Menin
Carolina Reck
Vagner Miranda Portes**

Organizadores

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO-PATOLÓGICO
E LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS
ENFERMIDADES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS**

**Álvaro Menin
Carolina Reck
Vagner Miranda Portes**
Organizadores



ISBN: 978-65-80274-01-7
9 786580 274017



DIAGNÓSTICO CLÍNICO-PATOLÓGICO E LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS ENFERMIDADES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS



Prof. Ms. Gil Barreto Ribeiro (PUC Goiás)

Diretor Editorial

Presidente do Conselho Editorial

Dr. Cristiano S. Araujo
Assessor

Engenheira Larissa Rodrigues Ribeiro Pereira

Diretora Administrativa

Presidente da Editora

CONSELHO EDITORIAL

Profa. Dra. Solange Martins Oliveira Magalhães (UFG)

Profa. Dra. Rosane Castilho (UEG)

Profa. Dra. Helenides Mendonça (PUC Goiás)

Prof. Dr. Henryk Siewierski (UNB)

Prof. Dr. João Batista Cardoso (UFG - Catalão)

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana (UNESP)

Profa. Ms. Margareth Leber Macedo (UFT)

Profa. Dra. Marilza Vanessa Rosa Suanno (UFG)

Prof. Dr. Nivaldo dos Santos (PUC Goiás)

Profa. Dra. Leila Bijos (UCB DF)

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Sá (UFPR)

Profa. Dra. Telma do Nascimento Durães (UFG)

Profa. Dra. Terezinha Camargo Magalhães (UNEB)

Profa. Dra. Christiane de Holanda Camilo (UNITINS/UFG)

Profa. Dra. Elisangela Aparecida Perereira de Melo (UFT)

Álvaro Menin
Carolina Reck
Vagner Miranda Portes
Organizadores

DIAGNÓSTICO CLÍNICO-PATOLÓGICO E LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS ENFERMIDADES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

1^a edição

Goiânia - Goiás
Editora Espaço Acadêmico
- 2019 -

Copyright © 2019 by Álvaro Menin, Carolina Reck, Vagner Miranda Portes

Editora Espaço Acadêmico

Endereço: Rua do Saveiro, Quadra 15 Lote 22, Casa 2
Jardim Atlântico - CEP: 74.343-510 - Goiânia/Goiás
CNPJ: 24.730.953/0001-73
Site: <http://editoraespacoacademico.com.br/>

Contatos:

Prof. Gil Barreto - (62) 98345-2156 / (62) 3946-1080
Larissa Pereira - (62) 98230-1212

Revisão: João Ghizoni
Editoração: Franco Jr.

CIP - Brasil - Catalogação na Fonte

D536 Diagnóstico clínico-patológico e laboratorial das principais enfermidades dos animais domésticos / Organizadores Álvaro Menin, Carolina Reck e Vagner Miranda Portes. – 1^a ed. – Goiânia : Editora Espaço Acadêmico, 2019.
798 p.

Inclui referências bibliográficas
ISBN: 978-65-80274-01-7

1. Animais domésticos. 2. Animais domésticos – diagnóstico.
I. Menin, Álvaro (org.). II. Reck, Carolina (org.). III. Portes, Vagner Miranda (org.).

CDU 619

O conteúdo da obra e sua revisão são de total responsabilidade do autor.

DIREITOS RESERVADOS

É proibida a reprodução total ou parcial da obra, de qualquer forma ou por qualquer meio, sem a autorização prévia e por escrito dos autores. A violação dos Direitos Autorais (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Impresso no Brasil | *Printed in Brazil*
2019

DEDICATÓRIA

Aos nossos estudantes, nossos colegas,
amigos e nossas famílias.

PREFÁCIO

Este livro é destinado a estudantes e profissionais da Medicina Veterinária. Nesta edição objetivamos a produção de um livro didático, oferecendo informações claras e objetivas para o diagnóstico das principais enfermidades dos animais domésticos, considerando desde o diagnóstico presuntivo, definitivo, complementar, coleta de material para exames laboratoriais, além do entendimento de conceitos básicos da epidemiologia. As informações contidas neste livro são básicas para o entendimento e abordagem diagnóstica considerado a Medicina Veterinária baseada em evidências.

Neste livro, profissionais de diferentes instituições, aproveitando sua respectiva especialidade, empenharam seus esforços para concentrar informações relevantes acerca do diagnóstico Médico Veterinário para as principais enfermidades infecto-parasitárias dos animais domésticos. Certamente, este livro não concentra todo a informação gerada nos últimos anos acerca do tema, mesmo porque, o avanço permanente da ciência nas diferentes áreas, torna o conhecimento e as informações dinâmicas, sendo recomendado a consulta a diferentes fontes bibliográficas simultaneamente como forma de atualização permanente.

Buscamos em todos os capítulos usar como referência trabalhos clássicos do tema específico e ressaltamos a permanente preocupação de todos os autores em citar de forma adequada e dar todos os créditos aos detentores dos direitos autorais dos trabalhos ou obras utilizadas como referência para este livro, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso haja alguma discordância. Ao mesmo tempo, para as próximas edições serão bem-vindas críticas e sugestões para abordagens futuras e inclusão de novos temas.

SUMÁRIO

Capítulo 1

- EPIDEMIOLOGIA E SANEAMENTO 11
Paulo Francisco Domingues

Capítulo 2

- PRINCIPIAS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO 29
Cátia Silene Klein; Iara Maria Trevisol; Luizinho Caron; Ubirajara Maciel da Costa e Álvaro Menin

Capítulo 3

- AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS 75
Álvaro Menin e Carolina Reck

Capítulo 4

- NECROPSIA 83
Álvaro Menin; Carolina Reck; Celso Pilati; Débora Cristina Olsson; Josaine Cristina da Silva Rappeti; Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha; Renata Dezengrini Shessarenko e Wagner Miranda Portes

Capítulo 5	
• COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO	113
<i>Álvaro Menin; Carolina Reck; Débora Cristina Olsson;</i>	
<i>Josaine Cristina da Silva Rappeti; Marina Gabriela Monteiro Carvalho</i>	
<i>Mori da Cunha; Renata Dezengrini Slhessarenko e Vagner Miranda Portes</i>	
Capítulo 6	
• DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM AVES	175
<i>Carolina Reck; Álvaro Menin; Celso Pilati e Vagner Miranda Portes</i>	
Capítulo 7	
• DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS SUÍNOS	273
<i>Álvaro Menin; Carolina Reck; Celso Pilati e Vagner Miranda Portes</i>	
Capítulo 8	
• DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS BOVINOS	467
<i>Vagner Miranda Portes; Álvaro Menin e Carolina Reck</i>	
Capítulo 9	
• DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS EQUINOS	547
<i>Caroline Antoniazzi Wolf; Carlos José Raupp Ramos; Silverio Bunn;</i>	
<i>Sabrina Leaes Gomez; Matheus Pedrotti de Cesaro e Álvaro Menin</i>	
Capítulo 10	
• DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS CANINOS	615
<i>Débora Cristina Olsson e Renata Dezengrini Slhessarenko</i>	
Capítulo 11	
• DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS GATOS	717
<i>Josaine Cristina da Silva Rappeti; Renata Dezengrini Slhessarenko e</i>	
<i>Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha</i>	
SOBRE OS ORGANIZADORES E AUTRES	795

CAPÍTULO 1

EPIDEMIOLOGIA E SANEAMENTO

Paulo Francisco Domingues

Epidemiologia, segundo sua formação etimológica, significa (raiz grega): *epi* = sobre, *demo* = povo, população (humana, animal ou vegetal), e *logo* = estudo. Seria, portanto, o “estudo de doenças nas populações”. Entretanto, ela deve ser entendida como a ciência que estuda a ocorrência de doenças em populações, suas causas determinantes, as medidas profiláticas para seu controle, e até mesmo sua erradicação. A epidemiologia veterinária, adicionalmente, inclui a pesquisa e a avaliação de outros eventos relacionados com a saúde animal, em especial a produtividade. Tradicionalmente, “epidemiologia” refere-se aos estudos nas populações humanas^[5], e “epizootiologia”, do grego *zôo* = animal, a estudos de populações animais. Surtos de doença em populações humanas são chamados “epidêmicos”; em animais, “epizoóticos”; e em populações aviárias são denominados “eporníticos”, do grego *ornito* = pássaro^[8].

Se as pessoas envolvidas na criação se preocuparem apenas com o animal doente, deixando de lado o restante do rebanho, não poderão avaliar o perigo que um único animal doente poderá representar para todo o rebanho, principalmente, considerando-se as enfermidades transmissíveis. Sem os conhecimentos básicos dos princípios epidemiológicos, o profissional não poderá ter ideia do risco relativo que um caso particular possa representar para os outros animais da propriedade. É preciso considerar o *meio* no qual ocorre a enfermidade, o *risco* de que surjam novos casos, e as possibilidades de *controlar* os fatores que contribuem para sua ocorrência. Desse modo, o profissional poderá nortear sua prática assistencial com uma visão mais ampla dos problemas de saúde animal, pois o técnico deverá ter em mente que se está trabalhando com populações animais, e não com um único animal. O objetivo primordial da epidemiologia é manter o estado de saúde na coletividade.

Usos da Epidemiologia

Há cinco objetivos na epidemiologia:

1. Determinação da origem da doença de causa conhecida;
2. Investigação e controle da doença de causa desconhecida ou pouco compreendida;
3. Aquisição de informações da ecologia e da história natural da doença;
4. Planejamento e monitoramento de programas de controle da doença;
5. Avaliação econômica dos efeitos da doença e dos custos e benefícios das campanhas alternativas de controle.

Tipos de investigações epidemiológicas

Há quatro enfoques da pesquisa epidemiológica que, tradicionalmente, têm sido denominados “tipos” de epidemiologia: **descritiva, analítica, experimental e teórica**^[8].

Epidemiologia descritiva

Epidemiologia descritiva envolve observação e registros das doenças e os possíveis fatores causais. Normalmente, é a primeira parte de uma investigação.

Epidemiologia analítica

Epidemiologia analítica é a análise das observações por testes adequados de diagnóstico e estatísticos.

Epidemiologia experimental

Nesta, o epidemiologista experimental observa e analisa dados de grupos de animais que ele pode selecionar e nos quais ele pode alterar os fatores associados aos grupos. Um componente importante do enfoque experimental é o controle de grupos.

Epidemiologia teórica

Consiste na representação da doença usando modelos matemáticos na tentativa de simular padrões naturais da ocorrência da doença.

Subdisciplinas epidemiológicas

Várias subdisciplinas epidemiológicas são reconhecidas atualmente: Epidemiologia clínica, Epidemiologia computacional, Epidemiologia genética e Epidemiologia molecular.

A epidemiologia é o fulcro da saúde animal e da saúde pública, representando o lastro principal para avaliação das medidas de prevenção e fornecendo orientação para o diagnóstico de doenças, sejam elas transmissíveis ou não.

1. GLOSSÁRIO DE TERMOS UTILIZADOS NA INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Agente etiológico: é o causador da doença, o responsável por ela. Pode ser: bactéria, vírus, fungo, protozoário, rickétsia, clamídia, alga, prón, ectoparasita e endoparasita.

Caso: é o animal infectado ou doente. Como exemplo tem-se um caso de aborto por *Listeria monocytogenes*, ou um caso de manqueira, que é doença, causada pelo *Clostridium chauvoei*. O caso refere-se, portanto, à fonte de infecção.

Colonização: ocorre quando o agente está presente na superfície do organismo em quantidade mínima, multiplicando-se numa proporção suficiente para manter-se, mas sem produzir evidência de qualquer reação do hospedeiro.

Comunicante: é o indivíduo ou animal que teve contato com animais infectados ou doentes, bem como com locais contaminados, sem que se conheça seu estado sanitário.

Contaminação: refere-se à presença de agente na superfície do corpo ou na de objetos inanimados (fômites) que podem servir de fonte de infecção.

Enfermidade: é a etapa da doença ou agravo em nível orgânico, que se caracteriza pela presença de sintomatologia.

Enfermidade exótica: é aquela que não existe no país ou região estudado. Como exemplo, pode-se citar a peste bovina, que ingressou no continente americano e foi erradicada na década de 1920.

Foco: Trata-se de um ou mais animais doentes, numa área ou concentração pequena. Um exemplo é um foco de febre aftosa, que acomete vários animais de uma determinada propriedade rural. Normalmente, o foco é identificado como rebanho afetado.

Fômite: termo ainda não dicionarizado, mas para esta definição pode-se utilizar o próprio conceito de veículo inanimado, pois é o objeto inanimado, contaminado, que podem transportar agentes infecciosos para os animais ou para o homem, como baldes, toalhas, seringas, entre outros.

Fonte de infecção: é o animal vertebrado que alberga o agente etiológico e o elimina para o meio exterior.

Hospedeiro: organismo multicelular, vertebrado, passível de, em condições naturais, abrigar ou sofrer influências dos fatores causais capazes de provocar agravos a sua saúde.

Infecção: é a penetração e o desenvolvimento, ou a multiplicação, de um agente infeccioso no homem ou no animal.

Infestação: é o alojamento, o desenvolvimento e a reprodução de artrópodes na superfície do corpo. Pode-se dizer, também, que uma área ou local está infestado de artrópodes e roedores.

Portador: é o animal ou pessoa que, havendo ou não manifestado os sinais clínicos de determinada enfermidade, continua eliminando o agente por algum tempo. Pode ser **portador sadio** o animal que já teve ou poderá vir a ter sintomatologia clinicamente detectável; **portador em incubação** é aquele que está infectado mas não mostra alterações; e **portador convalescente**, aquele que, embora tenha apresentado cura clínica, ainda pode eliminar o agente infeccioso.

Reservatório: é um animal ou local que mantém um agente infeccioso na natureza. O solo, por exemplo, pode ser reservatório, como elemento abiótico, mantendo agentes infecciosos, ocasionando as doenças denominadas de origem telúrica, como as saprozoonas, e entre elas estão a listeriose e histoplasmose.

Surto epidêmico: trata-se de vários animais doentes em regiões diferentes. Como exemplo ainda, um surto de febre aftosa que atinge várias propriedades, podendo ser de diferentes regiões. O termo “surto epidêmico” é utilizado como sinônimo de epidemia ou epizootia com a finalidade de evitar alarme, que o termo epidemia pode causar, especialmente na população humana. O surto, na realidade, é o grupo de focos originários de uma mesma fonte de infecção, em espaço e tempo determinados, por transmissão direta ou indireta por focos sucessivos.

Suscetibilidade: qualidade do hospedeiro em relação à infecção ou invasão de seu organismo pelo parasita. É utilizado para designar a característica do organismo suscetível à ação do fator determinante.

Suscetível: organismo ou população que apresenta suscetibilidade, disposição à ação de determinado fator. Considerando um agente infeccioso, seria o indivíduo que não possui resistência ao agente patogênico, podendo contrair a doença.

Veículo: é qualquer elemento que transporta determinado agente infeccioso. Esse veículo pode ser animado, definindo-se como qualquer ser vivo que possa transportar passivamente o agente infeccioso. Pode, também, ser inanimado: o elemento capaz de transportar o agente infeccioso. Neste grupo incluem-se a água, os alimentos e os objetos contaminados (fômites), como agulhas, seringas, panos, arreios, escovas, entre outros.

Vetor: é o animal, geralmente artrópode, que transmite o agente infeccioso ao hospedeiro suscetível.

Vetor Biológico: é o hospedeiro onde o parasita desenvolve parte de seu ciclo evolutivo, possibilitando a transmissão para novo hospedeiro. Caracteriza-se pelo caráter de obrigatoriedade para sua sobrevivência ou aumento da densidade populacional do parasita. Pode-se dizer que os microrganismos desenvolvem obrigatoriedade neste vetor fase do ciclo antes de serem disseminados no ambiente ou transportados para novo hospedeiro. Pode-se exemplificar o caso da anaplasmosose, em que o principal transmissor é o carapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, considerado vetor biológico e transmissor do agente, que é o *Anaplasma marginale*.

Vetor mecânico: é o organismo que pode contaminar-se com formas infectantes do parasita, transportando-as mecanicamente para determinado hospedeiro. Neste caso, o vetor participa apenas como carreador de agentes infecciosos, e estes não sofrem qualquer modificação no interior de seu organismo. Podem ser exemplos as moscas hematófagas, como *Stomoxys calcitrans*, e os tabanídeos, que podem servir de vetor a agentes depois de sugar animal portador da rickettsia *Anaplasma marginale*. Esses agentes ficam em sua tromba, infectando o animal suscetível, se a seguir sugarem o seu sangue.

John Snow, considerado o pai da epidemiologia, por ocasião de epidemia de cólera em Londres, em 1849, concluiu que havia relação entre a doença e o consumo de água contaminada por fezes de pessoas doentes. Alguns anos depois, seus estudos foram confirmados em laboratório pelo isolamento e pela identificação da bactéria *Vibrio cholerae* nas fezes de doentes de cólera.

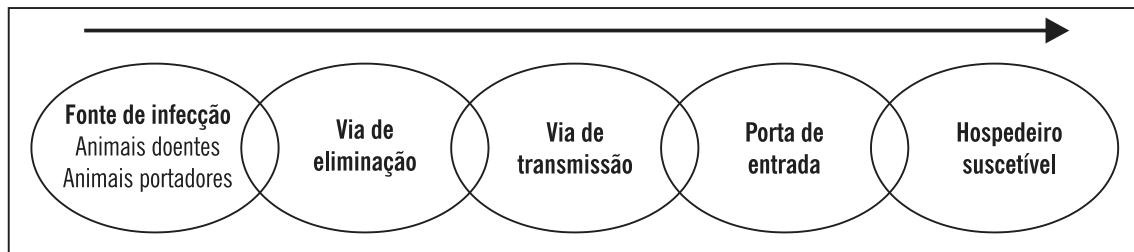
Para entender melhor como as ações de saneamento podem interferir na prevenção de doenças infecciosas, torna-se necessário o detalhamento de aspectos relacionados a sua ecologia.

Côrtes, (1993), revendo o conceito de cadeia epidemiológica e de seus componentes, caracterizou os mecanismos de propagação das doenças. A identificação desses mecanismos que se relacionam com o processo de propagação da doença torna possível a adoção de medidas sanitárias capazes de prevenir e impedir sua disseminação. Segundo esse autor, as seguintes questões poderiam ser formuladas e respondidas:

1. Quem hospeda e elimina o agente? Fonte de infecção (FI).
2. Como o agente deixa o hospedeiro? Via de eliminação (VE).
3. Que recurso o agente utiliza para alcançar um novo hospedeiro? Via de transmissão (VT).
4. Como o agente se hospeda no novo hospedeiro? Porta de entrada (PE).
5. Quem pode adquirir a doença? Susceptível.

Se esses conceitos forem colocados sequencialmente, tem-se a caracterização da **cadeia epidemiológica**, que nada mais é que uma série de eventos necessários para que uma doença ocorra em um indivíduo ou em um rebanho, ou como o conjunto de componentes do meio ou do animal, que favorecem a disseminação. Os componentes da cadeia epidemiológica são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Componentes da cadeia epidemiológica.



Se esses elos da cadeia forem combatidos conjuntamente, é possível o controle de enfermidades que ocorrem nas populações animais, especialmente as transmissíveis. O saneamento procura atuar em todos os elos dessa cadeia, principalmente na **via de transmissão** e na **fonte de infecção**.

Portanto, o principal **objetivo da Epidemiologia** é estudar: o meio no qual se desenvolve a doença, os mecanismos de transmissão, o risco de que surjam novos casos e as medidas preventivas, necessárias para se controlar os fatores que contribuem para o desenvolvimento das doenças.

2. COMPONENTES DA CADEIA EPIDEMIOLÓGICA

Fontes de infecção: Podem-se considerar como fonte de infecção os animais vertebrados nos quais o agente etiológico se aloja, sobrevive e se multiplica, sendo posteriormente eliminado para o meio ambiente, transmitindo-o para outro hospedeiro. Existem dois elementos fundamentais que funcionam como fontes de infecção: os animais doentes e os portadores.

1. **Doentes:** são os animais que apresentam sintomas de alguma doença, atribuídos aos efeitos do agente etiológico que albergam em seu organismo. Podem ser: a) **doentes típicos**, aqueles que apresentam os sintomas característicos da doença, conhecidos ainda por sintomas patognomônicos, sendo facilmente reconhecidos; e b) **doentes atípicos**, que são os animais que apresentam sintomatologia diferente daquela que realmente caracteriza a doença e dificultam o diagnóstico, podendo postergar a adoção de medidas de controle.

2. **Animais portadores:** são os animais que não apresentam sintomas da doença, mas albergam e eliminam o agente etiológico no ambiente. São conhecidos: o **portador sadio**, que são os animais de maior importância epidemiológica, pois além de serem de difícil diagnóstico, circulam livremente pelo rebanho; o **portador em incubação**, que não apresentam sintomas, mas já eliminam o agente etiológico no ambiente. Esses apresentarão os sintomas após o final do período de incubação, o que caracteriza o período de estado da doença. O tempo de incubação será maior ou menor, dependendo da doença. Na raiva, por exemplo, o cão pode eliminar o vírus pela saliva de 5 a 13 dias antes do aparecimento dos sintomas; e os **portadores convalescentes**, animais que já apresentaram sintomas, com cura clínica, entretanto podem ainda eliminar o agente etiológico. Isso ocorre, por exemplo, na leptospirose e na salmonelose.

Vias de eliminação: são o conjunto de vias no animal pelas quais o agente etiológico é eliminado para o meio ambiente. Esse agente pode ser eliminado por diferentes vias; entretanto, de acordo com a doença, uma delas poderá ser a mais importante. Um agente que produza lesões entéricas terá, geralmente, as fezes como a via mais importante de eliminação do agente. Em caso de

doença que produza lesões no sistema respiratório, as excreções oronasais serão as principais vias de eliminação. Esse fenômeno de especificidade de eliminação é de grande importância no estudo epidemiológico, na medida em que fornece indicação dos mecanismos de transmissão da doença.

A seguir, exemplos de algumas doenças com as principais vias de eliminação de seus agentes. Na tuberculose, garrotinho, raiva e febre aftosa são as secreções oronasais; na brucelose, as descargas vaginais e a placenta; na leptospirose, principalmente a urina; nas micoses, sarnas e ectima contagioso, as descamações cutâneas; nas verminoses, coccidiase, salmonelose e colibacilose, as fezes; nas mastites, o leite; na anemia infecciosa equina e leucose, o sangue.

Vias de transmissão: são os mecanismos pelos quais a doença chega da fonte de infecção ao suscetível. Ela pode ocorrer sob forma *vertical*, de geração a geração, sendo considerada ainda como congênita, e sob a forma *horizontal*, que ocorre de animal a animal, pelo contato direto ou indireto por meio de insetos, fômites, entre outros. Pode-se dizer, ainda, que a transmissão ocorre pelo contágio, transmissão aerógena, pelo solo, pela água, por alimentos, por vetores, por fômites e por veículos animados.

Diz-se que a transmissão é **direta** quando ocorre o contato entre a fonte de infecção e o animal suscetível, sem a interferência de veículos. Esta pode ser **direta imediata**, quando há o contato físico entre a fonte de infecção e o animal. É o caso da mordedura, ou o ato de lamber, na raiva, e a cópula, na tricomonose e na brucelose. Pode ser ainda **direta mediata**, quando não há o contato físico entre a fonte de infecção e o animal; como exemplos estão as doenças respiratórias, transmitidas pelos aerossóis.

É considerada **indireta** quando a transferência do agente se dá por meio de veículos, ocorrendo intervalos maiores entre a eliminação e a penetração do agente. A água é o principal veículo de transmissão de agentes infecciosos causadores de doenças entéricas. Os alimentos e a água, quando contaminados, constituem-se em importantes veículos de transmissão de doenças. O solo pode veicular agente infeccioso como no caso de tétano, botulismo e verminoses. É indireta, ainda, quando há a participação de vetores e fômites.

Portas de entrada: são consideradas como as vias pelas quais o agente infeccioso consegue penetrar no organismo animal. As principais portas de entrada são: a via respiratória, a digestiva, a conjuntival, a galactófora (ducto papilar), a onfaloflébica, a cutânea e a genitourinária.

3. HISTÓRIA NATURAL E ESPECTRO CLÍNICO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS

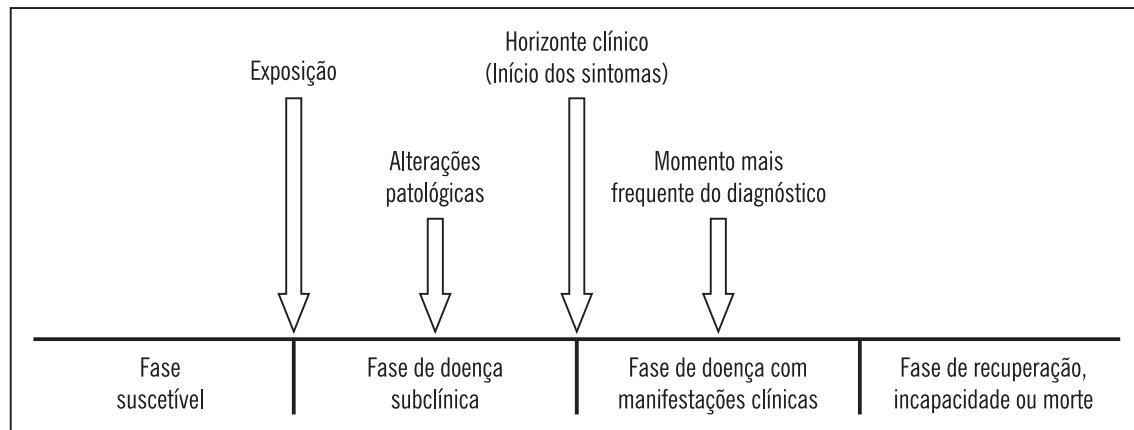
O conceito de *estrutura epidemiológica* facilita a compreensão do comportamento das doenças infecciosas na comunidade, ao passo que o de *história natural e de espectro clínico das doenças* aborda a mesma questão, mas no plano individual.

A história natural das doenças abrange o conhecimento da evolução da doença no indivíduo, na ausência de tratamento, em um período suficiente para que alcance um desfecho (cura ou óbito).

Esse processo, portanto, tem início com a exposição a fatores capazes de causar a doença e seu desenvolvimento se não houver a intervenção médica, e culminará com a recuperação, incapacidade (sequelas) ou morte. As fases da história natural das doenças são apresentadas na Figura 2.

Embora o tempo de evolução e as manifestações específicas possam variar de animal para animal, as características gerais da *história natural* de muitas doenças são bem conhecidas, permitindo a aplicação de medidas de intervenção (de prevenção ou terapêuticas) que podem alterar seu curso pela cura, pela diminuição da incapacidade ou pelo prolongamento da vida.

Figura 2. Esquema da história natural das doenças.



Fonte: Adaptado de Waldman (1998)^[9].

Nas doenças infecciosas, a história natural inicia-se com a exposição efetiva de um hospedeiro suscetível a um agente (microrganismo ou parasita). A partir desse momento, por via de regra tem-se um período de modificações anatômicas ou funcionais que caracterizam a fase subclínica ou inaparente, que terminará com o início dos sintomas. Essa fase é denominada *período de incubação*. Para as doenças crônicas, essa fase é chamada de *período de latência*.

Portanto, deve-se entender por período de incubação o intervalo entre a exposição efetiva do hospedeiro suscetível a um agente biológico e o início dos sinais e sintomas clínicos da doença nesse hospedeiro.

É importante assinalar que, embora as doenças infecciosas sejam inaparentes durante o período de incubação, algumas alterações patológicas podem ser detectadas durante essa fase por meio de métodos laboratoriais. Muitos programas de triagem (*screening*) têm por objetivo tentar identificar a doença nessa fase da *história natural* uma vez que, frequentemente, a intervenção nesse momento é mais eficaz.

O início dos sintomas – momento denominado *horizonte clínico* – marca a transição entre as fases subclínica e clínica da doença. Em boa parte dos casos, o diagnóstico ocorre nesse momento. No entanto, por variações individuais, em alguns animais o progresso da doença a partir da fase subclínica nem sempre se faz na direção da fase clínica e, mesmo quando isso ocorre, as manifestações podem variar amplamente no que tange ao grau de gravidade da doença.

O conhecimento do *espectro clínico* das doenças infecciosas é fundamental para se compreender seu comportamento na comunidade e, por decorrência, estabelecer medidas eficientes de controle. Quanto maior a proporção de casos inaparentes, maiores serão as dificuldades de conhecermos a cadeia do processo infeccioso e de identificarmos os principais responsáveis pela manutenção da transmissão da doença na comunidade.

4. RELAÇÃO DA EPIDEMIOLOGIA COM OUTRAS ÁREAS

A epidemiologia considera como sua unidade de interesse, portanto, o indivíduo ou um grupo de indivíduos, seja de uma população constituída de pessoas, seja de animais, incluindo-se os sadios, os doentes e os mortos.

Na investigação epidemiológica, são utilizadas ciências e disciplinas consideradas correlatas, ou de apoio, tais como: a bioestatística, para medir as situações na fase de observação e posteriormente em nível de avaliação; a clínica, como ponto de partida para o diagnóstico individual da enfermidade, a partir do qual se estabelecerá a orientação a se tomar; a patologia, a microbiologia, a parasitologia, a imunologia, a toxicologia, entre outras. Estas fornecem à epidemiologia o diagnóstico da situação. As ciências do comportamento humano, como a sociologia, a antropologia, a psicologia, a economia e a ecologia, entre outras, assumem também papéis de grande importância.

Mostrando a relação da epidemiologia com outras áreas do conhecimento^[4], argumenta sobre alguns dos princípios que regem a unificação da epidemiologia e da sua indissociabilidade da ecologia. Enfatiza, ainda, que a sociedade nada mais é do que o fenômeno ecológico cujos fundamentos devem ser procurados na própria característica da vida. Os componentes físicos e biológicos do ambiente onde vive o homem, e também os animais, somam-se aos da sociedade que se estabelecem, na determinação de seu estado de saúde e da qualidade de vida. De acordo com os conhecimentos atuais, ecologia e ambiente são termos usados quando o tema se refere ao bem-estar e à sobrevivência. A ecologia deve compreender o estudo de todos os fatores físicos e biológicos e de sua interação no meio em que vivem os organismos. O ambiente inclui desde a energia solar até o substrato representado pelo sol e os organismos que sobre ele vivem^[4].

5. SAÚDE E DOENÇA

A saúde e doença são idéias relativas e convencionais, e representam estados absolutamente opostos. O limite entre o estado de saúde e a doença é difícil de ser estabelecido. O indivíduo pode manter-se entre eles durante toda sua vida. A saúde é um estado de relativo equilíbrio da forma e da função do organismo, resultante de seu sucesso em ajustar-se às forças que tendem a perturbá-lo. Não se trata de uma aceitação passiva dessas forças por parte do organismo, mas de sua respostaativa para o seu reajusteamento.

A Organização Mundial da Saúde define como saúde: “*o estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não apenas a ausência de doença*”. É evidente a falta da precisão, em especial no que se refere ao significado da expressão “completo bem-estar”. Este pode variar de acordo com o indivíduo, com o tempo e com o espaço. Do ponto de vista médico, o que é bom para um não o é obrigatoriamente para outro, nem a presença de bem-estar significa a ausência de doença^[4].

O conceito de *saúde animal* refere-se ao “processo bioeconômico da população animal no tempo e no espaço, resultante das ações do homem para que a capacidade produtiva e reprodutiva dos rebanhos alcance níveis econômicos e sociais aceitáveis e compatíveis”. Por outro lado, *saudade animal* pode ser definida como “conjunto de condições que conduzem ao bem-estar e à saúde; higiene, salubridade”^[4]. A epidemiologia é um fator indispensável para a planificação e para o gerenciamento da saúde animal.

A doença, por sua vez, pode ser definida como um desajustamento ou falha nos mecanismos de adaptação do organismo ou, ainda, como a ausência de reação aos estímulos a que esse organismo está exposto. O processo conduz a uma perturbação da estrutura ou da função de um órgão, de um sistema ou de todo o organismo, interferindo em suas funções vitais. Pode significar ainda o conjunto combinado de sintomas, manifestação associada a determinada desordem estrutural ou funcional, ou então caracterizar fenômeno decorrente da ação de um ou mais agentes específicos.

Do ponto de vista etiológico, as doenças podem ser classificadas em infeciosas e não infeciosas. A Organização Mundial da Saúde (1973) conceitua *doença infeciosa* como uma doença, humana ou animal, clinicamente manifesta que resulta de uma *infecção*^[3]. Por sua vez, *in-*

fecção é a penetração, alojamento e, em geral, multiplicação de um agente etiológico animado no organismo de um hospedeiro, produzindo-lhe danos, com ou sem aparecimento de sintomas clínicamente reconhecíveis.

Em essência, a infecção é uma competição vital entre um agente etiológico animado (parasita sensu lato) e um hospedeiro; é, portanto uma luta pela sobrevivência entre dois seres vivos que visam à manutenção de sua espécie.

A doença infecciosa pode ser aguda, subaguda e crônica. A crônica é aquela que se desenvolve em longo prazo; e as subagudas e agudas são de curta duração. Deve-se levar em consideração, ainda, as doenças nutricionais e metabólicas, as parasitárias de forma geral, as tóxicas e ainda aquelas hereditárias, e outras que se devem a malformações, desenvolvidas durante os períodos embrionário e fetal, mas não herdáveis, sendo denominadas de doenças congênitas.

Com os avanços alcançados em biologia, microbiologia, entre outras áreas do conhecimento, estabeleceu-se o conceito ecológico de doença. Do ponto de vista ecológico, denomina-se **biocenose** a coabitação e a interferência dos seres vivos em determinada área física, incluindo os microrganismos que determinam o ecossistema, com a inclusão de fatores em interação e associações ambientais, como solo, água, clima e a presença do homem, considerando-se, portanto, o conjunto constituído pela comunidade e o ambiente onde se vive^[4]. O equilíbrio que vem a estabelecer-se entre as diversas espécies animais ou vegetais em uma determinada região caracteriza o fenômeno ecológico denominado *clímax*, que nada mais é do que a etapa do processo de sucessão ecológica representada pelo equilíbrio e pela estabilidade atingidos pela comunidade.

Um desequilíbrio ou uma consequência dele provoca um jogo de influências mútuas entre diversas variáveis ecológicas, que poderão resultar no estabelecimento do estado de doença. É importante, entretanto, considerar que a doença não é determinada única e exclusivamente pela presença de um agente infeccioso, mas sim pela interação entre *agente, hospedeiro e meio ambiente*, que pode ser representada graficamente por um triângulo equilátero, onde a ocorrência de qualquer modificação em um lado necessariamente implicará a modificação dos demais. Nenhum dos fatores poderá atuar de maneira isolada, ocorrendo, portanto, uma interação constante e dinâmica entre eles^[6]. Os componentes ecológicos das enfermidades (tríade ecológica) estão representados na Figura 3.

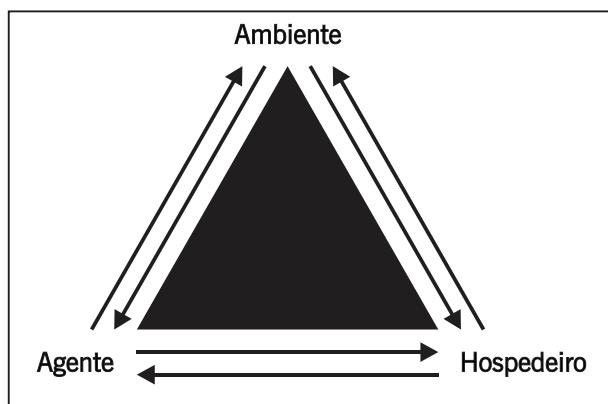


Figura 3. Componentes ecológicos das enfermidades - Tríade ecológica.

Na Figura 4 está representada a ilustração do esquema de equilíbrio/saúde e seu possível rompimento por diversas variáveis em jogo; pode ser favorável ao agente causal e estabelecer o estado de enfermidade.

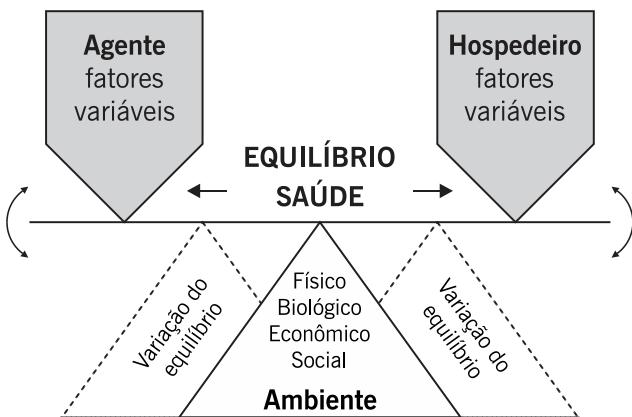


Figura 4. Interação entre o agente, hospedeiro e o meio ambiente.

Fonte: Adaptado de Dias (1984)^[2].

Os *agentes causais* podem ser biológicos, químicos ou físicos. Os *hospedeiros* apresentam variáveis que se relacionam com estado fisiológico e nutricional, defesas orgânicas, espécie, idade, sexo e raça. O *meio ambiente* apresenta fatores que influenciam – e estão relacionados com – o clima, a água, o solo, a topografia, a presença de insetos, a densidade populacional e o manejo.

Esses três elementos fundamentais que constituem o **processo epidêmico** (*cadeia do processo infeccioso*), bem como suas variáveis, se relacionam com qualquer tipo de doença quando se estuda esse fenômeno em populações. É importante considerá-los em conjunto para se estabelecer os níveis em que deverão ser adotadas as medidas objetivando-se o controle e a erradicação de determinada doença que esteja ocorrendo em dada população animal.

6. CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

Descrevem-se a seguir as principais características dos agentes biológicos, e em particular os de caráter infectocontagiosos. Os conhecimentos das características são fundamentais para se compreender suas inter-relações com o desenvolvimento da infecção, pois são elas que contribuem para que o agente infeccioso possa persistir em determinado sistema ecológico.

Os agentes apresentam uma série de características que interagem com o meio e com o hospedeiro, influenciando o comportamento das doenças infecciosas na comunidade. Entre eles, destacam-se:

a) **Infecciosidade:** capacidade de penetrar, alojar-se e multiplicar-se no organismo do hospedeiro e transmitir-se deste para um novo hospedeiro, ou seja, capacidade de causar infecção. Esta característica é fundamental na previsão da propagação da doença. São considerados de alta infecciosidade o vírus da febre aftosa, para os animais, e o vírus da raiva, para os animais e o homem. Considera-se de baixa infecciosidade o vírus da febre aftosa para o homem.

b) **Patogenicidade:** capacidade de um agente biológico causar doença em um hospedeiro suscetível. Pode-se dizer que é a capacidade de produzir lesões específicas no organismo hospedeiro. Agentes dotados de alta patogenicidade determinam incidência maior da doença na população. Ela é traduzida, portanto, pela frequência de casos clínicos no rebanho. São considerados de alta patogenicidade os agentes da raiva, da aftosa, da anemia infecciosa equina e da manqueira; e de baixa patogenicidade os da brucelose e tricomonose nos machos.

c) **Virulência:** grau de patogenicidade de um agente infeccioso que se expressa pela gravidade da doença, especialmente pela letalidade e proporção de casos com sequelas. São considerados de alta virulência os agentes da raiva e do tétano; e de baixa virulência, o agente da brucelose.

d) **Variabilidade:** capacidade de mudanças de características genéticas do agente, originando mutantes, como ocorre com o vírus da febre aftosa.

e) **Imunogenicidade (poder imunogênico):** capacidade do agente biológico de estimular a resposta imune no hospedeiro. Conforme as características desse agente, a imunidade obtida pode ser de curta ou longa duração, e de grau elevado ou baixo. São considerados de alta imunogenicidade o vírus do sarampo, o da varíola e o da cinomose; e de baixa imunogenicidade, os agentes da febre aftosa e da salmonelose.

f) **Valência ecológica:** capacidade de um agente sobreviver em um ou mais reservatórios. Quanto maior sua valência ecológica, maior será sua capacidade de perpetuação no ambiente; por decorrência, na mesma proporção crescerão as dificuldades de eliminação do agente.

g) **Resistência às condições do meio:** capacidade de sobreviver nas condições do meio ambiente e aos produtos químicos, como os antissépticos e os desinfetantes, por determinados períodos de tempo, na ausência de parasitismo. Essa característica condiciona, até certo ponto, as formas de transmissão. São altamente resistentes no ambiente as bactérias dos gêneros *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp., que causam doenças conhecidas como de origem *telúrica*, por se encontrarem no solo.

h) **Inóculo, ou dose infectante:** é a quantidade do agente que penetra no novo hospedeiro suscetível. Quanto maior o inóculo, maior a gravidade da doença e, geralmente, menor o período de incubação.

7. CARACTERÍSTICAS DO HOSPEDEIRO

Em um sentido amplo, o hospedeiro pode ser considerado como todo e qualquer ser vivo que albergue um agente em seu organismo, ou ainda o organismo que propicia alimento ou abrigo a organismo de outra espécie. São conhecidos dois tipos de hospedeiros:

Hospedeiro definitivo: é aquele onde o parasita atinge a maturidade, reproduzindo-se sexuadamente.

Hospedeiro intermediário: é o hospedeiro no qual o parasita desenvolve suas formas imaturas ou, para alguns, se reproduz assexuadamente.

Os fatores relativos ao hospedeiro, dentro do sistema ecológico, se relacionam às suas características, como espécie, raça, sexo, estado fisiológico, entre outros, e aquelas que dependem do agente e do meio ambiente, como densidade populacional, manejo e suscetibilidade.

a) **Espécie:** a suscetibilidade de uma espécie animal a um determinado agente etiológico, de maneira geral, é determinada pelas próprias características genéticas. Sendo assim, exemplifica-se: os equídeos são os únicos suscetíveis à anemia infecciosa equina; as aves, à doença de Newcastle; os animais bovinos, à febre aftosa; e os canídeos, os únicos suscetíveis à cinomose.

b) **Raça:** algumas raças de animais são mais suscetíveis que outras ante um mesmo agente etiológico. Isso também se deve às características genéticas da própria raça. Como exemplo, podemos citar as raças zebuínas, que se mostram mais resistentes à piroplasmose (tristeza parasitária) que outras, principalmente as raças leiteiras.

c) **Sexo:** observa-se que ocorre um distinto comportamento de ambos os sexos para um mesmo agente etiológico. Isso se deve às características anatômicas, o que permitirá ou não o desenvolvimento de uma infecção. A brucelose afeta mais comumente as fêmeas do que os machos.

d) **Idade:** existem doenças que incidem mais em animais jovens, enquanto outras, em adultos. Para a maioria das doenças infectocontagiosas, a suscetibilidade do hospedeiro está em função da idade. A salmonelose em bovinos ocorre geralmente entre o 3º e 12º mês de vida do

animal, podendo ocorrer também, entretanto, com menor frequência, na primeira semana de vida. As diarreias por rotavírus são mais frequentes em animais neonatos, ou seja, recém-nascidos, bem como nas primeiras semanas de vida. A brucelose é uma doença de animais púberes (sexualmente maduros), sendo “autolimitante” em animais jovens, e a manqueira, conhecida também como carbúnculo sintomático, em bovinos, acomete mais frequentemente animais jovens, até os dois anos de idade.

e) **Estado fisiológico:** o estado fisiológico pode influenciar na suscetibilidade dos animais. As deficiências nutricionais, a fadiga, o estresse e a gestação podem diminuir a resistência dos animais, tornando-os mais predispostos a enfermidades.

f) **Densidade populacional, ou lotação:** a densidade populacional está intimamente relacionada ao manejo. A densidade dos animais em uma determinada área constitui um dos fatores principais para o desenvolvimento e a propagação das doenças. A lotação com excesso de animais numa área determina, em grande parte, maior risco de contaminação entre os animais pelas maiores chances de contato efetivo entre os hospedeiros.

g) **Resistência dos animais:** define-se como o conjunto de defesas específicas e inespecíficas que o animal possui. A resistência natural, ou inespecífica, é aquela em que o organismo independe do estímulo específico e que, portanto, existe previamente ao contato com o agente. Ela ocorre por características anatômicas e fisiológicas do animal. Não depende de reações teciduais ou de anticorpos. Por exemplo, a galinha é refratária ao carbúnculo, e os urubus, ao botulismo.

A resistência específica designa a resistência do organismo a determinado agente. Ela pode ser passiva, quando resultante da transferência de anticorpos produzidos em outro organismo, ou ativa, quando for elaborada pelo próprio organismo. Esses dois casos se referem à imunidade que pode ser *ativa* ou *passiva*.

É denominada *imunidade passiva* quando o organismo hospedeiro recebe os anticorpos previamente elaborados. Pode ser *natural* (congênita), como no caso da via transplacentária ou ingestão do colostrum, e pela gema de ovos nas aves; e *artificial* (soroterapia) para os antissoros específicos, como soro antiofídico e antitetânico.

A *imunidade ativa* é aquela que ocorre quando o organismo hospedeiro participaativamente na formação dos anticorpos. Pode ser *natural* (pós-infecção), pelo contato com determinado antígeno e desenvolvimento de infecção ou doença, havendo a formação de anticorpos específicos, e *artificial*, pela utilização de vacinas, que da mesma forma eliciará imunidade, pela sensibilização do organismo em face da ação antigênica.

8. CARACTERÍSTICAS DO AMBIENTE

As doenças infecciosas são significativamente influenciadas pelo ambiente. O meio ambiente pode favorecer a evolução ou o declínio de uma determinada doença na população animal. Consideram-se três fatores ou elementos do meio ambiente, que são: *fatores físicos*, *biológicos* e *socioeconômicos*. Tanto o ambiente físico como o biológico, e em particular o socioeconômico, possuem características críticas para o desenvolvimento epidêmico de algumas doenças. Esses fatores se encontram em permanente intercâmbio, de forma dinâmica, sendo seus efeitos sobre o agente ou sobre o hospedeiro variáveis a cada instante.

Entre os *fatores físicos* relevantes do meio ambiente que devem ser considerados, estão:

a) **Temperatura:** nas épocas frias do ano, a incidência de enfermidades do sistema respiratório dos animais é maior; pois a instalação, e propagação das doenças são facilitadas pela ba-

xa temperatura, e pela aglomeração dos animais. Por outro lado, no verão, com temperatura mais alta, observa-se uma ocorrência maior de afecções gastrointestinais, normalmente traduzidas por diarréias.

b) **Calor e umidade:** favorecem a manutenção e propagação de doenças, cujos agentes etiológicos necessitam de tais condições para sua proliferação e sobrevivência. A incidência de verminose e de *foot-rot* é maior nos animais criados em terrenos alagadiços, com umidade excessiva. A ocorrência de doenças veiculadas por vetores, como a anaplasmosse e babesiose, transmitidas pelos carrapatos é maior nas épocas quentes do ano, como na primavera e verão, em função das condições favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos.

c) **Topografia:** a topografia do solo poderá predispor ao acúmulo de água estagnada tornando-o úmido, favorecendo a manutenção e o desenvolvimento de ovos e larvas de helmintos, ou de outros agentes causadores de doenças.

d) **Composição do solo:** os solos deficientes em elementos minerais podem influenciar a qualidade das gramíneas ou leguminosas cultivadas nestes locais, tornando-as deficientes em seus elementos minerais, podendo causar nos animais as chamadas doenças *carenciais e metabólicas*, como: o raquitismo, osteomalácia, marasmo enzoótico, entre outras.

Com relação aos *fatores biológicos* destacam-se:

a) **Artrópodes:** encontrando condições adequadas para a sua multiplicação e desenvolvimento no meio ambiente, serão maiores as possibilidades de transmissão de doenças aos animais, como a babesiose, anaplasmosse, e encefalites.

b) **Roedores:** a existência de ambientes propícios e não higiênicos, com abrigo, água e alimentos à disposição, favorecem a proliferação de roedores, aumentando as possibilidades de transmissão de doenças veiculadas por estes animais, tais como: a leptospirose, salmonelose e hantavirose.

c) **Reservatórios:** quanto maior o número de reservatórios no meio ambiente, maior a probabilidade de propagação de determinadas doenças, como é o caso da raiva rural, raiva urbana, doença de Aujeszky, sendo os principais reservatórios para estas doenças, o morcego, cão e suíno, respectivamente.

d) **Animais suscetíveis:** existindo um maior número de hospedeiros suscetíveis no local, serão maiores as chances de propagação de doenças.

e) **Hospedeiros intermediários:** da mesma forma que para os animais suscetíveis, quanto maior o número de hospedeiros intermediários numa região, maior a possibilidade de disseminação de doenças. É o caso da cisticercose nos suínos, e da hidatidose nos ovinos.

Os fatores sócio-econômicos do ambiente apresentam grande importância no estudo epidemiológico, pois mesmo usando os métodos disponíveis mais sofisticados, de prevenção de doenças, se as pessoas envolvidas, por exemplo, em determinado programa de controle, não entendem, os métodos ou técnicas utilizadas estarão prejudicados. Portanto, no controle e prevenção de doenças, a *educação sanitária*, é um fator importante a ser considerado. O grau de participação da comunidade nas campanhas sanitárias é fator decisivo no êxito das mesmas.

Na implantação de um programa de saúde animal, é importante que se considere os aspectos relacionados a fatores sócio-econômicos, tais como:

- O nível cultural e econômico do criador ou da comunidade.
- As condições higiênico-sanitárias da propriedade.
- O tamanho e distribuição das propriedades.
- O manejo e tipo de sistema de produção.
- O nível de tecnificação agropecuária.

9. VIGILÂNCIA SANITÁRIA E EPIDEMIOLÓGICA

A *vigilância sanitária* consiste na observação contínua do estado de saúde dos animais nas propriedades, nas movimentações (entrada, saída e trânsito), e quando das concentrações dos mesmos (exposições, feiras, torneios, rodeios, leilões e outros).

A *vigilância epidemiológica* é o conjunto de ações que impedem a introdução de um agente em um determinado ambiente e sua disseminação. São ações de Defesa Sanitária Animal (DSA) desenvolvidas por meio de estudos epidemiológicos em uma determinada região visando a saúde de uma determinada população animal.

A importância da vigilância epidemiológica é manter a saúde dos animais com o objetivo de certificação de propriedades e reconhecimento de zonas livres de doenças e sua manutenção.

Caracterizada como uma atividade de natureza sistemática e permanente, que visa antecipar-se aos eventos relativos à presença de doenças em populações, a *Vigilância Epidemiológica* tem como objetivo básico a obtenção contínua e oportuna de conhecimentos acerca dos componentes envolvidos com as condições de saúde e a ocorrência de doenças, visando oferecer elementos de apoio aos programas de prevenção, tanto na instância de controle como na de erradicação. Por sua natureza abrangente, ela consubstancia-se como uma atividade holística, multidisciplinar, institucional e profissional de tal relevância que tem sido considerada como o procedimento-chave dos sistemas nacionais de saúde (animal e humana). Tem como instrumento primordial o Levantamento Epidemiológico e seus recursos de obtenção de dados incluem, não apenas os mecanismos da vigilância passiva, como notificação, registros, rumores e enquetes, mas também os da vigilância ativa, com seus procedimentos diretos e indiretos; os da vigilância sanitária, que acompanha os eventuais casos surgidos até sua completa extinção e os do monitoramento, que se configura como uma atividade mais específica orientada para obter esclarecimentos adicionais relativos a determinado aspecto de um padrão epidemiológico ou do próprio desempenho de uma ação sanitária^[1].

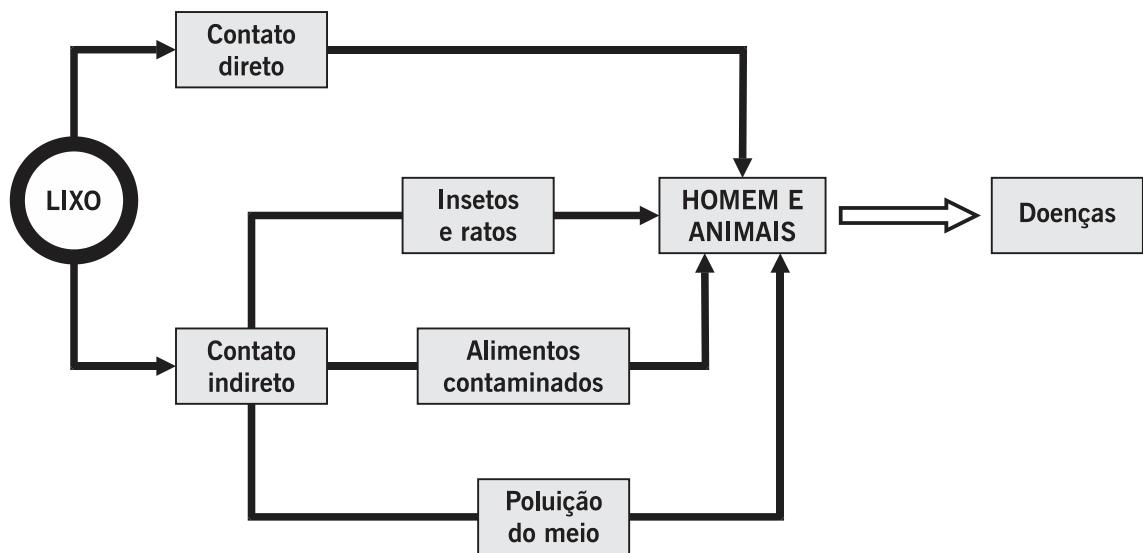
10. SANEAMENTO

Entre as atividades relacionadas à saúde animal e saúde pública, o saneamento é um dos mais importantes meios de prevenção de doenças. É definido pela Organização Mundial da Saúde, como: “o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeito deletério sobre o seu bem-estar físico, mental ou social”. Como definição clássica pode-se dizer que o saneamento é o *conjunto de medidas que visam a preservação ou modificação das condições ambientais, objetivando a prevenção de doenças, e consequentemente a promoção da saúde*.

Acredita-se que o processo de saneamento tenha significado desde 500 anos a.C., quando já existia o conceito de que a água fervida era importante na prevenção de doenças. Até que a teoria dos microrganismos de Louis Pasteur estivesse estabelecida, acreditava-se que as doenças eram transmitidas por odores. A desinfecção da água e do esgoto surgiu em épocas mais remotas, com a ideia de se controlar estes odores, para se evitar a ocorrência de doenças.

São muitas as doenças que podem evoluir pela carência de medidas de saneamento. A não disponibilidade de água de boa qualidade para dessedentação dos animais, a má disposição dos dejetos, e o inadequado destino do lixo, são alguns exemplos de fatores, que contribuem para uma maior ocorrência de doenças. As principais vias de contato do homem e animais com o lixo e sua consequência são mostradas na Figura 5.

Figura 5. Vias de contato do homem e animais com o lixo.



Fonte: Adaptado de Rouquayrol (1983)^[7].

Ziegler et al. (1994), desenvolveram estudo sobre saneamento rural em propriedades no município de Londrina/PR, com ênfase às condições de potabilidade da água, o destino de excretas e do lixo, e a problemática dos roedores. Os resultados obtidos foram os seguintes: a) 76,6% das propriedades apresentaram amostras de água contaminada por coliformes fecais, representando risco para a saúde da população; b) 46,7% da água consumida pela população tem como procedência os poços rasos, 30% provém de minas (fontes) e 23,3% de poços artesianos; c) 92,8% dos poços rasos, 57,1% dos poços artesianos e 77,7% das minas apresentavam-se impróprias para o consumo; d) em 90,0% das propriedades a água era consumida *in natura*; e) em 6,7% das propriedades, o destino de excretas humanas era realizado a céu aberto e apenas 6,6% das propriedades apresentavam estrumeiras para as excretas animais; f) em 80,0% das propriedades os roedores causavam prejuízos, embora em 70,0% das mesmas era realizado o seu controle; g) em relação ao lixo, 46,7% era queimados, 33,3% depositado a céu aberto e 20,0% enterrado. Os autores recomendam que se realizem programas de educação sanitária enfocando o saneamento rural para a população envolvida.

O saneamento tem sua área de atuação ampla, que tende a aumentar, principalmente, devido à necessidade de controlar a ação do homem sobre o ambiente, cada vez mais intensa. As principais atividades relacionadas ao saneamento são: abastecimento de água, manejo de dejetos, coleta e destino adequado do lixo, controle dos alimentos, controle de insetos e roedores. Outras atividades são incorporadas, como o controle da poluição ambiental, em suas diversas modalidades: do solo, ar, instalações, entre outras.

Os problemas ambientais, decorrentes do crescimento populacional e do desenvolvimento industrial, exigem soluções técnicas de saneamento cada vez mais aperfeiçoadas e eficazes. Assim, além das soluções básicas e consagradas, novos estudos e pesquisas são desenvolvidos para encontrar meios de garantir ao homem e aos animais, um ambiente de vida saudável.

Entre esses problemas vem se destacando o da destinação de resíduos orgânicos e agroindustriais provenientes de setores produtivos, tanto da agricultura como da pecuária. Grandes quantidades de esterco, produzidas por animais em regime de confinamento, como bovinos, suínos e

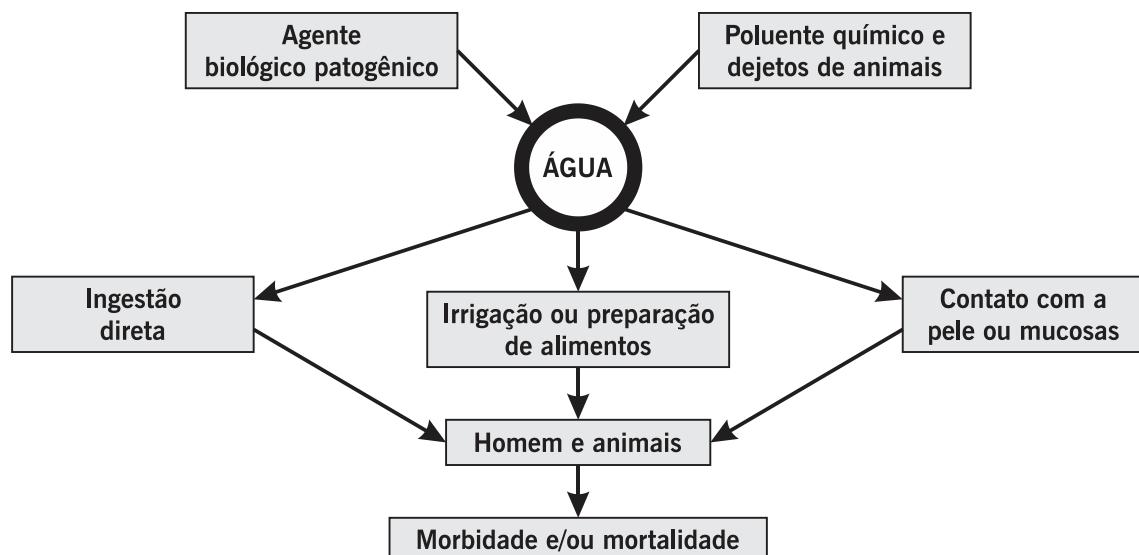
aves, por exemplo, trouxe vários inconvenientes, como mau cheiro, infestação de moscas, produção de *chorume*, este último podendo contaminar os lençóis freáticos, além de ser potencialmente focos para a manutenção de insetos transmissores de doenças, e poder poluir rios e córregos.

O destino adequado de resíduos das agroindústrias continua sendo um problema no meio rural. Alguns desses resíduos, como o vinhoto, que é o produto do processamento da cana nas destilarias de álcool, sendo altamente poluentes quando despejados em quantidades excessivas nos locais que os recebem.

Efeito também poluidor tem os agrotóxicos e outros produtos bioquímicos, como os fertilizantes, quando carreados para rios e córregos por força das enxurradas.

A Figura 6 ilustra a interação de elementos e de como a água poderia veicular doenças para o homem e animais.

Figura 6. Veiculação de doenças pela água



Fonte: Adaptado de Rouquayrol (1983)^[7].

Deve-se evitar que os animais tenham acesso a lugares sujeito ao acúmulo de água estagnada, ou alagadiços. A drenagem do terreno consiste na remoção do excesso de água existente nas camadas superiores, objetivando a recuperação do solo para a agricultura, consolidação do terreno e saneamento. Um efeito direto desta ação é o controle de insetos, especialmente moscas e mosquitos, evitando-se a disseminação de focos destes, que são vetores potencialmente transmissores de doenças aos animais e ao homem.

11. EDUCAÇÃO PARA A SAÚDE

Educação sanitária é o processo pelo qual pessoas ou grupos de pessoas aprendem a promover, manter ou restaurar a saúde. Para lograr este objetivo é necessário que nos métodos e técnicas empregados se tomem em consideração as maneiras pelas quais elas moldam sua conduta, os fatores que as induzem a conservar ou modificar os hábitos adquiridos, e os modos pelos quais

elas adquirem e utilizam seus conhecimentos. Assim, a educação sanitária deve inicialmente considerá-las tais como são, com o interesse que possam ter em melhorar suas condições de vida. Seu objetivo é desenvolver nas mesmas um sentido de responsabilidade para com a saúde, como indivíduos e como membros de uma família e de uma comunidade. No controle das doenças transmissíveis, a educação sanitária compreende a avaliação dos conhecimentos que a população tem de uma doença, o estudo dos hábitos e atitudes desta no que se refere à sua disseminação e frequência, e a divulgação de meios específicos para remediar as deficiências observadas.

A educação sanitária como meio principal de promover a saúde é, juntamente com os modos e meios de proteção específica da mesma, o alicerce da ação primária, segundo os níveis de prevenção e aplicação das ações de saúde. O papel dos técnicos envolvidos nas atividades de produção animal, que estarão cada vez mais exercendo a medicina veterinária preventiva na fazenda, inclui o aconselhamento quanto à administração e manejo, com o propósito de manter e melhorar a saúde e o bem-estar dos animais, a higiene de seus produtos, visando sua melhor qualidade, bem como a produtividade, com adequado rendimento econômico.

Estas medidas não se referem somente ao animal, mas sim com uma ação direta sobre o meio ambiente como a orientação quanto ao lixo doméstico, que deverá ser depositado em recipiente com tampa, e, também, colocado em local distante de produtos alimentícios, e que as lixeiras deverão ser esvaziadas frequentemente. Associada ainda a presença de lixo, deverá ser investigada a existência de rastros ou sinais que indiquem a presença de roedores na propriedade, e qual o melhor método para combatê-los. Finalizando, relacionamos ainda, entre tantas outras ações que devem ser enfatizadas em um programa de educação para saúde em nível de propriedade rural, a importância do controle de resíduos sólidos, enfatizando que o esterco gerado em atividades agropecuárias e em animais domésticos deverá ser corretamente armazenado e poderá ser utilizado como adubo, e ainda, que os animais mortos (carcaças) devem ser eliminados por enterramento, compostagem ou cremação (incineração), evitando-se com esta medida, o risco das zoonoses, a poluição do meio ambiente, a proliferação de insetos, e de outros animais nocivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CÔRTES, J.A. **Vigilância epidemiológica como instrumento essencial para a sanidade animal e a saúde pública.** Revista de Educação Continuada. CRMV-SP. v. 5, fascículo 1, p. 109-123, 2002.
2. DIAS, J.C.A **Epidemiologia geral.** In: GUERREIRO, Milton G. et al. Bacteriologia especial: com interesse em saúde animal e saúde pública. Porto Alegre: Sulina, cap. 7, p. 102-116, 1984. 492p.
3. FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Epidemiologia geral.** São Paulo: Artes Médicas, 1980, 259p.
4. FORATTINI, O.P. **Ecologia, Epidemiologia e sociedade.** São Paulo: Artes Médicas, Editora da Universidade de São Paulo-EDUSP, 1992. 529p.
5. HOUAISS, A.; VILLAR, M. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.
6. MARTINS, F.A. Aspectos epidemiológicos do combate à febre aftosa. Ministério da Agricultura, 1975, 68p.
7. ROUQUAYROL, M.Z. **Epidemiologia & saúde.** Fortaleza:UNIFOR, 1983. 327p.
8. THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.
9. WALDMAN, E.A.; ROSA, T.E.C. **Vigilância em saúde pública.** São Paulo: Editora Fundação Petrópolis, v. 7, 1998. 267p.

10. ZIEGLER, J.C.S., LERMEN, C., BEZERRA DOS SANTOS, L. **Estudo sobre saneamento rural em propriedades da Colônia Coroados, em 1993, Londrina, Paraná.** In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, XXIII, Olinda, PE, 1994. Anais... Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, 1994. p. 275.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BENENSON, A.S. **Controle das doenças transmissíveis no homem.** 13. ed. Washington: Publicação Científica – Organização Pan-Americana da Saúde, n. 442, 1983. 420p.
- BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** 23. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1234p.
- CORRÊA, W.M.; CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 843p.
- CÔRTÈS, J.A. **Epidemiologia: Conceitos e princípios fundamentais.** São Paulo: Varela, 1993. 227p.
- DOMINGUES, P.F; LANGONI, H. **Manejo sanitário animal.** Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 210p.
- LESER, W.; BARBOSA, V.; BARUZZI, R.G. **Elementos de Epidemiologia geral.** Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. 178p.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Programa marco de atenção ao meio ambiente.** OPAS/BRA/HEP/009/97, 1998. 260p.
- RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C. **Manual de controle da saúde e produção dos animais.** São Paulo: Manole, 1986. 530p.
- ROUQUAYROL, M.Z. **Epidemiologia e saúde.** 3. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, cap. 12, p. 343-64, 1994. 492p.
- ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e saúde.** 6. ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. 708p.

CAPÍTULO 2

PRINCIPIAS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO

Cátia Silene Klein

Iara Maria Trevisol

Luizinho Caron

Ubirajara Maciel da Costa

Álvaro Menin

Dependendo da necessidade diagnóstica, o médico-veterinário deve lançar mão de ferramentas de análise diagnóstica específicas para atender suas necessidades. As principais aplicações dos testes de diagnóstico laboratorial incluem: (I) detecção específica do antígeno (agente) e animais portadores; (II) detecção de resposta imune do hospedeiro (avaliação da imunidade; monitoramento sorológico simples ou seriado; perfil sorológico e avaliação de programas de vacinação); (III) confirmação de suspeita clínica com monitoria da saúde coletiva ou individual; (IV) controle de qualidade de produtos biológicos; (V) garantia da segurança alimentar; (VI) controle da qualidade de matérias-primas e insumos veterinários; (VII) obtenção de cepas bacterianas ou virais para a produção de vacinas; (VIII) certificação de regiões ou rebanhos como isentos de determinadas enfermidades.

Métodos diretos - visam à detecção do agente causador da doença ou antígeno e suas alterações microscópicas, sejam as patologias causadas por bactéria, vírus ou protozoário: isolamento bacteriano, micológico ou viral, exame histopatológico, exame citológico, exame parasitológico, exame toxicológico, imuno-histoquímica, imunofluorescência (IF) e reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Métodos indiretos - visam à detecção dos anticorpos, ou seja, à resposta do animal em face de determinada infecção: Elisa, soroaglutinação microscópica, inibição da hemoaglutinação (HI), aglutinação em placa com antígeno acidificado tamponado, reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Métodos para determinação da condição clínica do indivíduo - destinados a monitorar o estado de higiene ou de recuperação do animal: exames hematológicos e exame físico-químico de urina.

As principais metodologias aplicadas ao diagnóstico veterinário são descritas neste capítulo.

1. EXAME BACTERIOLÓGICO

A pesquisa bacteriológica é o método mais importante, seguro, rápido e de baixo custo para diagnóstico, controle do tratamento e vigilância de resistência para a maioria das bactérias de interesse clínico. Tem sido aplicado como uma importante ferramenta para fornecer subsídios para prevenção, controle e tratamento de muitas enfermidades infecciosas dos animais ao longo dos tempos. Nos últimos anos, com a aplicação de tecnologias modernas e versáteis, o diagnóstico laboratorial tem sido uma constante para os profissionais mais atualizados.

As técnicas de isolamento bacteriano são amplamente utilizadas em medicina veterinária para fins de diagnóstico. As metodologias envolvidas são consagradas pelo uso e variam bastante em relação aos diferentes agentes pesquisados ou às rotinas dos laboratórios.

A maioria das bactérias patogênicas possui protocolo de isolamento bastante padronizado, com resultados confiáveis. Entretanto, fatores como antibioticoterapia prévia, má conservação das amostras e erros na coleta dos materiais podem levar a resultados falso-negativos. Existem também bactérias para as quais o isolamento só tem sido aplicado em situações excepcionais e, na maioria das vezes, para fins de pesquisa.

2. EXAME MICOLÓGICO

O diagnóstico micológico definitivo é obtido laboratorialmente. No exame micológico o fungo deve ser isolado em cultivo e posteriormente identificado ao microscópio. Para tanto, é necessário obter uma amostra apropriada. É conveniente que a coleta seja feita no próprio laboratório; caso contrário, deve-se, durante a coleta, ter o máximo de assepsia e enviar o mais rápido possível para o laboratório, tendo o cuidado de ela estar bem identificada e conservada em recipiente estéril e bem fechado.

3. EXAME HISTOPATOLÓGICO

O exame histopatológico é um dos exames laboratoriais mais frequentemente utilizado na rotina diagnóstica. É rápido e de baixo custo, e permite estabelecer a extensão, evolução e severidade lesional. Apesar de a forma presuntiva sugerir a provável causa do processo patológico na maioria das vezes, não permite a identificação precisa do agente etiológico envolvido. Apesar de possibilitar o diagnóstico definitivo de inúmeras enfermidades tendo como base a ocorrência de lesões patognomônicas ou específicas, o exame histopatológico é muito empregado na rotina de diagnóstico como exame complementar ou diferencial obrigatório para uma série de casos.

4. EXAME CITOLOGICO

O exame citológico é muito empregado na rotina de diagnóstico clínico e laboratorial. Consiste de uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e que exige pequena quantidade de material para ser analisado. Os métodos de coleta de material são: punção aspirativa, impressões (*claps* ou *imprints*), esmagamento (*squash*) e raspados ou esfregaços.

Por não permitir a visualização da arquitetura do tecido estudado, como ocorre no exame histopatológico, é indicada particularmente para diferenciar processos inflamatórios agudos ou crônicos e neoplásicos benignos ou malignos.

5. EXAMES PARASITOLÓGICOS

A metodologia empregada na pesquisa de hemoparasitos, ectoparasitos e endoparasitos e seus ovos ou oocistos variam de acordo com o objetivo do exame e com a rotina laboratorial. Normalmente, são empregadas técnicas simples e bem estabelecidas que geram resultados consistentes e confiáveis.

6. EXAME TOXICOLÓGICO

O exame toxicológico deve ser de eleição sempre que um ou vários animais adoecem ou morrem de forma súbita e não apresentam nenhum sinal clínico que remeta a uma doença infeciosa. No caso de animais mortos, devem ser remetidos para exame toxicológico no mínimo 80g de cada órgão, sob refrigeração ou congelados e acondicionados separadamente em saco plástico bem limpo. As amostras não devem ser lavadas para evitar a possibilidade de arrastar resíduos de agentes químicos ou de se contaminarem pela água. Considerando animais vivos, remeter ao laboratório 50ml de urina e 5ml de sangue sob refrigeração. O sangue deve ser acondicionado em frasco contendo heparina (1mg/5 ml) ou citrato de lítio (15mg/5 ml).

Para a detecção de componentes tóxicos em substratos como ração, milho ou feno com suspeita de contaminação, devem ser enviados 100g de cada um, sob refrigeração ou congelados.

7. ENSAIOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica (IHQ) é um ensaio *imunodiagnóstico* cada vez mais utilizado na rotina diagnóstica, pois é relativamente barato, rápido, sensível, e menos trabalhoso que muitos procedimentos de isolamento microbiológicos tradicionais. Vários agentes infecciosos (vírus, bactérias, parasitos e fungos) podem ser detectados por esta técnica, que depende da ligação de imunoglobulinas a抗ígenos alvo. A técnica pode ser convencionalmente denominada imuno-histoquímica ou imunocitoquímica quando se utilizam como substrato cortes teciduais e culturas celulares/esfregaços respectivamente. As proteínas são os principais抗ígenos detectados pela técnica. Entretanto, carboidratos, ácidos nucleicos, lipídeos e outros componentes antigênicos também podem ser reconhecidos como alvos^[8,86].

Duas modalidades de anticorpos podem ser utilizadas na imuno-histoquímica/imunocitoquímica: os anticorpos policlonais, com a capacidade de se ligar a vários epítopos de um抗ígeno (por exemplo, anticorpos policlonais contra lipopolissacarídeo de *E. coli*, capazes de reconhecer diferentes espécies de bactérias Gram-negativas), e anticorpos monoclonais, que possuem a importante propriedade de reconhecer um único epítopo de um抗ígeno específico^[86].

Todos os procedimentos de coleta e fixação de amostras para a imuno-histoquímica são exatamente os mesmos utilizados para o exame histopatológico; a diferença está, basicamente, no procedimento de coloração após a fixação do corte tecidual na lâmina^[21,86]. Enquanto as técnicas histológicas se baseiam na evidência das propriedades tintoriais das células e dos tecidos, a imuno-histoquímica se utiliza da especificidade de anticorpos para a detecção de抗ígenos alvo^[87].

A imuno-histoquímica, normalmente, é conduzida em tecidos fixados em formol. Entretanto, tecidos congelados também podem ser utilizados desde que cuidadosamente imersos em resinas específicas que possibilitam o corte utilizando criostatos.

Um fator importante a ser considerado no momento de se optar pela imuno-histoquímica como ferramenta diagnóstica é o tempo decorrido entre a morte do animal e a coleta da amostra clínica, pois a decomposição *post-mortem* pode gerar tanto falso-positivos quanto falso-negativos. Outros fatores que influenciam a qualidade do ensaio são: tipo de tecido (tecidos ricos em enzimas, como intestino e pâncreas, sofrem autólise muito rápido), tipo de antígeno (protozoários e fungos são provavelmente mais resistentes à autólise que vírus) e a própria distribuição do antígeno no tecido ou células, dada a possibilidade de *intracelularidade* ou *extracelularidade*^[103,104].

São várias as etapas limitantes a ser implementadas em um ensaio de imuno-histoquímica. De modo geral, para tecidos fixados em formaldeído, são necessários procedimentos para que os抗ígenos possam ser reconhecidos pelo anticorpo. Esses passos são descritos como reativação antigênica^[39,86,98].

A reativação antigênica pode ser realizada utilizando detergentes (Tween 20, saponina, guanidina e tiocianato de sódio); digestão enzimática (tripsina, proteinase K, pronase E); ou induzida pelo calor. Em seguida, fazem-se necessários o bloqueio de peroxidases endógenas (peroxidase, alcalina, fosfatases, etc.) e o bloqueio das reações inespecíficas para impedir as marcações inespecíficas e, consequentemente, o aparecimento do *background*^[21,43,103]. Para o bloqueio das peroxidases, geralmente são usados sais, já no bloqueio das reações inespecíficas podem ser usadas substâncias como leite em pó desnatado, albumina sérica bovina ou soro normal inativado^[39,87].

Basicamente, três sistemas de geração de sinais são empregados nos ensaios de imuno-histoquímica: utilizando como base fluorocromos, metais (ouro coloidal) e, principalmente, enzimas. O sistema enzimático é mais comumente utilizado, e emprega enzimas como *horseradish* peroxidase, fosfatase alcalina, glucose oxidase e β-galactosidase^[8,86]. Essas enzimas, dependendo de seu substrato histoquímico e do cromógeno de captura, podem produzir marcações de diferentes cores (por exemplo, marrom, azul ou vermelho), visíveis em microscópio ótico.

O principal objetivo de um teste de imuno-histoquímica é ser sensível o suficiente para demonstrar uma ligação antígeno-anticorpo específica em uma secção de tecido. Sendo assim, esse teste pode ser usado como um método direto, indireto ou em múltiplas camadas^[39].

O método direto emprega um único anticorpo marcado contra um antígeno alvo. Normalmente são utilizados anticorpos com marcadores fluorescentes ou enzimáticos. Esse método deve, preferencialmente, ser empregado em secções de tecido congelado. Essa metodologia tem baixa sensibilidade se comparada com outros sistemas^[8,86]. No método indireto, utiliza-se um anticorpo não marcado contra um antígeno alvo e um anticorpo (“anti-anticorpo”). Neste caso, o número de moléculas sinalizadoras (enzimas) sobre o antígeno alvo é maior que no método direto, aumentando a sensibilidade do teste.

O ensaio de múltiplas camadas inclui os métodos avidina-biotina (ABC) e peroxidase-anti-peroxidase (PAP). Ambos os ensaios são amplamente empregados no diagnóstico de doenças infecciosas, principalmente quando são utilizados tecidos fixados em formol. O ensaio envolvendo ABC depende da afinidade extremamente elevada entre a avidina, uma glicoproteína da clara do ovo, e a biotina, uma vitamina. Neste, o anticorpo primário não é marcado e o secundário é um anticorpo biotinilado^[8,21,86]. A terceira camada é formada por um complexo de avidina associada a biotina, que é marcada por exemplo, com uma enzima ou fluorocromo. No ensaio PAP, o anticorpo primário e o secundário não são marcados. O anticorpo secundário serve de ponte entre o primário e terciário, que consiste em imunoglobulinas que reconhecem – ou se ligam a – moléculas de peroxidase^[21,39]. Este método é cem a mil vezes mais sensível que o método indireto, entretanto, é menos específico^[87].

São inúmeras as aplicações destes ensaios na rotina diagnóstica buscando a detecção de agentes infecciosos de interesse veterinário (vírus, bactérias, parasitos e fungos) ou抗ígenos alvo. No Quadro 1 é possível visualizar possíveis aplicações desses ensaios.

Quadro 1. Aplicações dos ensaios de imuno-histoquímica no diagnóstico de agentes infecciosos de interesse veterinário.

Espécie animal	Agente infeccioso viral	Agente infeccioso bacteriano
Suínos	Vírus da gastroenterite transmissível; vírus da influenza; vírus da peste africana e da clássica; vírus da PRRS; circovírus, entre outros	<i>Haemophilus parasuis; Salmonella spp.; Pasteurella multocida; Streptococcus suis; Mycoplasma hyopneumoniae; Staphylococcus hyicus; Erysipelothrix rhusiopathiae; Actinobacillus pleuropneumoniae; Brachyspira spp., etc.</i>
Aves	Vírus da influenza; vírus da doença de newcastle; vírus da doença de gumboro; reovírus aviário, etc.	<i>Mycoplasma synoviae; Mycoplasma gallisepticum</i>
Cães	Vírus da cinomose; rotavírus; parvovírus; vírus da hepatite; vírus da traqueobronquite infecciosa canina; vírus da raiva	<i>Leptospira spp.; Micobacterium spp.</i>
Gatos	Rotavírus; parvovírus; vírus da imunodeficiência felina; vírus da leucemia felina; vírus da rinotraqueite viral felina	<i>Yersinia pestis; Haemobartonella felis; Leptospira spp.</i>

8. IMUNOFLUORESCÊNCIA

A reação de imunofluorescência (IF) é amplamente utilizada na identificação de vários agentes infecciosos, principalmente virais, possuindo grande especificidade e sensibilidade^[16, 35, 54]. A descoberta de que substâncias fluorescentes poderiam ser ligadas a anticorpos, sem prejudicar sua função na ligação de抗ígenos, foi demonstrada em 1941 por Albert Coons e colaboradores. Coons demonstrou que marcadores fluorescentes ligados a anticorpos poderiam ser visualizados através de um microscópio com iluminação ultravioleta (Figura 1) possibilitando, teoricamente, a detecção de células infectadas por vírus em material obtido diretamente do paciente. Entretanto, existia um limitante à técnica: produção de um soro de boa qualidade, ou seja, com alto título de anticorpos e boa especificidade. Assim, soros com alto título possuíam anticorpos com uma grande gama de reações inespecíficas e acabavam ligando-se a uma miscelânea de抗ígenos^[54].

Com esses problemas, muitos pesquisadores tentaram o uso da IF, mas, devido à falta de validação dos testes, não houve progresso na utilização da técnica, que foi abandonada por alguns grupos. Porém, alguns persistentes pesquisadores, como Philip Gardner, Joyce McQuillin e colaboradores, em Newcastle, conseguiram, através de exaustivo trabalho de remoção de anticorpos inespecíficos, produzir um soro policlonal a partir de coelho contra uma variedade de agentes virais, principalmente aqueles que causavam infecção respiratória^[54].

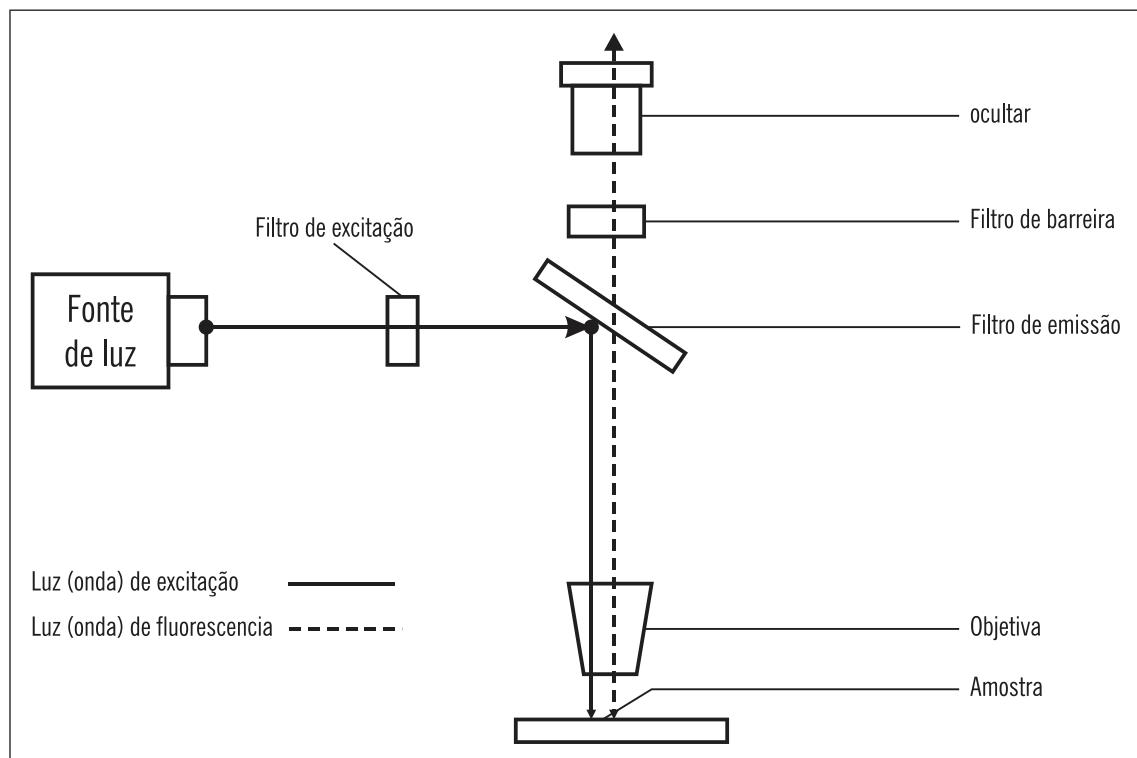
Com o passar do tempo, novas metodologias de produção de soro e técnicas de microscopia, como a utilização de filtros de melhor qualidade, possibilitaram a ampla disseminação da técnica de imunofluorescência. Um dos avanços que possibilitaram o grande emprego não só da técnica de imunofluorescência mas também de outros testes imunológicos foi o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais. Em 1975, Köhler e Milstein desenvolveram uma técnica capaz de produzir uma grande quantidade de anticorpos com uma especificidade definida; fizeram isso

modificando a técnica de hibridização de células somáticas e deram o nome de monoclonais aos anticorpos produzidos por essa técnica^[57].

A imunofluorescência pode ser empregada tanto para detecção de抗ígenos como marcadores de superfície celular (CD nos linfócitos), bactérias (como alguns estreptococos β-hemolíticos) e diversos vírus animais e humanos, como para detecção de anticorpos presentes no soro. Pode também ser aplicada em vários substratos como: monocamada de células, esfregaços celulares, tecidos frescos, tecidos congelados ou em parafina^[16,57,90].

Existem, basicamente, duas variantes da técnica de imunofluorescência. A imunofluorescência direta (IFD) e a imunofluorescência indireta (IFI). Ambas serão abordadas em itens específicos.

Figura 1. Esquema simplificado de um microscópio de epifluorescência. É emitida uma luz que passa por um filtro de excitação gerando um comprimento de onda específico que vai excitar a molécula do fluoróforo utilizado. Essa luz é direcionada até a amostra, excitando a molécula fluorescente, que gera uma emissão de fôtons em um comprimento de onda específico e diferente do comprimento de excitação. Essa fluorescência gerada passa por um filtro de barreira, também específico, que vai permitir a passagem somente do comprimento de onda desejado.



A reação de fluorescência provém da capacidade de algumas moléculas que, quando excitadas, emitem uma luminosidade detectável. Essas moléculas são chamadas de fluoróforos ou fluorocromos e têm como característica absorver energia, normalmente de uma fonte de luz incidente e converter essa energia em fôtons de luz com comprimentos de onda diferentes. A substância mais utilizada é a fluoresceína, pois ela possui algumas características importantes, como boa fotoestabilidade, alta intensidade de fluorescência e emissão de comprimento de onda que a difere de outras substâncias fluorescentes.

A fluoresceína é utilizada, normalmente, como isotiocianato, o que facilita sua ligação com o anticorpo para formar o conjugado e emite uma fluorescência verde^[90]. Além do isotiocianato de fluoresceína (FITC), outros fluorocromos podem ser utilizados como *texas red* ou rodamina, por exemplo, ambos com emissão na cor vermelha^[16,90].

8.1 Imunofluorescência Direta (IFD)

A imunofluorescência direta ocorre através da ligação do anticorpo marcado com o fluorocromo diretamente no antígeno. É também chamada de reação de fase única (Figura 2).

A amostra, um esfregaço de células em lâmina, por exemplo, é exposta ao anticorpo específico marcado com FITC e incubado por 30 a 60 minutos, normalmente sob condições específicas de pH e temperatura, para que ocorra a ligação entre antígeno e anticorpo. Após esse período, a amostra é submetida a uma lavagem para a retirada das moléculas não reagentes, e a lâmina é levada ao microscópio de epifluorescência, onde pode ser observada a reação. Caso a amostra seja negativa, após a lavagem não sobrarão anticorpos marcados ligados ao material, não sendo observada a emissão de luz no microscópio. O teste direto possui uma sensibilidade menor que o teste indireto; entretanto, alguns agentes são satisfatoriamente identificados através de IFD^[16,54,90].

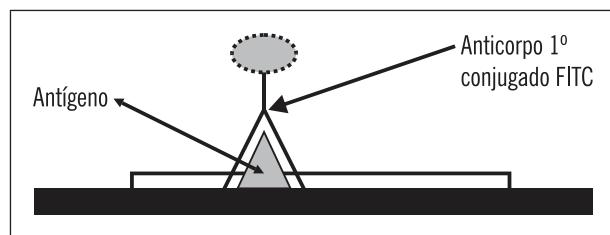


Figura 2. Reação de imunofluorescência direta. O próprio anticorpo primário, específico pra o reconhecimento do antígeno, está conjugado à molécula de FITC.

8.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Na reação indireta ou de dupla fase ocorre, inicialmente, a ligação de um anticorpo direcionado especificamente contra o antígeno, chamado anticorpo primário, e depois a ligação a um “anti-anticorpo” marcado com a substância fluorescente, este chamado de anticorpo secundário (Figura 3).

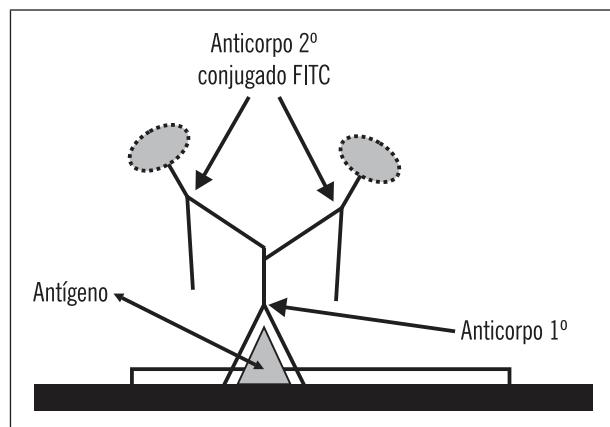


Figura 3. Reação de imunofluorescência indireta. O anticorpo primário é responsável pelo reconhecimento do antígeno, enquanto o secundário é um “anti-anticorpo” conjugado ao FITC

Na prática, a preparação do material é semelhante ao teste direto, com uma etapa a mais. O material é preparado, exposto ao anticorpo primário e incubado sob condições adequadas de pH e temperatura. Após a incubação, a amostra passa por uma lavagem para remoção dos anticorpos não reagentes, sendo, então, novamente exposta ao anticorpo (agora o secundário), passando por novas etapas de incubação e lavagem. Após a preparação, o material é levado para observação ao microscópio sob luz UV^[16].

Pelo teste de IFI também podem ser realizados exames sorológicos, buscando evidências de que o animal tenha entrado em contato com um determinado agente. Para isso, é necessário ter uma lâmina com células infectadas pelo vírus de interesse, por exemplo. Nesse caso, o anticorpo primário é proveniente do próprio soro do animal, e o anticorpo secundário uma anti-imunoglobulina, específica contra a espécie animal que está sendo testada, conjugada com o fluoróforo^[88,90].

8.3 Amostras destinadas a ensaios de imunofluorescência

Este teste tem uma baixa sensibilidade para detectar complexos entre抗ígenos virais e anticorpos fluorescentes ou抗ígenos solúveis. Assim, este teste detecta抗ígenos, basicamente, através de células infectadas ou marcadores celulares, no caso de bactérias.

A qualidade da amostra influencia diretamente a detecção do抗ígeno através da técnica de imunofluorescência, principalmente amostras de tecidos vivos ou microrganismos. Para a detecção do vírus da cinomose canina, por exemplo, a utilização do teste de fluoresceína antes da coleta do tecido conjuntival pode ocasionar uma reação fluorescente inespecífica (*background*). Da mesma forma, materiais com presença de descarga mucopurulenta podem resultar em uma reação com *background* devido à autofluorescência presente nos grânulos de algumas células inflamatórias. Bactérias também podem apresentar uma fluorescência secundária^[46,60].

A coleta do tecido também dever ser levada em conta. Se realizada em uma área de tecido em que não há a presença do agente pode levar a um resultado falso-negativo. Deve-se sempre buscar áreas que demonstrem macroscopicamente a lesão ou áreas de transição entre tecido saudável e tecido lesionado. Em protocolos já estabelecidos, amostras positivas tendem a ser positivas, pois demonstram a presença do抗ígeno. Entretanto, amostras negativas nem sempre podem ser excluídas^[46,60].

8.4 Vantagens do uso de ensaios de imunofluorescência

Esta técnica apresenta uma série de vantagens, principalmente em doenças infecciosas que cursam com problemas respiratórios e abortos. Entre essas vantagens, podemos citar^[35,46,54,60]:

Rapidez - utilizando conjugados com anticorpos monoclonais, a etapa mais demorada é a preparação da amostra, que pode levar de 30 a 45 minutos. Quando a amostra está pronta, as etapas de fixação, coloração (com o conjugado), lavagem e montagem da lâmina podem ser executadas em torno de 30 minutos em amostras fortemente positivas. Nesses casos, pode-se observar ao microscópio uma reação positiva em aproximadamente 30 segundos. Tratando-se de amostras de rotina laboratorial, o teste completo leva, em média, de 1h30min a 2 horas. Utilizando-se anticorpos policlonais, o tempo total pode atingir 2h30min, pois pode haver a necessidade de um tempo maior de incubação.

Possibilidade de testes simultâneos - é possível a preparação de várias amostras simultaneamente em lâminas próprias para múltiplos testes (Figura 4). Assim, podem ser preparadas várias repetições utilizando-se diferentes conjugados específicos para diferentes agentes. Por exemplo, a partir de uma amostra de trato respiratório de um bovino, pode-se preparar uma lâmina e testar para diferentes vírus respiratórios, como vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), vírus Parainfluenza 3 e herpesvírus bovino tipo I.

Confirmação de uma boa amostra - com exceção de soro, urina e fezes, é mais fácil coletar uma amostra ruim do que uma amostra boa. Uma coleta de boa qualidade deve apresentar um material com um número suficiente de células infectadas. Assim sendo, o teste de imunofluorescência fornece o melhor retorno quanto à qualidade do material colhido. Uma reação é validada como positiva somente quando houver realmente células infectadas.

Certeza no Diagnóstico - este fator depende diretamente da experiência do executor do teste. Reações positivas podem apresentar diferentes padrões de fluorescência e distribuição na amostra examinada. Assim, o observador pode analisar caso a caso, atribuindo um grau de positividade que não é possível assumir em outros testes, como os ensaios imunoenzimáticos.

Significância clínica - uma vez detectado o antígeno no tecido examinado, é certo que ele está presente no indivíduo examinado. Dessa forma, é possível traçar tratamento e prognóstico para a doença diagnosticada, diferentemente de testes sorológicos, que, na maioria dos casos, apenas evidenciam uma infecção.

Robustez - quando se quer testar amostras que tiveram um longo tempo de trânsito da coleta até o laboratório, a técnica de imunofluorescência demonstra ser mais confiável do que o cultivo, por exemplo, especialmente em agentes lábeis, como o vírus respiratório sincicial.

Satisfação pessoal - a observação de amostras positivas, como células infectadas por vírus, traz uma grande satisfação ao observador, contrapondo-se à decepção inicial de observadores novatos. A leitura de sucessivas amostras positivas dá ao observador um importante retorno de satisfação quanto ao exercício de suas habilidades de executar o teste. Esse fato é extremamente importante em laboratórios que utilizam essa técnica como rotina no diagnóstico.

8.5 Desvantagens do uso de ensaios de imunofluorescência

Habilidade do executor - este item faz parte de todo o processo, desde a coleta do material e a preparação das amostras até a leitura final no microscópio. Corroboram isso as diferenças nos padrões e distribuição de fluorescência nos materiais examinados. Para que haja um mínimo controle de qualidade na leitura dos testes, é necessário estabelecer um padrão de leitura satisfatório. Para isso são necessárias horas de treinamento. E essas horas podem variar de pessoa para pessoa conforme a habilidade de cada um. Por isso existe uma tendência, nos laboratórios, de utilizar testes com leitura mecanizada, pois eles apresentariam resultados mais consistentes.

Baixa capacidade de processamento - quando comparado a técnicas como Ensaios Imunoenzimáticos (EIAs), o teste de imunofluorescência não permite que seja processado um grande número de amostras. Enquanto um protocolo de EIA automatizado teria capacidade de processar centenas de testes simultaneamente, o mesmo não seria possível, no mesmo espaço de tempo, utilizando imunofluorescência.

Qualidade da amostra - como já mencionado, para um diagnóstico correto, a colheita do material deve ser executada da melhor forma possível. É necessário que o material possua um número mínimo de células infectadas para que possa ocorrer a reação de ligação antígeno-anticorpo conjugado. A IF é capaz de detectar amostras com poucas células infectadas, o que não acontece na maioria dos testes de diagnóstico. Na prática, o executor é capaz de identificar mesmo uma só célula infectada. Assim como a correta colheita do material é importante, sua manutenção até a chegada ao laboratório também se faz importante. Tecidos em decomposição podem alterar a estrutura dos抗ígenos, levando a resultados falso-negativos.

Abrangência limitada - nem todos os agentes infecciosos podem ser detectados pela técnica de imunofluorescência, seja por serem agentes novos, por possuírem uma grande variação

antigênica, seja simplesmente por não haver demanda suficiente que justifique a produção de anticorpos específicos.

8.6 Aplicações dos ensaios de IF na rotina de Diagnóstico veterinário

A técnica de imunofluorescência proporciona um diagnóstico rápido e preciso de uma grande quantidade de agentes infecciosos, permitindo ao veterinário uma rápida tomada de decisão quanto ao tratamento e prognóstico do paciente^[54]. O teste pode ser direcionado a抗ígenos grupo específicos ou a抗ígenos tipo específicos. Como no caso do vírus da leucemia felina (FeLV), por exemplo, o que interessa ao clínico é saber se o animal está infectado ou não. Assim, o teste pode ter como alvo somente proteínas grupo específicas do capsídeo viral, comuns a todos os tipos de FeLV.

Novas técnicas empregando a detecção de ácidos nucleicos têm-se mostrado bastante úteis no diagnóstico de enfermidades, tendo sido preferidas no lugar da imunofluorescência. Isso se dá principalmente por não requererem soros específicos, terem fácil interpretação, possuírem alta sensibilidade e, no caso de vírus DNA ou bactérias, amplificarem a partir de uma amostra com problema de conservação. Entretanto, esses testes não são capazes de informar se o agente está ativo ou não, pois ocorre apenas a amplificação do ácido nucleico, mesmo que o microrganismo não esteja mais em atividade^[46]. Ainda assim, o teste de imunofluorescência tem sido considerado o teste padrão para o diagnóstico de muitas enfermidades infecciosas. Sua velocidade de execução, flexibilidade no diagnóstico, robustez e capacidade de identificar amostras com poucas células infectadas o torna um teste plenamente realizável em laboratórios de diagnóstico.

9. CULTIVO DE CÉLULAS E ISOLAMENTO VIRAL

O cultivo de células em laboratório é uma prática muito antiga. As primeiras experiências com o cultivo de células animais tiveram início no século 19 e relacionam-se a pesquisas direcionadas para doenças de humanos. Wilhelm Roux, em 1885, removeu uma porção da medula de um embrião de galinha e o conservou numa solução aquecida por vários dias. Roux estabelecia, assim, o princípio básico da cultura de tecidos. A partir da linfa do coração de uma rã, entre os anos 1906 e 1910, o zoólogo Ross Granville Harrison demonstrou o crescimento de células nervosas. E Aléxis Carrel, em 1912, conseguiu manter viva e em crescimento, durante 23 anos, uma porção de tecido cardíaco de um embrião de frango^[2].

Paralelamente, a pesquisa de algumas viroses pela inoculação em animais direcionou os pesquisadores a cultivar tecidos. Os estudos de viroses animais, até 1950, foram estimulados principalmente pela importância que determinadas doenças tinham por afetar tanto humanos como animais. Exemplos dessas doenças são: varíola e bouba aviária (poxvírus), febre amarela (nessa época um arbovírus), influenza (influenzavírus) e poliomielite (poliovírus). Naquele período, foi possível observar que embora existisse uma diversidade grande de vírus de animais causando diferentes doenças, eram enormemente limitados os possíveis hospedeiros nos quais esses mesmos vírus poderiam se multiplicar. O processo de inoculação de amostras em animais de laboratório era a principal ferramenta para experiências de propagação de vírus. Porém, um dos principais obstáculos ao progresso dessa atividade foi a dificuldade em manipular um número mínimo de animais para tornar os resultados confiáveis. Mais tarde, a descoberta de que era possível multiplicar alguns vírus em ovos embrionados de galinha diminuiu extraordinariamente essa dificuldade^[33].

Em 1949, Enders e colaboradores demonstraram que vírus poderiam ser regularmente propagados em explantes (fragmentos de tecidos ou de órgãos retirados de sua origem e preservados em meio artificial). Esses trabalhos, pioneiros em técnicas de cultivar tecidos vivos fora de um organismo, possibilitaram o estudo de microrganismos tanto em nível celular como em molecular, contribuindo muito para o desenvolvimento das modernas pesquisas atualmente em uso^[52].

Uma das razões para o avanço nas pesquisas de desenvolvimento de cultivos de células de animais foi a necessidade de vacinas virais durante a Segunda Guerra, especialmente para a poliomielite. A primeira vacina inativada para poliomielite foi produzida em células de rins de macacos, em 1955, e envolve os trabalhos de Enders, Syverton e Jonas Salk. Em 1962, Hilary Koprowski e Albert Sabin dividiram o mérito da primeira vacina viva atenuada. Hayflick, no fim desse período, desenvolveu uma cultura de células originárias do tecido pulmonar embrionário humano capazes de se multiplicar por mais de 50 vezes antes de envelhecer. A característica diploide da célula também permitiu fácil processo de congelamento e revitalização. Essa célula apresentava ainda a vantagem de não conter outros microrganismos “contaminantes”, que eram normalmente detectados em células primárias de rins de macacos. Essa célula tornou-se a base para a produção de vacinas virais humanas contra poliomielite, rubéola, sarampo e caxumba. Paralelamente, outras linhagens celulares foram sendo testadas para produzir vacinas para urso em animais, como as células BHK (rins de hamsters recém-nascidos) para a febre aftosa dos bovinos. A partir daí, a utilização de células animais ganhou velocidade e diversidade^[50].

Outro marco na tecnologia de cultivos celulares animais veio em 1975, com a produção de células híbridas (conhecidas como hibridomas). Elas se originavam a partir da fusão de duas ou mais células capazes de produção contínua^[50].

9.1 Conceitos aplicados à cultura de células

Cultivo de órgãos - é a explantação, ou seja, a retirada de um órgão ou tecido da sua origem, sua dissecação e manutenção em meio artificial. A arquitetura característica do tecido *in vivo* é mantida. O crescimento é lento e restrito à periferia do tecido. Como a cultura não se propaga, cada experimento requer novo explante, significando grandes esforços e baixa reprodutibilidade^[33].

Cultivo de explante primário - é a retirada de um órgão ou tecido de sua origem, sua dissecação e posterior “picoteamento”, obtendo pequeníssimas porções de tecidos que são colocadas em um suporte (vidro ou plástico) e mantidas em meio artificial. Ocorre uma agregação celular e sua migração sobre um suporte plano. Tecidos de insetos e de plantas são mantidos por esse conceito^[33].

Cultivo de células - tem sua origem em fragmentos de tecidos ou órgãos, mas após a obtenção de pequeníssimas porções, sofre desagregação por meio de enzimas e agentes quelantes de tal forma que se obtenham as células individualizadas^[33]. O cultivo de células ou culturas celulares tem uma ampla aplicação tanto na medicina humana como na veterinária. Por essa razão, a abordagem a partir deste ponto será sempre considerando esse conceito.

9.2 Tipos de cultivos de células

Culturas primárias - são obtidas diretamente de tecidos ou órgãos. Denominam-se primárias até sua primeira passagem ou diluição. Depois disso são consideradas culturas em série.

As culturas primárias são inicialmente heterogêneas, mas durante o período de cultivo observa-se uma predominância de fibroblastos. O processo de produção de culturas primárias é laborioso e as células mantêm-se *in vitro* por um curto período de tempo. Nesse período, são geralmente conservadas as características das células diferenciadas do tecido de origem.

O cultivo primário é obtido a partir de porções de órgãos ou tecidos sadios, retirados de animais recém sacrificados. Esses tecidos são cortados em porções pequenas, “picoteados” e misturados a uma solução contendo enzimas. Esse processo de digestão enzimática dissocia as células. Essa suspensão de células agora individualizadas é filtrada através de um tecido (*gaze* ou *voile*), que retém porções de tecidos não dissociados. Esse líquido filtrado é então distribuído em garrafas de vidro ou plásticas, específicas para cultura celular. As células preparadas por esse processo poderão ser cultivadas como uma camada aderida ao substrato (vidro ou plástico) ou suspensas no meio da cultura, dependendo do tecido originário^[33].

Cultura de células de linhagem ou culturas em série ou culturas estabelecidas - as primeiras culturas de células foram obtidas pelo processo de dissociação de células utilizando a enzima tripsina (“tripsinização”) a partir de tecidos como fibroblastos de embrião de galinhas e rins ou testículos de macacos. Essas culturas não conseguiam ser mantidas indefinidamente. A necessidade de retornar continuamente ao tecido primário não permitia a reprodutibilidade desejada. Earle e seus colaboradores conseguiram desenvolver técnicas que permitiram manter determinadas culturas continuamente. Com isso, ao final do ano de 1940, uma cultura de células de camundongo crescia indefinidamente *in vitro*. A partir de então, culturas continuadas (ou de linhagem) de uma grande variedade de vertebrados e invertebrados foram testadas, avaliadas e estabelecidas. Eram culturas originárias de células de insetos, peixes, sapos, diversos roedores, suínos, cães, gatos e vários primatas, incluindo também células humanas^[52].

O cultivo de linhagem é compreendido por ser um único tipo de célula que pode ser propagado seriadamente em cultura, tanto por um número limitado de divisões celulares (aproximadamente 30) como indefinidamente. Linhagens celulares com um ciclo de vida definido são normalmente diploides e mantêm algum grau de diferenciação. Porém, essas células acabam se desgastando, enfraquecendo e morrendo após 30 ciclos de divisão. Isso torna necessário estabelecer um banco de células “sementes” e um banco de células “de trabalho” com um número grande de frascos-ampolas para manter a linhagem por um período longo.

As culturas contínuas ou de linhagem que se propagam indefinidamente geralmente apresentam essa habilidade porque são originárias de células “transformadas”. Essas linhagens podem ser derivadas de tecidos naturalmente transformadas (casos clínicos de tumor) ou transformadas por indução, utilizando vírus oncogênicos, tratamento com determinadas drogas ou ainda por radiação. Células assim obtidas apresentam a grande vantagem da viabilidade ilimitada, e a desvantagem de manterem muito pouco de suas características originais^[33].

As culturas de células podem crescer em suspensão, como células únicas, ou como pequenos agrupamentos que flutuam no meio de cultivo. As culturas também podem crescer como uma camada única, aderida ao suporte onde foram cultivadas. Esse crescimento também é conhecido como “em monocamada”, e essas formas refletem sua origem. Por exemplo, células derivadas de tumores do sangue, como linfomas e leucemias, crescem em suspensão, enquanto células derivadas de tecidos sólidos, como pulmões e rins, crescem em monocamadas aderidas. Essas células aderidas podem ainda ser classificadas em endoteliais, epiteliais, neurais e fibroblastos. Essa morfologia também está associada ao tecido de origem^[33].

Os principais acontecimentos que tornaram as técnicas para cultivar células mais simples e, consequentemente, mais difundidas foram^[52]: a) uso de antibióticos que não prejudicam as célu-

las mas evitam a contaminação com bactérias; b) isolamento de uma célula a partir de carcinoma humano que crescia indefinidamente *in vitro* e permissível a um grande número de vírus humanos (células HeLa); c) desenvolvimento por Eagle, em 1960, de uma solução (meio de cultura) que não somente mantinha as células, mas permitia o crescimento de muitos diferentes tipos de células; e d) refinamento das técnicas de crescimento de clones de células de mamíferos^[52].

9.3 Implementação da técnica de cultivo celular

a) Meio de cultura

Para fornecer as células, os nutrientes necessários a seu metabolismo são preparados em meios de cultura. Meios como F10-199, E-MEM e RPMI são complexos, contendo de 50 a 100 diferentes ingredientes. Por isso, dificilmente são manipulados no laboratório. São facilmente adquiridos prontos para uso, ou em pó em altas concentrações e somente diluídos e filtrados nas áreas de trabalho. Outras fórmulas menos complexas como meio Earle podem ser preparados. Portanto, sempre se deve considerar que a água deverá ser a mais pura possível e os reagentes de excelente qualidade.

A escolha do meio de cultura está diretamente relacionada ao tipo de célula que se vai utilizar e a adição de suplementos como soro fetal, glutamina e outros também são influenciados pelas exigências de crescimento da célula. Informações sobre as necessidades de cada célula podem ser encontradas em sites específicos, como por exemplo, o site da ATCC (American Type Culture Collection)^[91], onde é possível verificar também a concentração celular adequada para um bom crescimento e o intervalo de repiques, quando necessário.

b) Tripsina

A tripsina é um produto indispensável para trabalhar com cultura de células. Essa enzima é eficaz em agir sobre substâncias proteicas, dissociando-as. Para esse fim específico, a tripsina age sobre o tegumento celular, colocando as células que estavam unidas na forma de um “tapete celular”, agora individualizadas. A esse procedimento chamamos de tripsinização. Através da tripsinização, tanto é possível realizar subculturas de um cultivo celular que está saturado (crescimento excessivo) como preparar células para estocar.

Soluções na concentração de 2,5% podem ser preparadas no laboratório ou adquiridas prontas. As soluções de rotina contêm aproximadamente 0,25% de tripsina. Concentrações ótimas são as que apresentam a menor quantidade de tripsina que consegue individualizar as células em um curto período de tempo (10 a 15min a 37°C). Algumas células são mais difíceis de dissociar. Nesses casos a tripsina é suplementada com agentes quelantes, que facilitam o processo. O produto quelante mais utilizado em laboratório é o EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*). Normalmente uma solução estoque de EDTA é preparada a 10% e utilizada a 0,02% na rotina. Para manipulação de cultivos primários, as concentrações de tripsina e EDTA caem para 0,05% e 0,005% respectivamente)^[7, 33, 91].

c) Solução de antibióticos

O ideal é sempre trabalhar cultivos celulares sem a adição de antibióticos, principalmente se são produzidos insumos biológicos. Mas, na rotina de diagnóstico e pesquisa, normalmente se faz necessário prevenir as contaminações. Para isso, é suficiente uma solução estoque contendo penicilina G sódica (10.000UI/ml) e sulfato de estreptomicina (10.000µg/ml), que pode ser preparada no laboratório e distribuída em pequenos volumes para que, ao descongelar, seja toda utilizada. Dessa solução, utiliza-se 1ml para cada 100ml de meio de cultura pronto. Esse produ-

to também pode ser adquirido pronto para uso. A mistura de penicilina e estreptomicina pode ser substituída por sulfato de gentamicina (10mg/ml)^[33].

d) Soro

Um dos principais suplementos utilizados para enriquecer as culturas de células é o soro. Soro fetal bovino (SFB), soro bovino e soro de galinha são normalmente utilizados como fonte de albumina e de outras proteínas. Podem ser adquiridos prontos ou obtidos em frigoríficos, mas será necessário testar esses produtos quanto à presença de microrganismos e anticorpos. Qualquer contaminante desse tipo influenciará negativamente as culturas, principalmente se o soro for utilizado em células de linhagem, pois o efeito negativo poderá inicialmente não ser percebido, mas permanecerá influenciando as condições celulares e o resultado dos trabalhos.

9.4 Preparação de amostras para inocular em cultura de células

Amostras de tecido, fluido corporal (suabes traqueais, orais ou fecais; líquido de articulações ou das membranas cerebrais) ou mesmo um lisado bacteriano, deverão ser triturados (tecidos) e diluídos em meio líquido, inerte, como uma solução tamponada ou um meio de cultura celular. A centrifugação em baixa rotação auxiliará na remoção de grandes fragmentos celulares e diminuirá a contaminação.

Materiais suspeitos de conter vírus apresentam grande vantagem sobre outros microrganismos para diagnóstico nesse substrato, uma vez que podem ser tratados com uma solução de antibióticos e antifúngicos sem interferir na eficiência do método (por exemplo: 10.000UI/ml de penicilina G sódica + 10.000 μ g/ml de sulfato de estreptomicina e 25 μ g/ml de anfotericina B). Outras suspeitas (bacterioses) deverão considerar um antibiótico ou antifúngico que não apresente ação sobre o microrganismo que se pretende isolar^[10,25,94].

A quantidade e as condições das amostras influenciam diretamente na capacidade do laboratório confirmar uma suspeita utilizando a inoculação em ovos embrionados. Por isso, alguns aspectos devem ser observados: colher o material o mais assepticamente possível; preferencialmente, separar os diferentes tecidos por sistemas, uma vez que uns são naturalmente mais contaminados que outros (exemplo: separar fragmentos do pulmão de porções do intestino); amostras provenientes de animais que receberam algum tipo de tratamento com antibióticos devem ser claramente identificadas quando o objetivo não é o isolamento viral; as amostras deverão ser mantidas resfriadas e, para pesquisa de vírus, poderão ser congeladas até o processamento^[94].

Deve-se considerar na formulação de soluções tampões, meios de cultura e soluções de antibióticos, que a inclusão de cloreto de magnésio para insumos em cultivo celular não é adequada, pois íons de magnésio prejudicam o crescimento celular.

9.5 Uso do cultivo de células na rotina

As culturas de células são utilizadas com maior frequência na pesquisa e no diagnóstico de viroses (Quadro 2). Vírus causadores de doenças em inúmeras espécies animais (Quadro 3), em plantas e em humanos crescem muito bem nesse sistema. Ainda têm ampla aplicação na produção de insumos biológicos para animais e humanos e também em ensaios sorológicos na detecção de anticorpos vírus-neutralizantes. Alguns protozoários, como os coccídeos, também se desenvolvem em cultivos celulares.

Quadro 2. Denominação de alguns tipos de células de linhagem e culturas primárias de interesse no diagnóstico veterinário.

Denominação abreviada	Origem	Tipo de cultura
AA	<i>Aedes albopictus</i> clone C6/36	Linhagem
BFL	Bovine fetal lung	Linhagem
BHK21	Baby hamster kidney	Linhagem
CEF	Chicken embryo fibroblast	Primária
CEK	Chick embryo kidney	Primária
CEL	Chicken embryo liver	Primária
CRFK	Crandell-Rees Feline Kidney	Linhagem
DEF	Duck embryo fibroblast	Primária
IB-RS-2	Instituto Biológico – Rim de suínos	Linhagem
LK	Lamb kidney	Primária
LT	Lamb testis	Primária
MA-104	African green monkey kidney	Linhagem
MDCK	Madin darby canine kidney	Linhagem
MDCC-MSB1	T cell lines: Marek disease lymphoma	Linhagem
MDCC-JP2	T cell lines: Marek disease lymphoma	Linhagem
PAM	Porcine alveolar macrophages	Primária
QT-35	Japanese quail	Linhagem
RK-13	Rabbit kidney	Linhagem
ST	Swine testis	Primária
TOC	Tracheal organ culture	Primária
Vero	African green monkey kidney	Linhagem

Quadro 3. Viroses de interesse na medicina veterinária que podem ser detectadas utilizando cultivos celulares como substrato principal.

Doença	Vírus	Célula(s)	Referência
Anemia infecciosa das galinhas	Circovírus	MDCC-MSB1, MDCC-JP2	55, 92
Balanopostite bovina	Herpesvírus tipo 1 – BHV-1	BFL, CRFK	102
Bouba aviária	Poxvírus	CEL, CEK, QT35	101
Bronquite infecciosa das galinhas	Coronavírus	TOC, CEK, Vero, CER	67
Calicivirose felina	Calicivírus	CRFK	96
Doença de Aujeszky	Herpesvírus	PK-15, SK-6	65
Doença de Gumboro	Birnavírus	CEF	51
Doença da língua azul dos ovinos e bovinos	Orbivírus	BHK21, Vero, AA	68
Doença de Marek (paralisia aviária)	Herpesvírus	CEF, DEF, CEK	105
Doença dos olhos azuis	Paramixovírus	PK15,	97
Doença vesicular dos suínos	Enterovírus	IB-RS-2	28
Encefalites equina do leste, oeste e venezuelana	Alfavírus	Vero, RK13, BHK-21, CEF	78, 72

Doença	Vírus	Célula(s)	Referência
Estomatite vesicular bovina, equina e suína	Vesiculovírus	Vero, BHK-21, IB-RS-2	69
Febre do Nilo (encefalite equina)	Arbovírus	Vero, RK-13	66
Gastroenterite transmissível dos suínos	Coronavírus	ST, PK15	89
Influenza suína e equina	Influenzavírus	MDCK	71, 73
Laringotraqueite infecciosa das galinhas	Herpesvírus	CEK, CEL	38
<i>Lumpy skin diseases</i>	Poxvírus	LT	74
Parvovirose canina	Parvovírus	CRFK	42
Pox dos caprinos e ovinos	Poxvírus	LT e LK	75
PRRS - Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína	Arterivírus	PAM, MA -104	9
Raiva	Lissavírus	BHK-21	64
Rotavirose suína	Rotavírus	MA-104	85

Existem muitas outras aplicações para os cultivos celulares, como investigar a fisiologia normal ou bioquímica das células em estudos de metabolismo celular; testar o efeito de compostos químicos ou drogas em tipos específicos de células (normais ou células cancerosas) e produzir em grande escala proteínas importantes em terapêutica humana através da utilização de células animais geneticamente modificadas. O número de tais produtos biológicos com valor comercial aumentou rapidamente na última década. Isso causou um grande interesse na tecnologia de cultura de células animais.

A principal vantagem do uso de cultura de células para essas aplicações é a consistência e a reproduzibilidade dos resultados, que podem ser obtidos utilizando um lote de células clonais. A desvantagem é a possibilidade de diferenciação celular, alterando muito as características originais dos tecidos.

As culturas de células têm inúmeras vantagens sobre outros sistemas, como ovos embrionados e animais de laboratório, por exemplo:

Isolar muitos tipos de vírus - o método é sensível para um grande número de vírus de diferentes espécies animais, vegetais e humana. Alguns deles provocam alterações no tecido celular, também denominado ECP (efeito citopático), que são característicos de determinado agente, facilitando a detecção específica. Quando essa facilidade não existe, testes complementares podem ser empregados diretamente sobre as culturas, como imunofluorescência e imunoperoxidase.

Facilidade de manter por longos períodos - muitos tipos de células podem ser mantidos por longos períodos (vários anos) em baixas temperaturas (nitrogênio líquido, -196°C) e rapidamente ser recuperadas.

Obtenção de grandes volumes - grandes volumes de células podem ser obtidos a partir de um pequeno frasco-ampola, uma vez que através de repiques consecutivos os tecidos são facilmente reproduzidos.

Volume de material infeccioso vivo - esse método, a exemplo do uso de ovos embrionados, também fornece grande volume de material infeccioso, imprescindível quando se pretende reproduzir a doença ou produzir imunobiológicos, como antissoros e antígenos.

Facilidade para executar - a manipulação e a manutenção de culturas celulares é relativamente simples e facilmente executável após curto período de treinamento.

Facilidade para obter as células - como uma única ampola pode ser repicada e mantida em estoque, não é difícil o laboratório ter seu próprio banco de células. A produção de células pri-

márias também é relativamente simples, especialmente para laboratoristas que já manipulam células de linhagem.

Como desvantagens, podem ser destacadas:

Atividade totalmente manual - essa metodologia exige muito do laboratorista, pois nenhuma etapa pode ser automatizada. Todo o processo é manual. A exceção são os grandes laboratórios produtores de imunobiológicos, como vacinas, em que parte do processo é automatizada.

Leitura exige experiência do laboratorista - a experiência é exigida tanto nas avaliações da qualidade das células durante crescimento e repiques como para a análise e interpretação dos resultados. A leitura depende do treinamento e da experiência do laboratorista. Na maioria das vezes, a interpretação dos ensaios com células é a observação de alterações nos tecidos (ECP), e isso requer o conhecimento dos aspectos de ECP possíveis.

Exigência de teste complementar - alguns vírus não causam efeito citopático característico, ou o efeito é de difícil visualização. Nesses casos, é necessário um teste complementar sobre a cultura celular ou a partir dela. Testes de imunoperoxidase ou imunofluorescência são exemplos disso. As provas moleculares a partir do cultivo também complementam o diagnóstico.

10. PROPAGAÇÃO DE MICROORGANISMOS EM OVOS EMBRIONADOS

O cultivo de microrganismos em ovos embrionados foi primeiramente utilizado por Rous e Murphy em 1911. Vinte anos mais tarde, Woodruff e Goodpasture (1931) utilizaram embriões de galinha para multiplicar vírus pox na membrana corioalantoide. Daquela época até os dias de hoje, o meio rico em que um embrião se desenvolve é utilizado para multiplicação e detecção de diferentes microrganismos^[10,25,94].

Primeiramente, os ovos são avaliados quanto a sua viabilidade embrionária (germinação) em uma fonte de luz (ovoscópio), descontaminados com álcool 70% e incubados a 37°C, com certo grau de umidade, que pode ser fornecida colocando um recipiente contendo água limpa. Dessa forma, o substrato está pronto. Materiais provenientes de aves doentes, com suspeita de virose, são os que melhor se adaptam a esse sistema^[94].

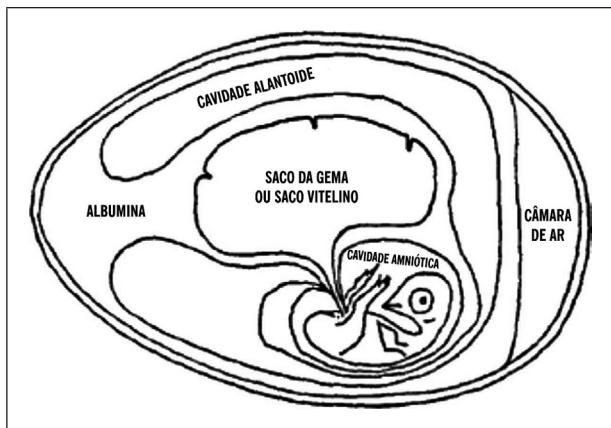
A inoculação de microrganismos em ovos embrionados é um dos métodos mais amplamente utilizados para a propagação e caracterização de viroses aviárias, na produção de vacinas virais animais (praticamente todas as vacinas aviárias são produzidas com esse substrato) e algumas vacinas para humanos. Algumas bactérias também se multiplicam por esse sistema, como os micoplasmas e as clamídias^[4].

O embrião e suas membranas de suporte fornecem uma diversidade de tipos celulares necessários para o cultivo de muitos tipos de vírus. Porém, deve-se considerar a espécie dos embriões, uma vez que alguns vírus não são cultiváveis em certas espécies de aves^[25,52]. Os detalhes da metodologia aqui descrita estarão sempre se referindo a embriões de galinha doméstica (*Gallus gallus*).

Considerando a estrutura de um ovo embrionado (Figura 4), são abordados os três métodos de inoculação mais frequentemente utilizados em laboratório. A seleção da via de inoculação leva em consideração a adaptação do hospedeiro e a afinidade ou tropismo pelos tecidos.

No Quadro 4 estão listados alguns vírus que causam enfermidades em galinhas domésticas, a via de inoculação mais utilizada para sua propagação e as alterações ou efeitos que esses vírus podem causar nos embriões^[94].

Figura 4. Desenho esquemático da estrutura de um ovo embrionado.



Quadro 4. Tecidos de eleição para pesquisar vírus aviários em embriões de galinhas.

Vírus	Via de inoculação	Efeito esperado
Reovírus aviário	Saco da gema	Mortalidade embrionária 3 a 5 dias após a inoculação, embriões vermelho-púrpura
Poxvírus	Membrana da cavidade alantoide ou falsa câmara (MCA)	Pequenos pontos espessos, opacos e esbranquiçados na MCA
Vírus da bronquite infecciosa das galinhas	Cavidade alantoide (CA)	Enrolamento, nanismo, mal empenamento e mortalidade embrionária
Vírus da doença de Gumboro ou doença da bolsa de Fabricius	Membrana da cavidade alantoide ou falsa câmara (MCA)	Pequenos pontos esbranquiçados espalhados pelo fígado ou concentrados em algumas regiões, chamado “efeito noz moscada”
Vírus da laringotraqueite das aves	Membrana da cavidade alantoide ou falsa câmara (MCA)	Pequenas placas opacas nas bordas e com aspecto necrótico ao centro na MCA
Vírus da doença de Newcastle	Cavidade alantoide (CA)	Morte embrionária e atividade hemaglutinante do líquido corioalantoide
Vírus da influenza aviária	Cavidade alantoide (CA)	Morte embrionária e atividade hemaglutinante do líquido corioalantoide

10.1 Inoculação na cavidade alantoide (CA)

Para inocular por essa via, utilizam-se embriões com 8 a 12 dias de idade. Uma série de no mínimo 5 embriões é inoculada com cada amostra. O volume inoculado é de 0,1 a 0,2ml e a utilização de seringa e agulha de insulina é indicada para introduzir o material em ângulo de 90º em orifício feito no limite da câmara de ar (Figura 5). Essa via tem a vantagem de ser a mais simples, tanto para inocular como para a colheita do líquido após o período de incubação. Os orifícios são fechados com cola escolar ou parafina líquida, e os ovos são incubados por 5 a 7 dias à temperatura de 37°C^[25,94].

10.2 Inoculação na membrana corioalantoide (MCA)

Utilizam-se embriões de 9 a 12 dias de idade. Para esse método, um orifício é feito no centro da câmara de ar e outro na lateral do ovo através da casca e da membrana da casca. Aspirando-se com uma pequena pera de borracha através do primeiro orifício, consegue-se deslocar a câmara de ar para a lateral do ovo, onde foi feito o segundo orifício. O volume do inóculo é de 0,1ml e somente a ponta da agulha de insulina é introduzida no orifício, de tal forma que o material é depositado sobre a membrana (Figura 6). Os ovos deverão ser incubados na posição horizontal^[25,94].

Figura 5. Inoculação via cavidade alantoide, método “B”, segundo After Hawkes^[94].

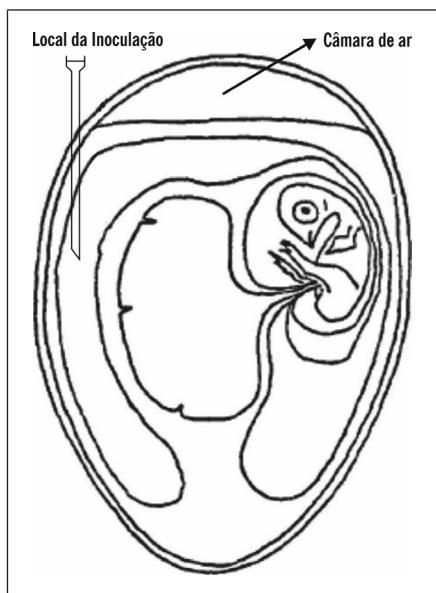
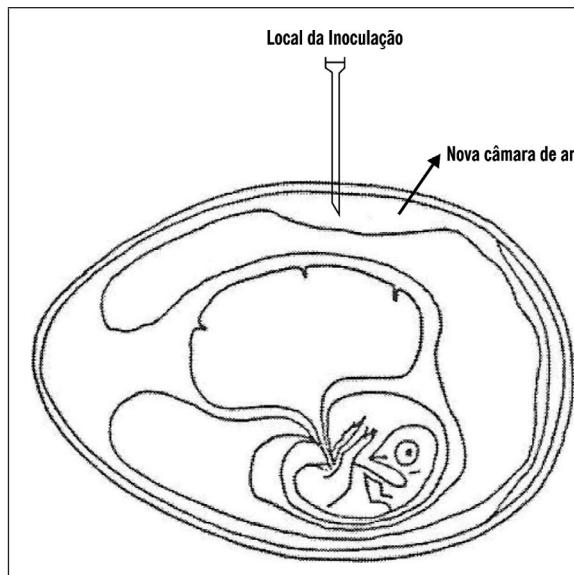


Figura 6. Inoculação via MCA.



10.3 Inoculação no saco vitelino ou via saco da gema

Por essa via se utilizam embriões de 5 a 7 dias de idade e o orifício para inocular o material será feito no centro da câmara de ar. Como para essa via os embriões são bem mais jovens, é interessante que um número maior de ovos seja utilizado por amostra (8 a 10), uma vez que a possibilidade de perder alguns embriões nas primeiras 24 horas de incubação é sempre maior se comparada a outras vias.

Com seringa de insulina de 1ml e agulha 25 x 8 inocula-se 0,1 a 0,2ml da amostra no saco da gema, introduzindo-se verticalmente toda a agulha no orifício feito no centro da câmara de ar (Figura 7). Ao menos até o 9º dia de idade os ovos necessitarão ser colocados em estufa com bandeja de viragem, pois os embriões ainda são muito jovens e a não movimentação poderá afetar sua viabilidade. Essa via também requer um período de incubação mais longo. Dez a 12 dias a 37°C são necessários para finalizar o ensaio^[94].

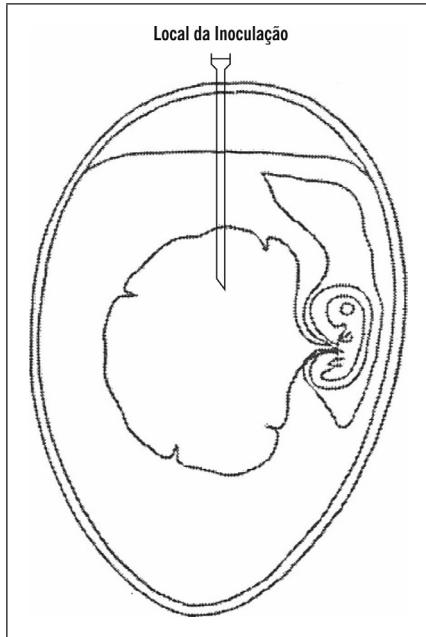


Figura 7. Inoculação no saco vitelino ou via saco da gema.

Existem outras vias de inoculação em embriões, como a cavidade amniótica e a intravenosa, mas são metodologias menos utilizadas e exigem maior habilidade do laboratorista^[25,94].

10.4 Preparação das amostras

As considerações colocadas para o preparo das amostras na técnica de cultivo de células e isolamento viral, (item 9.4) se aplicam totalmente a esta metodologia.

No Quadro 5 vemos alguns exemplos de tecidos que são utilizados no diagnóstico e nas pesquisas das principais doenças das aves domésticas^[25,52,94].

Quadro 5. Tecidos de eleição para isolar vírus aviários em embriões de galinhas.

Suspeita	Tecido ou amostra
Arrite por reovírus	Tendão, fígado, suave das articulações
Bouba	Pele ou mucosas com lesões
Bronquite infecciosa	Traqueia, pulmão, rim, tonsila cecal, ovário, oviduto
Doença de Gumboro	Bolsa de Fabricius, baço, timo
Encefalomielite	Cérebro, alça intestinal (duodeno), pâncreas
Laringotraqueite	Laringe, traqueia, pulmão
Metapneumovírus	Traqueia, pulmão, suave do exsudato nasal, raspados dos seios nasais
Newcastle e influenza	Cérebro, traqueia, pulmão, intestino, pâncreas, pró-ventrículo, suave de traqueia, suave de cloaca, fezes frescas

As principais vantagens do método de propagação de microrganismos em ovos embrionados são:

Isolar vírus aviários - porque praticamente todos se replicam bem em embriões de galinha. Por isso, para enfermidades aviárias é um método amplamente utilizado, tanto para diagnóstico como para pesquisa^[4,25,52,94].

Volume de material infeccioso vivo - em qualquer via que se utilize, esse método fornece grande volume de material, imprescindível quando se pretende reproduzir a doença, utilizar o material para outros ensaios, como sorologias, técnicas moleculares e microscopia eletrônica, e produzir imunobiológicos, como antissoros e antígenos. Este método é enormemente empregado na produção de vacinas para prevenir doenças em galinhas domésticas e também na produção de insumos biológicos humanos, como é o caso da vacina para influenza humana sazonal e pandêmica^[10,94].

Facilidade de executar - a inoculação de ovos embrionados é facilmente realizada depois de acompanhar algumas vezes o procedimento e perder o “medo” de quebrar os ovos ao manipulá-los.

Equipamentos simples - o método não exige equipamentos sofisticados para execução.

Entre as principais desvantagens do método de propagação de microorganismos em ovos embrionados, podem ser citados:

Não se aplica a todas as espécies animais - como a inoculação é em embriões de aves, os microorganismos que melhor se adaptam a esse substrato são os que causam doenças nessa espécie e os vírus são os que melhor se replicam. Alguns vírus de bovinos, suínos e equinos também podem ser replicados nesse substrato.

Teste totalmente manual - essa metodologia exige muito do laboratorista, pois nenhuma etapa pode ser automatizada. Todo o processo é manual. A exceção são os grandes laboratórios produtores de vacinas, em que parte do processo é automática.

Leitura exige experiência do laboratorista - a etapa de análise e interpretação dos resultados depende do treinamento e da experiência do laboratorista. Na maioria das vezes é uma interpretação das lesões observadas nos embriões; isso requer o conhecimento das possíveis alterações que o agente em estudo pode causar e a identificação dessas alterações nos tecidos ou no embrião.

Demora na resposta - as incubações são de, no mínimo, 5 dias e vão até 14 a 21 dias, dependendo do microrganismo em estudo. São raros os agentes que podem ser interpretados em 24 a 48 horas. Portanto, não é um método com respostas rápidas^[94].

Necessidade de testes complementares - a maioria dos microrganismos inoculados não causa lesões patognomônicas. Por isso, testes complementares são necessários para confirmar um diagnóstico.

Dificuldade em obter ovos embrionados SPF - a utilização de outros embriões que não os *specific pathogen free* (SPF) vai causar ainda mais dificuldades na interpretação dos resultados. Por isso, o ideal é utilizar somente ovos provenientes de granjas SPF. Isso dificulta a realização de ensaios de rotina, pois a produção de ovos SPF em nosso país é restrita, o que restringe também a utilização do método.

10.5 Uso da inoculação em ovos embrionados na rotina de Diagnóstico

Como já mencionado, a técnica de inoculação em embriões tem grande aplicabilidade quando nos referimos às doenças das galinhas principalmente. O Quadro 6 mostra exemplos

de enfermidades aviárias e de outras espécies que podem ser diagnosticadas por esta metodologia. As doenças aviárias causadas por vírus, devido à afinidade dos agentes com o substrato, são mais facilmente identificadas. A boubá aviária (poxvírus), a bronquite infecciosa (coronavírus) e a doença de Gumboro (birnavírus) são exemplos clássicos dessa facilidade. Nesses casos, a replicação dos vírus nos embriões e o desenvolvimento de sinais ou lesões específicas tornam o diagnóstico seguro. Além disso, paralelamente, fornecem excelente material infeccioso para fins de pesquisa.

Para implantar o uso da técnica de inoculação em ovos embrionados, considerando que o laboratório já possua alguns requisitos mínimos, como um espaço para preparar amostras, freezer e refrigerador, o mais importante é encontrar um fornecedor de ovos de qualidade. Estufas bacteriológicas podem ser utilizadas como incubadora, a inoculação dos ovos pode ser realizada próxima a uma chama, caso o laboratório não disponibilize de uma capela de segurança biológica, e o ovoscópio pode ser qualquer fonte direcionada de luz, que normalmente é construída no próprio laboratório. A preparação das amostras exige uma centrífuga, que poderá ser pequena, preferencialmente com refrigeração. Se não houver uma centrífuga refrigerada, considerar que os vírus “gostam muito de frio”, então é indicado manipular as amostras em banho de gelo e utilizar soluções diluentes geladas. A técnica não necessita de reagentes de alto custo; apenas uma solução tampão e alguns antibióticos.

Quadro 6. Microorganismos de interesse veterinário que se propagam em ovos embrionados de galinhas.

Microrganismo	Via de inoculação	Efeito esperado	Referência
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	Saco da gema	Colônias se desenvolvem na gema em menos de 24 horas	11
<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i>	Saco da gema	Colônias puras propagam muito bem e matam os embriões em 24 a 48 horas; o conteúdo da gema é rico em microrganismos.	15
<i>Chlamydophila Psittaci</i>	Saco da gema	Congestão dos vasos sanguíneos do saco vitelino e mortalidade dos embriões	4
Vírus da influenza suína e da equina	CA	Eventualmente morte embrionária; o líquido corioalantoide apresenta atividade HA*	29, 71,73
Vírus da encefalomiocardite suína	Saco da gema	Mortalidade dos embriões 3 a 6 dias após a inoculação	45
Vírus da estomatite vesicular bovina, equina e suína	CA	Alta mortalidade dos embriões e grandes pontos hemorrágicos na membrana	69
Vírus da língua azul dos ovinos e bovinos	Intravenosa	Mortalidade embrionária e hemorragias	22,68
Vírus das encefalites equina do leste, do oeste e venezuelana	Saco da gema	Mortalidade 2 a 4 dias após a inoculação	70,72

* Atividade HA: o vírus tem a propriedade de aglutinar hemácias.

Embora pouco utilizada na maioria dos laboratórios de rotina de diagnóstico, essa metodologia é bastante importante em laboratórios de pesquisa e produção de vacinas avícolas. Ainda, é a prova ouro (teste padrão) para muitas doenças das aves em que somente o isolamento do agente é aceito como diagnóstico definitivo.

11. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A PCR, ou *polimerase chain reaction*, (reação em cadeia da polimerase), é uma técnica de biologia molecular usada para amplificação de segmentos curtos da molécula de DNA, aproximadamente 100 a 500 pares de base, a partir de um molde (amostra)^[84]. A técnica de PCR reproduz *in vitro* fragmentos de DNA de forma semelhante à que acontece no interior da célula. Para o entendimento desta técnica precisa-se primeiro entender um pouco sobre o DNA e sua replicação.

Ácido Desoxirribonucleico (DNA) - toda a atividade vital dos indivíduos depende da capacidade celular de armazenar, obter e traduzir as informações genéticas necessárias para a sobrevivência. Essa capacidade é transmitida de célula para célula, durante a divisão celular, e de indivíduo para indivíduo, durante o processo reprodutivo, através das células germinativas. As informações contidas nas células estão armazenadas em genes, que são responsáveis pelas informações que determinam as características de uma espécie como um todo e também as de um indivíduo. Os genes, por sua vez, são formados por complexos de proteínas e DNA, sendo este último responsável por toda a informação genética do indivíduo.

A molécula de DNA consiste de duas longas cadeias polipeptídicas compostas de quatro tipos de subunidades nucleotídicas. Cada uma dessas cadeias é conhecida por cadeia ou fita de DNA. Os nucleotídeos, por sua vez, são formados por um açúcar com cinco carbonos (desoxirribose) ligados a um grupo fosfato e uma base contendo nitrogênio. As bases podem ser adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T) e a combinação entre essas bases, na cadeia de DNA, fornece toda a informação necessária à célula para executar suas funções e transmitir a informação genética às gerações seguintes^[1,93]. Para o entendimento de como ocorre a amplificação do DNA *in vitro*, primeiramente é preciso entender como ocorre, basicamente, essa replicação *in vivo*.

O primeiro evento para que ocorra a replicação do DNA é a abertura da dupla fita que é feita pela enzima helicase. Uma vez separadas as fitas, elas são mantidas assim por proteínas específicas que se ligam a elas impedindo que se associem de novo. A partir do ponto de abertura das fitas, entra em ação a enzima DNA polimerase. Essa enzima não sintetiza outra fita a partir de nucleotídeos livres. Assim, ela necessita de um *primer*, ou sequência iniciadora, que é fornecido através de um pedaço de RNA sintetizado pela enzima primase, que nada mais é que uma RNA polimerase. Tão logo seja sintetizado o *primer* de RNA, a enzima DNA polimerase III começa a polimerização no sentido 5' – 3'. Além da atividade de polimerização, essa enzima possui uma atividade exonucleásica com ação corretiva, pois confere se o pareamento com a nova fita está correto, ou seja, A com T e C com G^[1].

Uma vez terminada a formação da dupla fita de DNA, ela se enrola naturalmente, formando a dupla hélice.

Aplicações

A reação em cadeia da polimerase apresenta uma ampla gama de aplicações, sendo ela uma das principais ferramentas dentro da biologia molecular. A PCR torna possível a amplificação de

um determinado segmento do DNA milhares de vezes, possibilitando sua visualização em um simples gel de agarose. Além disso, possui grande sensibilidade, permitindo, teoricamente, a detecção de um agente, por exemplo, a partir de uma única molécula de DNA alvo^[16,60,84]. Essa técnica possui também uma grande especificidade derivada do uso e da escolha dos iniciadores, ou *primers*. Esse aspecto será abordado mais adiante. Entre os principais usos da reação em cadeia da polimerase, podemos citar:

- amplificação de regiões específicas do genoma ou de DNA complementar (cDNA);
- análise de polimorfismos de DNA;
- diagnóstico de doenças genéticas;
- estudos de evolução molecular;
- medicina forense;
- diagnóstico de doenças infecciosas.

Para que seja possível a amplificação, é preciso que o genoma a ser amplificado seja previamente conhecido, uma vez que será necessário o desenvolvimento dos *primers* a partir da sequência que se deseja amplificar. Na reação de PCR, os componentes envolvidos são basicamente os mesmos utilizados no processo de replicação do material genético durante a divisão celular.

A reação de polimerização em cadeia requer alguns componentes:

1. DNA polimerase termoestável;
2. Um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para início da síntese de DNA;
3. Desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP);
4. Um cátion divalente, necessário à DNA polimerase (normalmente se usa o Mg²⁺);
5. Tampão para manter o pH;
6. DNA molde (amostra).

Inicialmente, a PCR usava o fragmento de klenow da DNA polimerase I de *Escherichia coli*. Entretanto, como essa polimerase não possuía termoestabilidade, foi necessário acrescentar enzima após cada ciclo de desnaturação na reação (murphy). Mais tarde, com a descoberta da DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*, esse problema foi resolvido, o que foi um marco para a execução dessa técnica^[84].

Na reação, qualquer sequência pode ser amplificada, e o que determina a localização da região alvo é a sequência dos *primers*. Os *primers* nada mais são do que sequências de oligonucleotídeos complementares ao DNA alvo, com aproximadamente 20 bases. Dessa forma, tornam-se seletivos o suficiente para localizar um sítio único num genoma de alta complexidade. Os *primers* pareiam com a sequência alvo através da formação de pontes de hidrogênio e obedecem ao pareamento descrito por Watson e Crick (A=T e C G)^[1,16].

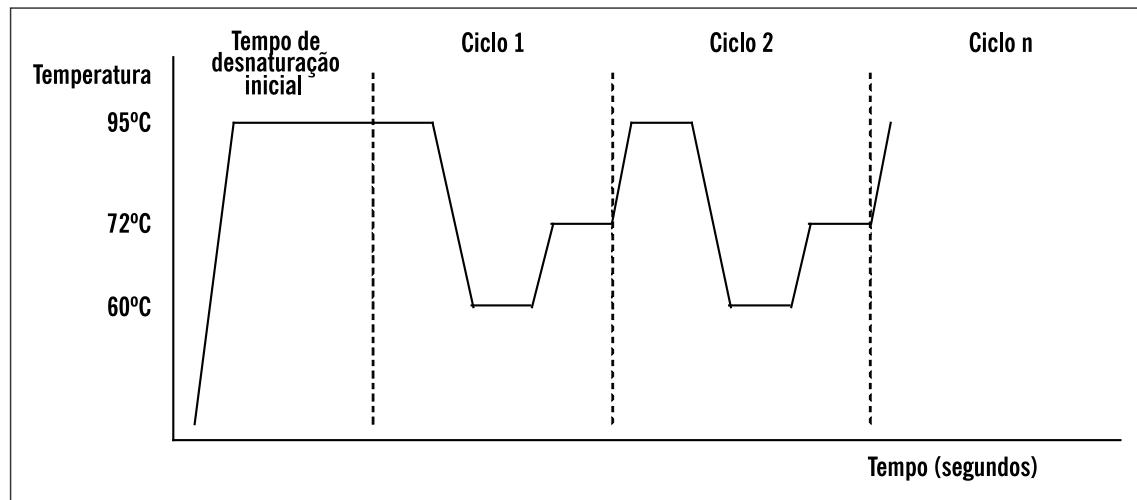
Para que ocorra a amplificação de um número suficiente de fragmentos que possam ser observados em um gel, são necessários vários ciclos de amplificação (Figura 8). Cada ciclo é composto por três etapas^[82]:

1. Etapa de desnaturação - esta etapa ocorre a alta temperatura, normalmente 94 a 95°C. Ocorre a perda da estrutura de dupla hélice e a separação das fitas de DNA a fim de que os *primers* tenham acesso à região alvo. No primeiro ciclo, pode-se utilizar um tempo de desnaturação maior para que todo o DNA se separe, facilitando a ligação dos *primers* à região complementar (tempo de desnaturação inicial).

2. Etapa de anelamento (ou pareamento) - nesta etapa ocorre a ligação entre os *primers* e a fita molde nas regiões complementares em ambas as fitas de DNA. Nesta etapa a temperatura é reduzida para facilitar a ligação. Essa temperatura está entre 50 e 60°C, intimamente relacionada aos *primers*, principalmente seu tamanho e sua sequência de nucleotídeos.

3. Etapa de extensão - a etapa de extensão é aquela em que a Taq DNA polimerase entra em ação. A temperatura de trabalho da enzima é de 72°C. A essa temperatura ela posiciona-se junto aos *primers* e inicia a síntese da nova fita. A Taq DNA polimerase é auxiliada pelo magnésio e polimerizando os nucleotídeos (dNTPs).

Figura 8. Gráfico representando esquematicamente os ciclos durante a PCR. Inicialmente, um ciclo de 95°C para desnaturação completa das fitas de DNA e depois as etapas de desnaturação, anelamento e polimerização, que se repetem a cada ciclo.



Durante a reação, os ciclos são repetidos várias vezes até que se obtenha uma quantidade de cópias do DNA alvo suficiente para visualização em gel. Normalmente o número de ciclos não ultrapassa 40. A cada ciclo ocorre um aumento no número de cópias, e esse aumento acontece de forma exponencial.

A reação em cadeia da polimerase é realizada em um equipamento responsável basicamente por executar as diferentes alterações de temperatura. Esse equipamento é o termociclador.

Análise dos fragmentos amplificados

Como já foi dito anteriormente, a PCR é uma forma de amplificação de DNA a fim de que ele possa ser visualizado em um gel. Após diversos ciclos de amplificação, é formada uma grande quantidade de cópias idênticas a uma determinada região da sequência alvo; essas cópias são chamadas de produtos de PCR, ou *amplicons*. Esses *amplicons* são então depositados em um gel de agarose e submetidos a uma corrente elétrica que força sua migração pelo gel (Figura 9). Na migração, produtos de PCR menores migram mais rapidamente do que os produtos maiores, ocorrendo uma separação ou migração conforme o tamanho do *amplicon*. Normalmente, junto aos produtos da reação de PCR, utiliza-se nesse gel um marcador de peso molecular, que é simplesmente uma sequência de fragmentos de DNA, de diferentes tamanhos, previamente conhecidos^[16,82].

Para a visualização do DNA no gel, ele é corado com brometo de etídio, que é uma substância que se intercala ao DNA e, ao ser exposta à luz UV, é excitada e emite um brilho próprio.

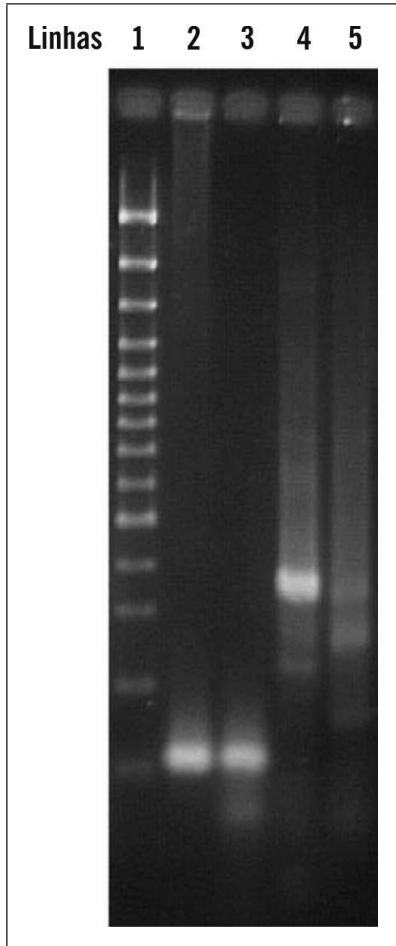


Figura 9. Figura demonstrativa de uma reação de PCR após migração em gel de agarose, corado com brometo de etídio e submetido à luz UV. Na linha 1 está o marcador de peso molecular utilizado para comparar o tamanho dos *amplicons* obtidos na reação de amplificação. Nas linhas 2 e 3 estão as amostras testadas e na linha 4 um controle positivo da reação^[23].

Considerações sobre ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase

Embora seja uma técnica amplamente utilizada atualmente, com grande sensibilidade e também especificidade, alguns cuidados devem ser considerados para seu emprego. A escolha dos *primers* é um deles; são eles que dão a especificidade à reação. Afinal, são os *primers* que determinam a região que será amplificada. Normalmente, quanto mais conservada, ou seja, quanto menos alterações esta região sofrer dentro do DNA alvo, mais específica será a reação. Da mesma forma, devido à força de ligação, as proporções de nucleotídeos (GC e AT) dentro do DNA alvo devem ser o mais equivalentes possível, pois um excesso de ligações GC pode dificultar a separação de regiões e, consequentemente, o anelamento dos *primers*. Outro cuidado que se deve ter na elaboração dos *primers* é a tendência deles de formar estruturas terciárias, o que também impedirá sua ligação^[58,84,109].

No que se refere à amostra, qualquer material que contenha DNA pode ser utilizado. Entretanto, deve-se considerar que, por causa de sua extrema sensibilidade, mesmo que o DNA presente na amostra seja uma contaminação, ele será amplificado. Isso pode levar a resultados falso-positivos, por exemplo, na identificação de agentes infeciosos. Dessa forma, cuidados na coleta do material devem ser observados evitando-se misturar materiais de diferentes indivíduos ou mesmo tecidos de um mesmo indivíduo. A possibilidade de contaminação de amostras com DNA estranho, através de aerossóis, manipulação, frascos para coleta de amostras ou equipamentos, deve ser diminuída ao máximo que se conseguir. No laboratório, áreas específicas para preparação das soluções da reação devem ser isoladas das áreas de extração e manipulação do DNA^[58,109].

Variações dos ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase

a) *Multiplex PCR*

Nesta variação são adicionados à reação de PCR dois ou mais pares de *primers* para possibilitar, em uma mesma reação, o diagnóstico de diferentes agentes infecciosos. Cada par de *primer* é específico para um agente. Assim, é possível identificar um ou mais agentes responsáveis por determinado tipo de doença. Por exemplo, em leitões com diarreia, poder-se-ia pesquisar em uma mesma reação de PCR a presença de *Escherichia coli* específicas, parvovírus, coronavírus, entre outros^[16,82].

b) *RT-PCR*

A transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR - Reverse Transcriptase PCR) é utilizada em situações em que a amostra inicial seja RNA. Uma vez que a reação de PCR utiliza DNA como molde inicial, em amostras contendo somente RNA é necessário inicialmente produzir uma fita molde de DNA ou DNA complementar (cDNA). Este cDNA é produzido a partir do RNA utilizando-se uma enzima, a transcriptase reversa, em uma reação semelhante à de PCR. Após a obtenção do cDNA, essa nova molécula é utilizada como molde para a reação de PCR convencional. Esta técnica é amplamente utilizada para detecção de vírus com material genético RNA e em estudos de expressão gênica^[16,60].

c) *Nested PCR*

Na reação de *nested PCR* ocorre uma dupla amplificação do DNA alvo. Essa dupla amplificação aumenta a sensibilidade e a especificidade da reação. Para a realização dessa variação do PCR são utilizados dois pares de *primers*: o primeiro par, chamado par externo, amplifica uma determinada região do DNA alvo; o segundo par de *primers*, chamado par interno, amplifica uma região interna à primeira amplificação feita pelos pares de *primers* externos. Dessa forma se tem, vulgarmente falando, um produto gerado por uma PCR da PCR^[60,82].

d) *Real Time PCR*

Nesta variação é possível, além de identificar a presença de um agente, por exemplo, quantificá-lo, em tempo real, durante a reação de PCR. Isso é feito utilizando-se o par de *primers* e uma sonda específica para a região alvo marcada com um fluorocromo. A cada ciclo da reação em que vão sendo amplificados os fragmentos de DNA através da extensão da cadeia pela DNA polimerase, as sondas vão emitindo um sinal fluorogênico, que é captado na forma de intensidade luminosa. Na técnica de *Real Time PCR* é utilizado um termociclador especial com capacidade de, além de produzir os ciclos da reação de PCR normal, captar o sinal luminoso emitido pelas sondas^[16, 58, 109].

12. EXAMES SOROLÓGICOS

Inúmeros testes que medem a produção de anticorpos estão conhecidos. A finalidade básica é detectar ou quantificar anticorpos produzidos pelo hospedeiro para agentes infecciosos em resposta ao contato com o referido agente^[31]. Por utilizar o soro sanguíneo na pesquisa de anticorpos, eles são denominados **testes sorológicos**. Os mais frequentemente utilizados em doenças dos animais são a Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAL), Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR), Micro-hemoaglutinação, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), 2-Mercaptoetanol (2-ME), Fi-

xação de Complemento (FC) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)^[107]. Outros testes frequentemente utilizados para doenças virais são Soroneutralização, Vírus Neutralização, Inibição da Hemoaglutinação, Hemoaglutinação, Microaglutinação e Agar Gel Precipitação (AGP).

12.1 Teste de ELISA

O teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), ou ensaio imunoenzimático, como é conhecido no Brasil, é um teste que tanto pode ser utilizado para detectar anticorpos, como proteínas ou agentes infecciosos^[30]. Isso permitiu um avanço muito grande no estudo e no diagnóstico das doenças infectocontagiosas. A técnica é tão sensível que pode detectar concentrações de cerca de 1ng por mililitro^[47]. O teste do diagnóstico de ELISA tem inúmeras aplicações, como a mensuração de proteínas de interesse em soro, plasma ou em outras soluções. É uma ferramenta revolucionária tanto no diagnóstico como na pesquisa científica.

A técnica de ELISA pode ter diferentes graus de sensibilidade, especificidade ou acurácia que dependerão dos reagentes, do método, do antígeno ou dos anticorpos empregados^[47]. A grande maioria dos problemas na realização da técnica de ELISA ocorre por falhas do operador, como falta de bom-senso da prática laboratorial, falha por não seguir adequadamente o protocolo, desorganização no desempenho da técnica, ou equipamento mal conservado. Uma pequena percentagem dos problemas é causada pela qualidade inadequada da água^[25].

A técnica de ELISA geralmente é utilizada de forma qualitativa, produzindo resultado positivo ou negativo. A determinação do resultado vai depender do estabelecimento de um ponto de corte (*cut-off*) obtido a partir de amostras sabidamente positivas e negativas. Alguns testes ou *kits* também podem ter um intervalo nos valores de espectrofotometria como suspeitos. No entanto, o teste de ELISA também pode ser utilizado para análises quantitativas, nos quais se determina a quantidade de determinado antígeno ou proteína em uma amostra.

Imunoensaio é um teste que usa anticorpos como reagente; já o imunoenzimático faz uso de uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase) ligada a um anticorpo que reage com um substrato cromógeno para permitir a formação de cor e possibilitar sua medida por determinada frequência de onda. O teste geralmente é realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades^[30].

A maioria dos testes de ELISA é de fase sólida, ou seja, um anticorpo de captura é adsorvido na placa de poliestireno. O pH ideal deve ser de uma a duas unidades acima do ponto isoelétrico da proteína a ser ligada à placa^[24].

Existem primordialmente três metodologias básicas usadas para se desenvolver um teste de ELISA; o ELISA direto, o indireto e o sanduíche. Todos esses três sistemas também podem ser usados em ensaios conhecidos como ELISA por inibição ou competição, que podem ser utilizados para medir tanto anticorpos como抗ígenos. ELISA por inibição ou competição são ensaios para determinação e quantificação de uma substância por sua habilidade de interferir em um sistema titulado pré-estabelecido^[24].

a) Teste de ELISA direto

O teste de ELISA direto (Figura 10) é aquele em que a placa é adsorvida com o antígeno e um anticorpo específico conjugado; em seguida, é adicionado o substrato cromógeno. A formação de cor é determinada pela reação da enzima que está conjugada ao anticorpo com o substrato cromógeno. A reação é terminada após um tempo pré-determinado para se fazer a leitura em espectrofotômetro. O anticorpo conjugado a ser utilizado (também pode ser conjugado com biotina) está ligado (conjugado) à enzima avidina, que irá catalisar^[24,47].

Figura 10. ELISA direto.

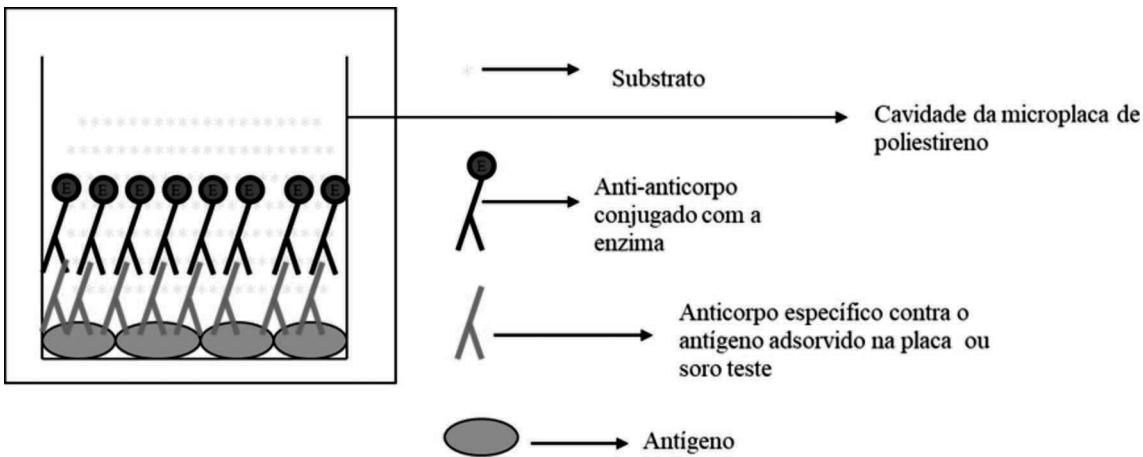


O ELISA direto é o formato mais simples de ELISA, em que a placa é adsorvida diretamente com o antígeno e, depois, utiliza-se anticorpo específico conjugado com enzima peroxidase ou fosfatase alcalina. Dependendo da enzima, utiliza-se o substrato/cromóforo, então a enzima conjugada ao anticorpo irá catalisar o substrato/cromóforo.

b) Teste de ELISA indireto

No teste de ELISA indireto (Figura 11), após a adsorção da placa com antígeno é adicionado soro suspeito ou anticorpo contra o antígeno. Só em seguida é incubada com anticorpo conjugado (peroxidase ou fosfatase alcalina) e anti-imunoglobulina espécie específica. Depois disso, adiciona-se o substrato e depois de determinado tempo se agrega uma solução ácida (ácido clorídrico ou sulfúrico) para neutralizar a enzima e parar a reação. Os últimos passos são a leitura da placa no espectrofotômetro e a análise dos dados no computador^[24,47].

Figura 11. ELISA indireto.

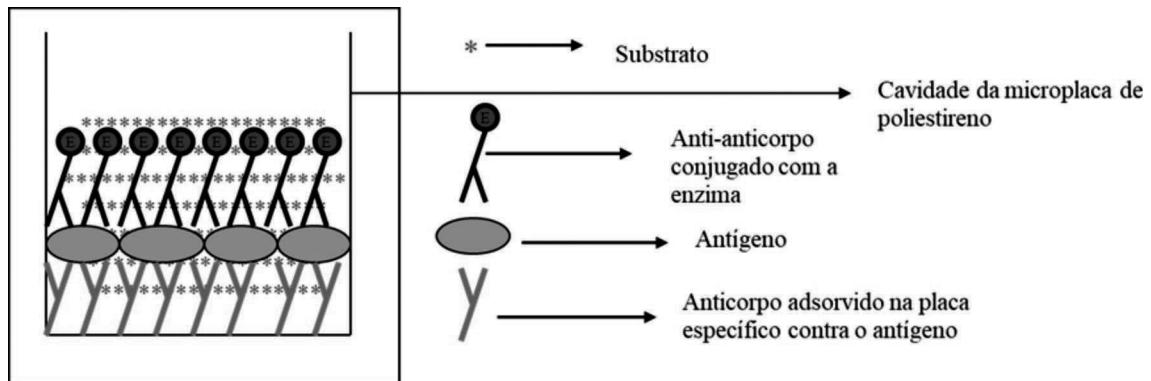


O ELISA indireto é uma técnica similar à do ELISA direto, mas envolve um passo a mais, que é a adição de um anticorpo não conjugado. Neste caso, o anticorpo conjugado não tem afinidade de ligação ao antígeno e sim ao anticorpo não conjugado que está ligado ao antígeno.

c) Teste de ELISA sanduíche direto

No teste de ELISA sanduíche direto (Figura 12) um anticorpo específico contra o antígeno é adsorvido na placa. Após isso, é adicionado o antígeno e então o anticorpo conjugado contra o antígeno. O antígeno deve ter mais de um sítio antigenico, e os anticorpos de detecção e os adsorvidos podem ser do mesmo animal, de diferentes animais ou de espécies diferentes^[24].

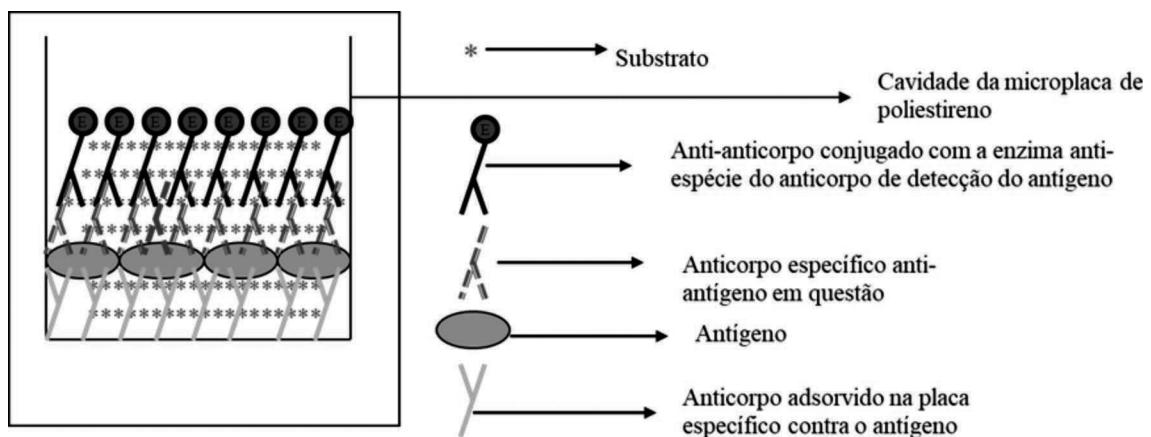
Figura 12. ELISA sanduíche direto.



d) Teste de ELISA sanduíche

No ELISA sanduíche (Figura 13), a placa é adsorvida com um soro ou anticorpo específico contra o antígeno, assim como no sanduíche direto. Após essa etapa, adiciona-se o antígeno e incuba-se. O antígeno (amostra suspeita) então é detectado por anticorpo de espécie diferente e este é detectado por anticorpo conjugado mediante a adição de substrato (o anti-anticorpo de detecção ou o anticorpo conjugado não podem reagir contra o anticorpo com o qual a placa foi adsorvida)^[24].

Figura 13. ELISA sanduíche indireto.



e) Teste de ELISA por competição e de inibição

O teste de ELISA por competição e o de inibição podem ser montados com qualquer uma das configurações descritas acima e podem ser utilizados tanto na medição de anticorpos como de抗ígenos^[24]. No ELISA por competição é colocada na placa uma amostra titulada (concentração conhecida) de antígeno ou anticorpo e então são adicionadas as amostras desconhecidas (teste). Elas competirão pelo anticorpo ou antígeno adsorvido na placa. Quanto maior a concentração do antígeno/anticorpo presente na amostra, maior será a competição com o padrão conhecido. No ELISA de inibição o antígeno/anticorpo titulado será inibido pelo antígeno/anticorpo presente na amostra, e quanto maior a concentração desse agente inibidor, menor será a ligação do primeiro, então diminuirá a formação de cor (cromogenicidade) do teste.

Cuidados na realização da técnica

Obviamente, após cada uma das fases iniciadas pela impregnação (*coating*) da placa, é necessário fazer a lavagem. Esse procedimento é muito importante, pois quando se lava a placa se retira o excesso de anticorpos ou抗ígenos (dependendo da fase) que estão presentes, mas não ligados, e devem ser removidos (lavagem) para que não interfiram no seguimento do teste. Existem diferentes tipos de soluções de lavagem.

A maioria dos testes utiliza PBS a 0,1M em pH 7,4; em alguns testes também se utiliza tween 20 a 0,05%, mas deve-se tomar muito cuidado com esse produto, pois pode reagir com o antígeno, ou outros reagentes, e formar bolhas nas cavidades da placa impedindo que elas sejam lavadas corretamente. A lavagem pode ser feita de diferentes maneiras. Uma delas e a mais indicada é a lavagem com máquina específica, a qual lavará bem e de forma homogênea todas as cavidades da placa. Também se utiliza um pipetador multicanal para encher as cavidades e logo após, de um só golpe, deve-se verter todo o líquido de todas as cavidades num recipiente com desinfetante. Vale lembrar que se deve evitar a contaminação entre as cavidades na hora da lavagem^[24].

Para a impregnação (*coating*) da placa utilizam-se diferentes métodos. Incubação *overnight* a 4°C, 1 a 3 horas a 37°C, ou ainda 1 a 3 horas a temperatura ambiente. Porém, para cada teste pode haver um sistema que funcionará melhor. Os resultados de um teste de ELISA são facilmente alterados por pequenas modificações de concentração de soluções ou de temperatura. Dessa forma, devem-se preferir sempre sistemas mais estáveis, como a estufa a 37°C ou *overnight* na geladeira a 4°C, em vez da temperatura ambiente, que pode sofrer maiores variações.

A temperatura ambiente da sala e das soluções com as quais se realiza um teste de ELISA, seja ele de um *kit* pronto ou em desenvolvimento, deve estar estável em 23°C. Alguns testes podem não sofrer qualquer alteração com variações de cinco ou seis graus Celsius para mais ou para menos; outros, porém, podem alterar muito os resultados. Da mesma forma, os reagentes devem ser utilizados na temperatura recomendada pelo fabricante do *kit*, e no desenvolvimento e na validação de testes deve-se trabalhar com reagentes e soluções sempre na mesma temperatura.

Aplicações do teste de ELISA

O teste de ELISA é uma ferramenta muito importante, tanto na medicina veterinária como em medicina humana. Ele permite a realização com rapidez e sensibilidade de testes sorológicos contra doenças infecciosas que fornecem uma radiografia do *status* sanitário contra enfermidades infecciosas. Também é utilizado como triagem (*screening*) sorológico para determinar animais infectados com doenças infecciosas em que os indivíduos se tornam portadores, como no caso de retrovírus, ou persistentemente infectados, como o que ocorre em animais infectados no terço inicial da gestação (pestivírus) ou, ainda, vírus que entram em latência no hospedeiro (herpesvírus e retrovírus)^[30, 60].

A técnica de ELISA foi fundamental em campanhas de erradicação de enfermidades, como a doença de Aujeszky no estado de Santa Catarina. Nesse programa de erradicação foi utilizada uma vacina contra o vírus da doença de Aujeszky que havia sofrido deleção de uma de suas glicoproteínas (gE) não fundamentais na replicação viral. Em contrapartida, é desenvolvido e validado um teste de ELISA contra a proteína viral deletada, glicoproteína E (gE). Assim, se um animal vacinado for positivo para essa proteína viral que foi deletada na amostra vacinal, isso indica que o animal se infectou com o vírus de campo e deve ser eliminado do rebanho^[59]. A mesma tecnologia foi empregada com sucesso na erradicação da Aujeszky nos Estados Unidos, na Europa e no Japão^[30]. Da mesma forma, essa tem sido a estratégia de vários países europeus para controlar ou erradicar o vírus da Rinotraqueite Infecciosa Bovina tipo 1 (BoHV-1).

Em laboratórios de produção de vacinas a técnica de ELISA é utilizada para determinar a concentração de抗ígenos em partidas de抗ígeno purificado ou em vacinas. Também é utilizado na determinação de títulos de anticorpos presentes no soro de animais após a vacinação. Mas deve-se ter cautela ao analisar esse tipo de dado, pois os títulos de anticorpos detectados pela técnica de ELISA são anticorpos totais, e para garantir que o animal esteja protegido contra determinada doença viral necessitamos ter títulos de anticorpos neutralizantes, que são medidos pela técnica de soro-neutralização. Assim, quando utilizamos o ELISA, analisamos apenas soro-conversão e não soro-proteção.

Validação do teste de ELISA

Toda técnica de diagnóstico, antes de ser empregada em laboratórios de diagnóstico ou de pesquisa, necessita ser validada. A validação é realizada para determinar estatisticamente qual é a sensibilidade, a especificidade, a acurácia, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo. Para determinação desses dados, faz-se necessária a realização de dezenas, centenas ou milhares de testes comparando-se os resultados a outra técnica de diagnóstico, de preferência uma técnica padrão para detecção de anticorpos ou抗ígeno, reconhecida por organizações internacionais, como a OIE, FAO, OMS ou outras. A quantidade exata de amostras a serem testadas deverá ser determinada estatisticamente e dependerá do emprego para o qual se deseja a nova técnica. Na validação deverão ser testados números semelhantes de amostras positivas e negativas, determinadas por técnica padrão.

Quando houver necessidade de trocar algum dos reagentes da técnica por outro lote ou fabricante, deve-se fazer um teste de equivalência para saber se a técnica continua apresentando especificidade, sensibilidade e acurácia semelhantes ou se esses valores foram alterados.

Vantagens do teste de ELISA

O teste de ELISA é versátil, fácil de executar e requer basicamente uma leitora de placas, uma lavadora, pipetadores e ponteiras. Os tampões e reagentes não são caros, o que torna a técnica de baixo custo, e ainda por ser realizado em placas e permite a execução de centenas de testes por dia. O tempo para realização do teste depende de quantas etapas o teste contém, e isso depende do tipo de ELISA. Geralmente a etapa de impregnação (*coating*) é a mais demorada, pois algumas vezes é feita *overnight*.

O teste de ELISA é o teste mais utilizado, tanto na medicina humana como na veterinária, para triagem de pessoas ou animais no controle de doenças infecciosas. Também é utilizado em laboratórios de pesquisa e de produção de vacinas e medicamentos para titular抗ígenos ou anticorpos. O teste de ELISA não sofre tanta interferência da qualidade do soro, como ocorre na soro-neutralização, e é mais sensível, pois não detecta apenas anticorpos neutralizantes, como na técnica de soro-neutralização. Outra vantagem é não requerer cultivo celular para implantação do

teste. Usualmente se utiliza uma placa de 96 cavidades inteira. Alguns fabricantes de *kits* fornecem colunas de cavidades ou cavidades individuais para quando se necessita testar poucas amostras. O teste de ELISA pode tornar-se ainda mais específico quando anticorpos monoclonais forem utilizados em alguma das etapas.

Desvantagens do teste de ELISA

O teste pode ter resultados alterados por eventos aparentemente pouco “importantes”, como a variação de alguns graus na temperatura ambiente ou de seus reagentes. O pH e a concentração de soluções e reagentes também podem influenciar nos resultados do teste. O fator mais importante de falhas no teste de ELISA é a qualidade da água utilizada^[24]. Outros fatores, como a calibração de pipetas, poderão interferir facilmente nos resultados. Por isso, é importante fazer calibração periódica dos equipamentos. O custo elevado de equipamentos como a leitora de ELISA e equipamento para lavagem automática de placas são considerados um fator limitante do teste. A necessidade de utilização de anticorpos monoclonais para melhorar a especificidade do teste também pode ser considerada um ponto negativo da prova.

No controle da eficácia de vacinas deve-se tomar muito cuidado com a interpretação dos resultados de ELISA, pois esse teste detecta anticorpos totais do soro, e na eficácia de vacinas o mais importante são os títulos de anticorpos neutralizantes. Mesmo quando um teste de ELISA apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade, quando for testado um elevado número de amostras ocorrerão resultados falso-positivos e falso-negativos, muitas vezes obrigando a um reteste.

12.2 Soroaglutinação

O princípio desse ensaio envolve a reação de **aglutinação**. As imunoglobulinas, ou os anticorpos, são proteínas naturalmente capazes de se ligar à superfície de抗ígenos em suspensão e de induzir a formação de agregados visíveis^[31]. Anticorpos diferem em sua habilidade de aglutinar. Por exemplo, IgM apresenta maior capacidade aglutinante do que IgG.

As **reações de aglutinação** envolvem tanto抗ígenos solúveis aderidos a partículas quanto bactérias, hemácias, partículas e células carreadoras de moléculas antigênicas, resultando na formação de grandes agregados visíveis da ligação simultânea de anticorpos. Tal ligação ocorre por intermédio das **pontes de anticorpos** entre dois sítios de combinação idênticos, com抗ígenos ou determinantes antigênicos em diferentes células ou partículas, formando redes ou **retículos**. Em condições adequadas, esses retículos crescem até formar grumos grandes, visíveis a olho nu. Quando observados ao microscópio, tais grumos se mostram formados por centenas de células^[37,97,100].

No fenômeno de aglutinação, a visualização depende somente do tamanho dos agregados formados e, consequentemente, da relação entre anticorpos e partículas. Se couber somente uma molécula por partícula, não se dará a aglutinação e a célula ficará com o anticorpo à sua superfície, resultando em uma célula sensibilizada^[18]. Essas reações são muito sensíveis, fáceis de visualizar e de realizar. São classificadas em **aglutinação direta** e **aglutinação indireta**.

Os testes de **aglutinação direta** detectam no soro do animal suspeito anticorpos contra partículas insolúveis, na forma íntegra ou fragmentada, como抗ígenos celulares relativamente grandes presentes na superfície dos eritrócitos, na parede celular das bactérias, dos parasitas e fungos que estejam causando uma determinada doença no animal. Os testes de aglutinação direta podem ser realizados em lâminas de vidro, e assim é denominado **Soroaglutinação Rápida (SAR)**, ou em tubos de ensaio, denominado **Soroaglutinação Lenta (SAL)**.

a) Soroaglutinação rápida em placa (SAR)

Os testes de soroaglutinação rápida são bastante sensíveis na detecção de anticorpos IgM, presentes no início da infecção e, por isso, são rotineiramente indicados para procedimentos de triagem de doenças^[20,44]. Volumes iguais (uma gota de aproximadamente 30µl) de soro sanguíneo do animal a ser testado quanto à presença de um determinado anticorpo e de antígeno específico contra o anticorpo pesquisado são misturados em uma superfície de papel, lâmina ou placa de vidro, homogeneizados e, se positiva, a reação de aglutinação será visível a olho nu pela presença de grumos. A adição de corante no antígeno facilita a visualização do resultado. O teste deve ser realizado em temperatura entre 20 e 25°C. O resultado, quando a reação é positiva, é visualizado num período variável de 2 a 5 minutos, no máximo. Devido ao pequeno volume de reagentes utilizados, uma leitura rápida do resultado é necessária antes que os líquidos possam evaporar. A SAR é rotineiramente utilizada como avaliação qualitativa, ou seja, o resultado é apresentado como amostra positiva ou negativa.

b) Soroaglutinação lenta em tubo (SAL, SALT, SAT)

O princípio do teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) é o mesmo da SAR. No entanto, devido ao longo tempo de incubação, os testes de aglutinação em tubos são frequentemente mais sensíveis^[31].

Para a realização deste teste, as amostras de soro de animais suspeitos e contendo anticorpos são diluídas em série, geralmente em duplicatas. Em tubos de ensaio contendo solução salina, fazem-se diluições crescentes de maneira que o tubo sucessivo contenha a metade de anticorpo do tubo anterior (ex.: 1:10, 1:20, 1:40...). Em seguida, um volume constante do antígeno padronizado e específico para um determinado patógeno é adicionado aos tubos. Esses são incubados na temperatura que favorece o crescimento do patógeno e da ligação antígeno-anticorpo por aproximadamente 24 a 48h, dependendo também das exigências do agente em estudo.

A prova de SAL possibilita determinar o nível de anticorpos existentes em um soro por meio da titulação. Quanto mais anticorpos no soro, maior será o **título**. As diluições devem ser realizadas até que não exista anticorpo livre para reagir com o antígeno^[100]. Nesse formato, a SAL pode ser considerada um teste quantitativo.

Aplicações dos testes de soroaglutinação

A SAR é um teste rotineiramente utilizado para triagem. Porém, deve-se fazer a ressalva de que há possibilidade de falso-positivos uma vez que o teste normalmente é desenhado para ser extremamente sensível, perdendo em especificidade. Por isso, amostras positivas são submetidas a outros métodos complementares, mais específicos e definitivos, como fixação de complemento (FC), antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-meparercaptoetanol (2-ME), inibição da hemaglutinação e SAL, definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) como provas oficiais^[13].

A prova AAT (Rosa de Bengala) utilizada para testes de brucelose tem como princípio a soroaglutinação. Entretanto, a acidificação do antígeno (pH 3,65) reduz as ligações inespecíficas com a IgM, tornando a prova seletiva para detecção específica de IgG. Muitos falso-positivos são devidos à vacinação, uma vez que esses animais possuem maior nível de IgM circulante^[17,26,34,36,44,62,63].

A prova AAT substitui a SAR como teste de triagem com as vantagens de boa sensibilidade e especificidade associadas à rapidez e simplicidade na execução. O teste é recomendado oficialmente para detecção de anticorpos anti-*Brucella*^[36,56,62,63].

O 2-ME é um teste complementar ao testes de soroaglutinação lenta em tubos (SAT), recomendado pelo Mapa para detecção de anticorpos anti-*Brucella* por possuir maior especificida-

de do que a SAR, SAT e AAT^[19,36]. Devido à adição do 2-mercaptopetanol, assim como o teste do AAT, possui a vantagem de eliminar interferências inespecíficas da IgM mantendo a atividade seletiva para detectar IgG^[29,16]. Foi verificado que, 2-ME teve maior especificidade em relação ao SAL e ao AAT; no entanto, SAL teve uma sensibilidade maior que o 2-ME e especificidade maior que o AAT^[36].

Outra aplicação bastante ampla dos testes de SAR e SALT é a monitoria e o diagnóstico das salmoneloses e das micoplasmoses aviárias. A Portaria Nº 297, de 15 de junho de 2010, divulga a Norma Técnica para Certificação Sanitária dos Estabelecimentos Avícolas Comerciais para Salmoneloses (*Salmonella Gallinarum*, *Salmoenella Pullorum*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*) e Micoplasmoses aviárias (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma melleagridis*). Essa norma estabelece como provas sorológicas oficiais a SAR, a SALT e a microaglutinação para diagnóstico e monitoria das salmoneloses aviárias e SAR, SALT, ELISA e Inibição da hemaglutinação (HI) para micoplasmoses aviárias^[12]. A presença de grumos como resultado da SAR evidencia o resultado positivo, indicando que a ave foi vacinada ou infectada. Nesse caso, a amostra deve ser submetida a testes complementares e definitivos, como HI, SALT e ELISA.

Vantagens e desvantagens da soroaglutinação

A principal vantagem no uso das técnicas de soroaglutinação é a simplicidade e a rapidez na execução, associadas ao baixo custo da prova, com boa sensibilidade e especificidade.

Como principais desvantagens, tanto SAR quanto SAT apresentam como principal desvantagem muitas reações cruzadas entre bactérias que possuem constituição de parede celular similar, como *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella bovis* e *Brucella abortus*, bem como não diferenciam anticorpos vacinais (IgM), gerando resultados falso-positivos^[17,18,44,53,62,107]. Além disso, a aglutinação é uma reação simples, mas que não se produz em ausência completa de sais como fornecedores de eletrólitos^[49]. Forças eletrostáticas influenciam na formação dos agregados em solução. Por isso, certas condições são usualmente necessárias para bons resultados. Muitas superfícies bacterianas exibem cargas negativas e, por isso, elas tendem a se repelir umas das outras. A presença de eletrólitos, mesmo em quantidades mínimas, é fundamental para neutralizar a carga elétrica das partículas. Quando as forças repulsivas são neutralizadas, as células se aproximam formando pontes moleculares que levam à formação dos complexos aglutinantes. No entanto, a adição de sal em excesso pode ocasionar uma reação de aglutinação mesmo na ausência de anticorpos^[14,31,37].

Na reação de aglutinação, o excesso de anticorpos leva à inibição da aglutinação na região de excesso denominada **pró-zona**. Nesse caso, para observar a aglutinação é necessário fazer diluição extremamente elevada do soro (anticorpo) a fim de evitar o efeito pró-zona. Além disso, a amostra teste pode conter moléculas bloqueadoras, além de anticorpos aglutinantes, que em amostras de soros não diluídos ou em baixa diluição impedem a formação das pontes de ligação entre as células e bloqueiam o acesso ao epítopo^[37].

12.3 Aglutinação de partículas

Nos testes de **aglutinação indireta (passiva)**, a formação do complexo antígeno-anticorpo pode ocorrer se抗ígenos solúveis estiverem adsorvidos sobre partículas de polímeros sintéticos, que funcionam como carreadores artificiais, como poliestireno, bentonita, argila e esferas de látex com diâmetro menor do que uma bactéria. Células antigenicamente não rela-

cionadas com o antígeno a ser pesquisado, como hemárias e bactérias, também podem ser utilizadas como carreadoras. Comumente, as partículas mais utilizadas são as hemárias e, por isso, a técnica é denominada **hemaglutinação indireta** ou **hemaglutinação passiva**^[27,31,100]. Neste caso, não é possível visualizar a formação de grumos, mas uma hemólise, como resultado da ligação de anticorpos aos抗ígenos adsorvidos na parede da hemácia, causando hemólise como resultado positivo.

Os testes conhecidos como **aglutinação de látex** são comumente usados para detecção rápida de anticorpos contra muitas doenças bacterianas e virais. Nesses testes, o anticorpo reage com o antígeno solúvel aderido às partículas e então aglutanam mais intensamente que na aglutinação direta. O mesmo princípio pode ser aplicado de modo inverso usando partículas inertes recobertas com anticorpos para detectar抗ígenos específicos^[100].

Comercialmente, vários *kits* estão disponíveis para detecção de抗ígenos ou de anticorpos via aglutinação de partículas carreadoras artificiais, como esferas de látex ou outras, com a superfície recoberta de moléculas de anticorpos ou抗ígenos. Tais sistemas comerciais possuem seus próprios diluentes e controles e são, geralmente, realizados em cartões de papel. A leitura das reações é graduada em uma escala de 1+ a 4+. Amostras controle são analisadas antes de iniciar os testes. Se uma amostra reage com ambas as soluções teste e controle, o teste é considerado não específico e, portanto, não interpretável^[31]. As partículas inertes podem ser sensibilizadas com uma grande variedade de抗ígenos solúveis ou, ainda, por agentes químicos por meio de ligações covalentes, em sistemas *in house* para uso no próprio laboratório, especialmente em pesquisa.

Os principais patógenos detectados são salmonela em alimentos, listéria, legionela, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *N. gonorrhoeae*, estafilococos e estreptococo beta-hemolítico pertencente aos grupos A, B, C, D, F e G e detecção de fímbrias de *E. coli*.

Vantagens e desvantagens da aglutinação

Devido ao grande número de moléculas de anticorpos ligadas à superfície de cada esfera de látex, o potencial de sítios expostos ligando抗ígeno é ainda maior. Além disso, o tamanho do carreador (a esfera de látex é de 0,8μm ou maior) aumenta a facilidade com a qual a reação de aglutinação é visualizada, possibilitando que a ligação extremamente específica possa detectar níveis tão baixos quanto 0,1ng/ml de polissacarídeos^[31].

Como desvantagens, pode-se considerar a estabilidade das ligações que, aparentemente simples, são influenciadas por diversos fatores, como a quantidade e a avidez do抗ígeno em relação ao carreador, o tempo de incubação do teste, o pH, a osmolaridade e a concentração iônica da solução. Por isso, as condições sob as quais os procedimentos de aglutinação em látex são realizados devem ser cuidadosamente padronizados. Adicionalmente, alguns constituintes do sangue têm sido relacionados como agentes causadores de reações falso-positivas nos sistemas disponíveis de aglutinação em látex. A fim de neutralizar esse problema, é recomendável que todas as amostras sejam pré-tratadas por fervura ou com EDTA antes do teste^[31].

12.4 Soroneutralização

A soroneutralização (SN) é a técnica padrão ouro no diagnóstico laboratorial para a detecção de anticorpos específicos para uma grande variedade de agentes (toxinas bacterianas, bactérias ou vírus) associados a doenças em rebanhos animais^[32, 61, 83, 106]. É considerada uma técnica de referência para estudos sorológicos, pois os resultados, além estarem mais associados com

as respostas *in vivo*, possibilitam medir a capacidade dos anticorpos presentes em um soroteste e de neutralizar a atividade biológica de um determinado antígeno com capacidade infectiva ou citopática.

O antígeno padronizado e o soroteste são misturados em condições apropriadas e, em seguida, inoculados em cultura de células, ovos ou animais. A presença do antígeno não neutralizado pode ser detectada, em diferentes tempos, por meio de reações, tais como efeito ciptopático, hemadsorção/hemaglutinação, formação de placas ou doença nos animais inoculados. Além disso, pode-se utilizar técnicas de imuno-histoquímica/imunofluorescência ou colorações especiais para detectar a presença da infecção celular. No caso de ovos embrionados, observa-se a morte do embrião ou a lesão específica.

12.5 Vírus neutralização

O termo **neutralização** é usado para descrever reações antígeno-anticorpo nas quais uma substância antigênica dotada de atividade biológica é bloqueada por anticorpos neutralizantes, inibindo a infectividade do vírus ou a ligação deste a receptores da célula hospedeira. Quando a substância antigênica bloqueada (neutralizada) é um vírus, a técnica denomina-se **vírus neutralização**. A neutralização em seu contexto significa, na realidade, proteção, expressa em termos da capacidade de proteção conferida pelo antissoro contra os efeitos lesivos do antígeno^[31, 96].

O princípio da vírus neutralização é a neutralização de uma determinada quantidade fixa de partículas virais pelos anticorpos neutralizantes presentes no soro do animal infectado. Como a prova é feita baseada na diluição seriada, é possível determinar o título de anticorpos neutralizantes presentes no soro que corresponderá à recíproca da última diluição do soro capaz de neutralizar o efeito citopático ou a atividade biológica determinada pelo vírus^[99].

Os vírus que apresentam efeito citopático (dano celular) em linhagens celulares sensíveis ou em ovos embrionados podem ser usados para detectar a presença de anticorpos neutralizantes. Assim, diferentes diluições do soro a ser testado são misturadas a uma suspensão de partículas virais do vírus de interesse com concentração constante e então adicionadas a uma cultura de células sensíveis ou inoculado em ovos embrionados. Paralelamente, outra suspensão de vírus é misturada com soro de animal não infectado (normal), servindo de amostra-controle negativa. A suspensão viral é, então, inoculada em uma cultura celular sensível à infecção viral. Nas células-controle, onde não há anticorpos neutralizantes, haverá evidência de infecção viral. Entretanto, se no soroteste houver anticorpos contra o vírus, estes se ligarão às partículas virais inibindo a infecção das células do cultivo e, assim, não serão desencadeados efeitos citopáticos nem a infecção celular^[17, 31]. Nesse caso, podemos medir a capacidade de um dado soro em neutralizar a infectividade do vírus em uma linha de células sensíveis.

Em razão da complexidade técnica na execução, quando comparados a outros testes, especialmente a métodos moleculares, os testes de **vírus neutralização (VN)** demandam tempo e têm sido realizados somente por laboratórios de referência^[17]. Além de detectar e quantificar a presença de anticorpos específicos no diagnóstico de infecções virais, o teste de vírus neutralização é muito utilizado para caracterização de vírus.

A soroneutralização viral (SN) é utilizada para detecção de anticorpos contra vírus causadores de algumas doenças de aves, como vírus da doença de Gumboro e da bronquite infecciosa das galinhas. Também é o método mais aceito e utilizado para outras doenças de suínos e bovinos, como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), doença de Aujeszky (DA), influenza suína, diarreia viral bovina (BVD), peste suína clássica (PSC), gastroenterite transmissível (TGE), encefalomelite por enterovírus e febre aftosa^[32, 61, 83].

Vantagens e desvantagens

A soroneutralização viral permite a detecção e a quantificação de anticorpos específicos com custos normalmente inferiores aos *kits* comerciais de detecção de anticorpos com quantificação. Possui elevada especificidade e sensibilidade e, por isso, é tida como prova no diagnóstico oficial em laboratórios de referência para certificação de várias doenças vírais^[83, 107].

Como **desvantagens**, a técnica necessita de infraestrutura, condições estéreis e pessoal especializado para cultivo celular, leitura e interpretação dos resultados. Este método exige linhagens de células específicas para cada vírus, ou ovos embrionados, preferencialmente provenientes de plantéis *Specific Pathogen Free* (SPF) ou hemácias de qualidade. É um teste bastante laborioso, o que demanda tempo para o processamento. Também existe a possibilidade de reação cruzada com anticorpos contra outros vírus e a existência de amostras tóxicas que impossibilitam a interpretação dos resultados. Neste caso, deve ser utilizado um segundo teste de neutralização^[83, 107]. Outra possibilidade a ser considerada é a existência de amostras de animais em estado de latência que ainda não desenvolveram anticorpos ou que apresentam um nível muito baixo, não sendo detectado pela SN e resultando em falso-negativo.

12.6 Fixação de complemento

O teste de fixação do complemento é um método sorológico clássico usado para determinar a presença ou semiquantificar anticorpos em uma amostra de soro contra um elevado número de agentes patogênicos, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas, utilizando a ação do Sistema do Complemento^[40,108].

O sistema complemento é um conjunto de proteínas séricas que tem por função ajudar na eliminação de microrganismos invasores. Este sistema funciona em forma de cascata podendo a ativação ser iniciada por três vias diferentes: i) via alternativa, ii) via das lectinas e iii) via clássica. O teste de fixação do complemento tem como base a via clássica, na qual o complemento se liga aos sítios ativos da região Fc do complexo antígeno-anticorpo. Para que isso ocorra há a necessidade da presença de moléculas de anticorpos (IgM ou IgG) contra o antígeno específico no soroteste.

No soro do animal, naturalmente ocorre a presença do complemento que deve ser inativado para o teste. Em seguida, esse soro deve ser misturado com o antígeno e fonte de complemento padrão. O complemento é fixado durante a formação do complexo antígeno-anticorpo. Caso não ocorra a formação do complexo, o complemento não é fixado, na medida em que é adicionado um sistema indicador (eritrócitos de ovino sensibilizados com uma hemolisina ou anticorpo específico).

Caso o soroteste seja positivo para anticorpos contra o antígeno específico, ocorrerá a formação de imunocomplexos e consequente desencadeamento da ativação do sistema complemento. Quando isso ocorre, as proteínas do sistema complemento adicionadas são ativadas por esses imunocomplexos e então consumidas. Se, a seguir, forem adicionados eritrócitos sensibilizados, e ainda houver proteínas do sistema complemento suficientes (isto é, se não tiver sido formado um imunocomplexo), ocorrerá a ativação da cascata e consequente lise dos eritrócitos com liberação de material intracelular (hemoglobina) (teste positivo). A ativação do sistema complemento por anticorpos ligados a抗ígenos resulta na formação de complexos de ataque à membrana que podem romper a membrana celular. Se o anticorpo está ligado a抗ígenos adsorvidos nos eritrócitos, estes serão lisados^[40].

Se as proteínas do sistema complemento forem consumidas, os eritrócitos não serão lisados e, após a centrifugação, será observada a presença de um precipitado avermelhado na forma de “botão” no fundo do tubo ou da placa de microtitulação (teste negativo). Desse modo, é possí-

vel caracterizar a presença de anticorpos (Ac) ou semiquantificá-los em uma amostra de soro pela titulação do *end point*.

O teste de fixação do complemento é utilizado para o diagnóstico de uma série de enfermidades infecciosas, e também muito empregado como uma prova confirmatória após alguns testes sorológicos de triagem. Entre as principais enfermidades cujos diagnósticos podem ser elucidados pelo teste podemos citar brucelose bovina, mormo, nutaliose, anemia infecciosa equina, febre aftosa e pasteurelose das aves^[108].

Vantagens e desvantagens

O teste de fixação do complemento possui baixo custo e boa especificidade. Possui pouca demanda por equipamentos e reagentes e ao mesmo tempo permite direcionar a pesquisa sorológica contra um grande número de抗ígenos, podendo ser considerado um teste qualitativo ou semiquantitativo. Entretanto, é um teste demorado e trabalhoso e pode expressar reação cruzada entre抗ígenos. Vários fatores podem influenciar nos aspectos de especificidade e sensibilidade do teste. Entre esses fatores, podemos mencionar: perda da atividade do complemento, diluições inadequadas, contaminação em soluções, sensibilização insuficiente de hemácias, hemácias fragilizadas (velhas), e soro não inativado.

12.7 Inibição da hemoaglutinação.

O teste de **inibição da hemaglutinação viral (HI)** também tem como princípio a neutralização e é frequentemente utilizado no diagnóstico de muitos vírus que aglutinam eritrócitos^[100]. Uma grande variedade de抗ígenos, principalmente vírus e algumas bactérias, possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies de mamíferos e aves. As espécies de animais cujos eritrócitos podem ser aglutinados dependem da especificidade e das características do抗ígeno em questão.

A especificidade do teste de inibição da hemaglutinação varia de acordo com os diferentes tipos de抗ígenos (vírus e bactérias). De modo geral, são mais sensíveis que os testes de fixação do complemento e menos sensíveis que testes imunoenzimáticos, como o teste de ELISA. Entre os vírus hemaglutinantes podemos citar: influenza vírus, adenovírus, alphavirus, flavivírus, parvovírus e algumas cepas de picornavírus. Entre as bactérias, *Mycoplasma* spp. apresenta essa característica mais marcante^[41, 108].

A prova de HI é frequentemente utilizada para detecção e quantificação de anticorpos de vírus da doença de Newcastle, vírus da síndrome da queda de postura (EDS - Adenovírus tipo 3), vírus da influenza aviária e influenza suína, parvovírus suíno, *Mycoplasma synoviae* e *M. gallisepticum*.

Vantagens e desvantagens

A inibição da hemaglutinação apresenta várias **vantagens**: é um teste simples e fácil de executar, requer reagentes e equipamentos de baixo custo, e pode ser aplicada no diagnóstico sorológico de uma variedade de viroses.

Como **desvantagens**, a inibição de hemaglutinação é considerada menos sensível que os ensaios imunoenzimáticos com teste ELISA. Além disso, os reagentes devem ser frescos, pois, do contrário, padrões anormais de aglutinação podem surgir, o que tornaria a leitura e a interpretação do teste muito difíceis. O teste pode complicar-se pela presença de inibidores não específicos da hemaglutinação, como aglutininas naturais dos eritrócitos. Nesse caso, o soro deve ser tratado antes da utilização ou resultados falso-positivos ou negativos podem surgir.

12.8 Hemoaglutinação

Alguns vírus e bactérias possuem algumas proteínas (antígenos) do envelope ou de superfície capazes de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies de mamíferos ou aves. Esses antígenos se ligam ao ácido N-acetilneuramínico dos eritrócitos formando redes. As espécies de animais cujos eritrócitos podem ser aglutinados dependem da especificidade e das características do antígeno. Dependendo do agente hemaglutinante, vai variar a espécie animal cujos eritrócitos vão ser aglutinados. Por exemplo, o vírus de influenza aglutina eritrócitos de uma grande variedade de espécies animais, como galinha, cobaia, carneiro e humanas do grupo O^[48].

O princípio da técnica fundamenta-se na mistura de uma suspensão do agente hemaglutinante a ser estudado a uma suspensão de eritrócitos. Na ausência de agente com características aglutinantes, devido à ação da gravidade, os eritrócitos formam sedimento no fundo do tubo ou da placa adquirindo aspecto de um botão. No caso de ocorrer hemaglutinação, os eritrócitos sedimentam de forma difusa^[5, 41].

A reação de hemaglutinação pode ser usada para detecção ou identificação preliminar de vírus ou bactérias isolados a fim de determinar os tipos (espécies animais) de eritrócitos aglutináveis. Serve também para a determinação da última diluição hemaglutinante para o agente.

Vantagens e desvantagens

As principais vantagens da técnica são a rapidez e a simplicidade, permitindo sua aplicação a um grande número de amostras ao mesmo tempo. Entretanto, é considerada um pouco sensível quando comparada com ensaios imunenzimáticos ou de fluorescência. A sensibilidade e a especificidade do teste são relativamente baixas, e o mau armazenamento de reagentes (ex.: eritrócitos) pode levar a resultados falso-negativos.

12.9 Microaglutinação

A mesma metodologia empregada na soroaglutinação lenta em tubos pode ser realizada em microplacas de plástico com poços de aproximadamente 350µl e formatos arredondados (em forma de U) ou cônicos (em forma de V). Assim, o teste é denominado **microaglutinação** sem uso de hemácias, ou **micro-hemaglutinação** quando utilizar hemácias como partícula carreadora de antígeno.

A prova de microaglutinação microscópica, realizada a partir de抗ígenos vivos, é padrão ouro para detecção e quantificação de anticorpos contra espiroquetas como *Leptospira* spp.^[14] e vem sendo testada para *Brachyspira* spp.^[6] Nesses casos, o resultado é visualizado em microscopia de campo escuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B. et al. DNA e cromossomos. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed., Artmed. Porto Alegre, 2004, p. 191-232.
2. ALVES, P.M.M. et al. Introdução à Tecnologia de Cultivo de Células Animais. In: **Tecnologias do Cultivo de Células Animais: de biofármacos a terapia gênica**. Editores: Ângela Maria Moraes, Elisabeth F. Pires Augusto, Leda R. Castilho. São Paulo: Roca, 2007, p. 2-14.
3. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - ATCC. Disponível em: <<http://www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas/tabid/169/Default.aspx>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

4. ANDERSEN, A.A.; VANROMPANY, D. AVIAN CHLAMYDIOSIS. In: Y.M. Saif et al. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 21, p. 863-879.
5. AWAD, M.M. et al. Pilus Production, Hemagglutination, and Adhesion by Porcine Strains of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lacking K88, K99, and 987P Antigens. **Infection and Immunity**, USA, v. 35, n. 1, p. 305-313, jan. 1982.
6. BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; RAZIA, L.E. Avaliação do método de microaglutinação para detecção de anticorpos contra *Brachyspira pilosicoli*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 2, p. 101-105, 2002.
7. BARKER, K. **Na Bancada - Manual de Iniciação Científica em Laboratórios**. 1. ed., Porto Alegre, RS: Artmed, 2002. 474p.
8. BEESLEY, J. E. **Immunocytochemistry. A practical approach**. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press. 1993, 102p.
9. BENFIELD, D. A. et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In: Straw, B.E. et al. (Ed.) **Diseases of Swine** 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, p. 201-232.
10. BIER, O. Virologia Médica. In: **Microbiologia e Imunologia**, 24. ed., São Paulo, Melhoramentos, 1985, p. 777-916.
11. BLACKALL, P.J.; Matsumoto, M. Infectious Coryza. In: Y.M. Saif et al. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 20, p. 691-703.
12. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Norma Técnica para Certificação Sanitária dos Estabelecimentos Avícolas Comerciais para Salmoneloses (*Salmonella Gallinarum*, *Salmoenella Pullorum*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*) e Micoplasmoses aviárias (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma melleagridis*)**. Brasília, DF: Mapa, Secretaria de Defesa Animal, 2010. 33p.
13. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCBET**. Brasília, DF: Mapa, Secretaria de Defesa Animal, 2006. 188p.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
15. BRICKER, J.M.; SAIF, Y.M. Other Bacterial Disease: Erysipelas. In: Y.M. Saif et al. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 24, p. 812-8.
16. BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. DETECÇÃO, Identificação e Quantificação Viral. In.: FLORES, E.F., **Virologia veterinária**. 1. ed., Santa Maria, Editora da UFSM, p. 59-86, 2007.
17. CARMICHAEL, L.E. *Brucella canis*. KLAUSS, N.; ROBERT, D.J. In: **Animal Brucellosis**. Boca Ratton, CRC Press. 1990. p. 335-350.
18. CARMICHAEL, L.E.; SHIN, S.J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 161-5, 1996.
19. CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine Brucellosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia – USA: WB Saunders Co., 1990. p. 573-584.
20. CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. **Cornell Veterinary**, v. 78, p. 63-73, 1988.
21. CHU, R.M. et al. Applications of peroxidase-antiperoxidase staining technique for detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs. **Am J Vet Res.** v. 43, p. 77-81, 1982.
22. CLAVIJO, A. et al. Isolation and identification of bluetongue virus. **Journal of Virological Methods**, v. 87, p. 13-23, 2000.
23. COSTA, U.M.; REISCHAK, D.; SILVA, J.; RAVAZZOLO, A.P. Establishment and partial characterization of an ovine synovial membrane cell line obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen. **Journal of Virological Methods**. v. 128, p. 72-78, 2005.

24. CROWTHER, J.R. **The ELISA Guidebook**. v. 149 Totowa: Humana Press. 2001. 421p.
25. CUNNINGHAM, C.H. Cultivo de Virus y Rickettsias. In: **Virología Práctica**. 6. ed., Espanha, Editorial Acribia, Zaragoza, 1971, p. 41-119.
26. DAVIES, G. The Rose Bengal test. **Veterinary Record**, v. 88, n. 17, p. 447-479, 1971.
27. DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN.H.N.; GINSBERG, H.. Antibody-antigen reaction. In: _____. **Microbiology, including immunology and molecular genetics**, 3rd ed. Philadelphia - USA: Harper & Row Publishers, 1980. p. 298-336.
28. DERBYSHIRE, J.B. ENTEROVIRUS. In: STRAW, B.E. et al. (Ed.) **Diseases of Swine** 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, p. 145-150.
29. EASTERDAY, B.C.; REETH, K.V. Swine Influenza. In: STRAW, B.E. et al. (Ed.). **Diseases of Swine**. 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 22, p. 277-290.
30. FLORES, E.F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: _____. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM. 2007. Cap. 11, p. 318-31.
31. FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 20th ed. Mosby: St Louis, Missouri - USA, 1998. 1074p.
32. FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. p. 433-488.
33. FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique**. 2nd ed. New York, Alan R. Liss, Inc. 1987.
34. GEORGE, L.W.; DUNCAN, J.R.; CARMICHAEL, L.E. Semen examination in dogs with canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 40, n. 11, p. 1589-95, 1979
35. GINOCCHIO, C.C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. **Journal of Clinical Virology**. v. 40, suppl. 1, p. 11-14, 2007
36. GREVE, I.C.; ZERBINATI, J.; FRANCO LEAL, R.; VASCONCELOS DE AMORIM, L.M.P.; LIMA DA SILVA, D.; DEUS OLIVEIRA, E.M.; CARMINATI, R.; BAHIA CERQUEIRA, R. Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 3, p. 255-263, 2007.
37. GUIMARÃES FERRI, R.; GARCIA CALICH, V.L.; COPPI VAZ, C.A. **Imunologia**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., Universidade de São Paulo, 1977. 317p
38. GUY, J.S. AND BAGUST, T.J. LARYNGOTRACHEITIS. In: SAIF Y.M. et al. (Ed.) **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, p. 121-134.
39. HAINES, D.M; CHELACK, B.J. Technical considerations for developing enzyme immuno-histochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. **J Vet Diagn Invest**. v. 3, p. 101-112, 1991.
40. HEALTH PROTECTION AGENCY. Complement fixation tests. **National standard method VSOP**. v. 18, n. 3, 2009, 23p.
41. HIERHOLZER, J.C.; SUGGS, M.T.; HALL, E.C. Standardized Viral Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 824-833, 1969.
42. HIRASAW, T., TSUJIMURA, N. AND KONISHI, S. Multiplicacition of Canine Parvovirus in CRFK Cells. Disponível em: <<http://rms1.agsearch.agropedia.affrc.go.jp/contents/JASI/pdf/society/31-0355.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2010.
43. HOLGATE, C.S. et al. Surface membrane staining of immunoglobulins in paraffin sections of non-Hodgkin's lymphoma using immunogold-silver staining technique. **J Clin Pathol**. v. 36, p. 742-746, 1983.
44. JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **Compendium of Continuing Education**, v. 14, n. 6, p. 763-72, 1992.

45. JOO, H.S. Encephalomyocarditis Virus. In: STRAW, B.E. et al. (Ed.). **Diseases of Swine**. 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 11, p. 139-144.
46. KENNEDY, M. Methodology in diagnostic virology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**. v. 8, p. 7-26, 2005.
47. KURSTAK, E. **Enzyme Immunodiagnosis**. Montreal: Academic Press. 1986. 235p.
48. KWON, H.J. et al. In vitro inhibitory activity influenza virus infection and hemagglutination. **Virology Journal**. v. 7, n. 307, 2010,
49. LARPENT, J.P.; LARPENT-GOUGARD; tradução: Maria Cristina de Mello Amorozo. **Microbiologia Prática**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., Universidade de São Paulo, 1975. 162p.
50. LÉO, P. et al. Células Animais: conceitos básicos. In: **Tecnologias do Cultivo de Células Animais: de biofármacos a terapia gênica**. Editores: Ângela Maria Moraes, Elisabeth F. Pires Augusto, Leda R. Castilho. São Paulo, Roca, 2007, p. 15-41.
51. LUKERT, P.D. AND SAIF, Y.M. Infectious Bursal Disease. In: Y.M. Saif et al. (Ed.) **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, p. 161-179.
52. LURIA, S.E. et al. **General Virology**. 3 ed, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1977.
53. MACMILLAN, A.P.; GREISSEMER-WILKE, I.; MOENINNIG, V.; MATHIAS, L.A. A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. **Deustch Tierärztliche Wochenschrift**, v. 97, p. 83-85, 1990.
54. MADELEY, C.R.; PEIRIS, J.S.M. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. **Journal of Clinical Virology**. v. 25, p. 121-134, 2002.
55. MCFERRAN, J.B. AND ADAIR, B. MCC. Group I Adenovirus Infectious. In: Y.M. Saif et al. (Ed.) **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 8, p. 214-227.
56. MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptopetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, 2000.
57. MIX, E. ET AL. Immunoglobulins – Basic Considerations. **Journal of Neurology**. n. 253, supl. 5, p. 9-17, 2006.
58. MONIS, P.T., GIGLIO, S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 6, p. 2-12, 2006.
59. MORÉS, N.; ZANELLA, J.R.C. **Programa de erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. 50p. (Embrapa Suínos e Aves. Documentos, 81).
60. MURPHY, F.A. et al. Laboratory Diagnosis of Viral Diseases. In: _____. **Veterinary Virology**. 3 ed. California: Academic Press, 1999.
61. NEVES GUIMARÃES, P.L.S.; TRONCOSO CHAVES, N.S.; FRANCO DA SILVA, L.A.; SANTOS ACYPRESTE, C. Freqüência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em bovinos, em regime de criação semi-extensivo. **Ciência Animal Brasileira**, n. 2, p. 35-40, 2001.
62. NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSNGILL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, p. 321-329, 1998.
63. NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLLETI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 25-30, 2004.

64. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.13. Rabies. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.13_RABIES.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2010.
65. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.2. Aujeszky's Disease. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.02_AUJESZKIS_DIS.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2010.
66. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.20. West Nile Fever. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.20_WEST_NILE.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2010.
67. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.3.2. Avian Infectious Bronchitis. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.02_AIB.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2010.
68. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.1.3. Bluetongue and Epizootic Haemorrhagic Disease. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.03_BLUETONGUE.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2010.
69. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Chapter 2.1.19. Vesicular Stomatitis. 2009.
70. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.5.5. Equine Encephalomyelitis (Eastern and Western). Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.05_EQUINE_ENCEPH.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
71. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.5.7. Equine Influenza. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.05_EQ_INF.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
72. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.5.14. Venezuelan Equine Encephalomyelitis. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.14_VEE.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
73. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.8.8. Swine Influenza. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.08.08_SWINEINFLUENZA.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
74. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. Chapter 2.4.14. Lumpy Skin Disease. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.14_LSD.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
75. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. Chapter 2.7.14. Sheep Pox and Goat Pox. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.14_LSD.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
76. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.1.3. Bluetongue and Epizootic Haemorrhagic Disease. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.03_BLUETONGUE.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
77. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Chapter 2.1.19. Vesicular Stomatitis. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.19_VESICULAR_STOMITIS.pdf>. Acesso em: fev. 2010.

78. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.5.5. Equine Encephalomyelitis (Eastern and Western). Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.05_EQUINE_ENCEPH.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
79. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.5.7. Equine Influenza. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.05_EQ_INF.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
80. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.5.14. Venezuelan Equine Encephalomyelitis. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.14_VEE.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
81. OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Updated: 14.08.2009. Chapter 2.8.8. Swine Influenza. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.08.08_SWINE_INFLUENZA.pdf>. Acesso em: fev. 2010.
82. OLIVEIRA, M.C.S. ET AL. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração, e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 2007. p. 16-19.
83. PAREDES, J.C.M.; OLIVEIRA, E.A.S.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A.; ROEHE, P.M. Soroneutralização como teste sorológico diferencial entre infecções pelo vírus da peste suína clássica e outros pestivírus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 403-408, 1999.
84. PASSAGLIA, L.M.P., ZAHA. A., Técnicas de Biologia Molecular. In: Zaha, A. et al., **Bio-
logia Molecular Básica**. 3. ed., Mercado Aberto, Porto Alegre, 2003, p. 379-413.
85. PAUL, P.S.; STEVENSON, G.W. Rotavirus and Reovirus. In: Straw, B.E. et al. (Ed.) **Dise-
ases of Swine** 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 21, p. 255-267.
86. POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S. **Introduction to Immunocytochemistry**. 2nd edition. New York: Springer Verlag. 1997.133p.
87. RAMOS, V.J.A. et al. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. **Swine Health Prod.** v. 7, n. 2, p. 85-91, 1999.
88. REISCHAK, D. et al. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22, n. 1, p. 07-12, 2002.
89. SAIF, L.J.; WESLEY, R.D. Transmissible Gastroenteritis and Porcine Respiratory Coronavirus. In: Straw, B.E. et al. (Ed.) **Diseases of Swine** 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 24, p. 295-325.
90. SARAIVA, P. J. Reações Antígeno-Anticorpo *in vitro*. In.: Fisher, G.B. & Scroferneker, M.L., **Imunologia Básica e Aplicada**. 2. ed. São Paulo, Segmento Farma Editores LTDA, p. 157-178, 2007.
91. SCHAT, A. K. AND SELLERS, H.S. Cell-Culture Methods. In: **A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens**. 5th ed., The American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia, 2008, p. 195-203.
92. SCHAT, K.A. Circovirus Infectious: Chicken Infectious Anemia. In: Y.M. Saif et al. (Ed.) **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 7, p. 182-201.
93. SCHRANK, A. Estrutura dos ácidos nucléicos. In: Zaha, A. et al., **Biologia Molecular Básica**. 3. ed., Mercado Aberto, Porto Alegre, 2003, p. 36-58.

94. SENNE, D.A. Virus Propagation in Embryonating Eggs. In: **A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens**. 5th ed., The American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia, 2008, p. 204-208.
95. SOSNOVTSEV, S.V. et al. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. **Virus Research**, v. 94, issue 1, p. 1-10, July 2003.
96. STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E.A.; tradução: Elfried Kirchner. **Mundo dos micróbios**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1969. 741p.
97. STEPHANO, A.H. Blue Eye Disease. In: Straw, B.E. et al. (Ed.) **Diseases of Swine** 8th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 6, p. 103-112.
98. TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; COTE, R.J. Antigen retrieval for immunohistochemistry: Status and need for greater standardization. **Appl Immunohistochem**. v. 4, p. 144-166, 1996.
99. TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; RO-EHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61-65, 1998.
100. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.; tradução: Agnes Kielsing Casali...[et al.]. Aplicações práticas da imunologia. In: _____. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p. 485-503.
101. TRIPATHY, D.N. AND REED, W.M. POX. In: Y.M. SAIF et al. (Ed.) **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 9, p. 253-269.
102. WEIBLEN, R., KREUTZ, L.C., CANABARRO, T.F., SCHUCH, L.F., REBELATTO, M.C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, College Station, v. 4, n. 3, p. 341-343, 1992.
103. WERNER, M.; VON, W.R; KOMMINOTH, P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. **Histochem Cell Biol**. v. 105, p. 253-260, 1996.
103. WHITE, A.K et al. Enhanced immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues following heat-mediated antigen retrieval. **J Vet Diagn Invest**. v. 10, p. 214–217, 1998.
104. WITTER R.L. AND SCHAT K.A. Neoplastic Diseases: Marek's Disease. In: Y.M. Saif et al. (Ed.) **Diseases of poultry**. 11th ed., Ames, Iowa, Iowa State Press, 2003, chapter 15, p. 407-465.
105. WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs**. Boston: Kluwer Academic, 1989. 345p.
106. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis**. Geneva: World Health Organization, p. 58-66 (Technical Report Service, 740), 1986.
107. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5th ed., Paris: OIE, 2009.
108. YANG, S. ROTHMAN, R. E. Pcr-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 4, p. 337-348, 2004.

CAPÍTULO 3

AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS

Álvaro Menin

Carolina Reck

O diagnóstico animal aplicado é fundamental para a manutenção da saúde animal e demonstra interesse, conhecimento, experiência e mérito profissional. O médico-veterinário, muitas vezes, encontra dificuldades para formular um diagnóstico preciso baseando-se somente no histórico e nos sinais clínicos observados, uma vez que esses nem sempre são característicos de uma única doença; podem ser superagudos ou assintomáticos. Além disso, o diagnóstico preciso serve como base para procedimentos clínico-terapêuticos, profilaxia, preservação e controle da saúde animal, coletiva ou individual e, no caso da produção e industrialização de produtos de origem animal, mantém a qualidade e a segurança do alimento que chega à mesa do consumidor. Dessa forma, é necessário recorrer a um laboratório especializado.

No campo do diagnóstico animal, tanto na clínica de pequenos animais quanto na clínica de grandes animais, muitas ferramentas estão disponíveis para ser aplicadas nas rotinas diagnósticas. Entretanto, o médico-veterinário, ao optar pelo uso de exames laboratoriais para concluir um diagnóstico, pode encontrar limitantes como a distância do laboratório, que poderia restringir a qualidade da amostra e, em alguns casos, aumentar a demora em ter acesso aos laudos.

A representatividade dos resultados depende da seleção correta da amostra, tanto na quantidade quanto na qualidade, do método de coleta, das condições de armazenagem, do envio ao laboratório e da escolha da metodologia analítica a ser aplicada.

Amostras não representativas, mal coletadas/conservadas limitam a significância dos resultados mesmo que os procedimentos analíticos realizados no laboratório sejam perfeitamente empregados. Portanto, em qualquer um desses casos, não se deve ter expectativas da obtenção de resultados, visto que eles têm valor diagnóstico limitado (além do desperdício de tempo e dinheiro).

1. CRITÉRIOS PARA COLETA, SELEÇÃO E AMOSTRAGEM INDIVIDUAL OU POPULACIONAL

A análise de um animal individual ou de um número representativo da população tem por objetivo tornar a(s) amostra(s) coletada(s) representativa(s) do problema que queremos estudar. Da mesma maneira, o tipo da amostra e amostragem a ser selecionada mudará em função do objetivo da investigação e do tipo de método analítico que será praticado no laboratório.

2. COLETA INDIVIDUAL

No caso da clínica de animais de companhia, onde se trabalha com o indivíduo e não com o grupo ou a população, tanto a coleta de amostras clínicas como o número dessas amostras devem ser amparados pela suspeita clínica do médico-veterinário responsável. Esse critério é mais facilmente determinado quando existe um quadro clínico bem definido e se trata de casos crônicos, nos quais se busca uma confirmação do diagnóstico clínico e, na maioria das vezes, um espécime (amostra clínica) de um mesmo animal para um exame analítico específico se torna suficiente. Entretanto, nos casos em que não há um quadro clínico completamente caracterizado, ou quando se trata de síndromes complexas, é necessário coletar espécimes (amostras) variados de um mesmo animal devido à necessidade de utilização de várias técnicas analíticas para garantir o diagnóstico definitivo^[8].

3. AMOSTRAGEM E COLETA POPULACIONAL

No caso de rebanhos o enfoque é populacional, selecionar indivíduos que apresentam sinais clínicos evidentes e que esses representem inclusive a fase em que a doença ocorre. Observar a amostragem mínima de animais para que ela seja representativa do rebanho ou da população, dependendo da necessidade.

Para determinar o número de amostras a ser remetidas ao laboratório, devem-se observar as características da doença e da prova que será realizada. De modo geral, a amostragem populacional é utilizada para detectar uma doença específica ou determinar sua prevalência (para programas de biossegurança, campanhas oficiais ou planos de erradicação). Devemos determinar a menor amostra possível que nos permita detectar um animal doente, se ele existir, na população. Ou seja, uma amostragem mínima que garanta com determinado nível de confiança ($p \leq 0,1$ a $p \leq 0,05$) que a população está livre da doença, caso todos os animais demonstrem resultado negativo no diagnóstico^[6,8,9].

3.1 Tamanho da amostra para detectar uma doença específica na população (rebanho ou região)^[6,2]

$$n = \{1 - (1-a)^{1/p}\} * \{N - (P-1)/2\}$$

em que:

n = tamanho da amostra que devemos coletar;

N = tamanho da população estudada (granja ou região);

P = probabilidade de se encontrar pelo menos 1 animal infectado;

a = intervalo de confiança (usar entre 90% e 95% ($p \leq 0,1$ a $p \leq 0,05$), sendo 95% ($p \leq 0,05$) mais recomendado).

3.2 Tamanho da amostra para determinar a prevalência de uma doença específica em uma população infinita^[2,6,9]

$$n = (z^2 * Pe * q) / p^2 \text{ ou } n = (z^2 * Pe * (1-Pe)) / p^2$$

em que:

n = tamanho da amostra que devemos coletar;

Pe = prevalência estimada da doença (dados bibliográficos) (quando não se conhece, considerar 50%);

q = porcentagem esperada de animais sadios: q = (1-p);

p = grau de erro, para intervalo de confiança de 95% (p = 0,05), e para intervalo de confiança de 90% (p = 0,1);

z = para intervalo de confiança de 95% (z = 1,96), e para 99% de confiança (z = 2,56).

3.3. Tamanho da amostra para determinar a prevalência de uma doença específica em uma população finita^[2,4,6,7,8]

Neste caso o n deve ser ajustado pela seguinte fórmula:

$$n_{aj} = (N * n) / (N+n)$$

em que:

n_{aj} = tamanho da amostra ajustado;

N = tamanho da população total;

n = tamanho inicial da amostra.

Também existem tabelas estatísticas de amostragem, que fornecem o valor de n levando em consideração uma prevalência estimada e o intervalo de confiança desejado (em geral de 95% a 99%) (Tabela 1). É importante considerar que a prevalência estimada representa a porcentagem esperada de animais positivos dentro de uma população contaminada. Caso o clínico desconheça essa informação, ele pode buscar como referência um dado da literatura.

4. SELEÇÃO ALEATÓRIA DAS AMOSTRAS ATRAVÉS DE MÉTODOS PROBABILÍSTICOS

4.1 Aleatória simples: a partir de uma listagem numérica de animais, aplicar tabelas ou métodos informatizados para obtenção de números aleatórios^[5,9].

4.2 Aleatória sistematizada: a partir de uma listagem numérica de animais, selecionar um primeiro animal aleatório, e os restantes selecionar em intervalos regulares (exemplo: um animal a cada 50)^[6].

4.3 Aleatória por agrupamento: a população é dividida em estratos conforme determinadas características (faixa etária, estado fisiológico) e procede-se a uma coleta em cada grupo^[2,9].

4.4 Aleatória por conjuntos: considerando a população um conjunto formado por subconjuntos (conjunto: uma granja; subconjuntos: as baías), selecionar aleatoriamente alguns subconjuntos e estudar os animais nele contidos^[6].

4.5 Aleatória mista: combinar vários métodos de seleção aleatória probabilística num mesmo plano de ação^[7,8].

Tabela 1. Tamanho da amostra, considerando a taxa de prevalência estimada da enfermidade e os graus de confiança.

		Tabela de amostragem de animais considerando a taxa de prevalência da doença estudada, nível de confiança e número de animais do plantel ou rebanho																	
Plantel ou rebanho		Taxa de prevalência da doença estudada																	
		1			5			10			25			50			75		
		90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99	90	95	99
10		10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	7	8	3	4	5	2	3	4
20		20	20	20	19	20	20	14	16	18	7	9	11	4	5	6	2	3	4
30		30	30	30	24	26	29	16	19	23	8	9	13	4	5	7	2	3	4
40		40	40	40	28	31	36	17	21	27	8	10	14	4	5	7	2	3	4
50		50	50	50	30	35	42	18	22	29	8	10	14	4	5	7	2	3	4
60		59	60	60	32	38	47	19	23	31	8	10	15	4	5	7	2	3	4
70		68	70	70	34	40	51	19	24	33	8	10	15	4	5	7	2	3	4
80		76	79	80	35	42	54	20	24	34	8	10	15	4	5	7	2	3	4
90		84	87	90	36	43	57	20	25	35	8	10	15	4	5	7	2	3	4
100		91	96	100	37	45	59	20	25	36	8	10	15	4	5	7	2	3	4
150		118	130	143	39	49	68	21	26	38	8	11	16	4	5	7	2	3	4
200		137	155	180	41	51	73	21	27	40	8	11	16	4	5	7	2	3	4
250		151	175	210	42	53	76	21	27	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
300		161	189	235	42	54	78	22	28	41	8	11	16	4	5	7	2	3	4
400		175	211	273	43	55	81	22	28	42	8	11	16	4	5	7	2	3	4
700		196	243	336	44	57	85	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
1.000		205	258	368	44	57	86	22	28	43	9	11	16	4	5	7	2	3	4
Infinito		229	298	458	45	59	90	22	28	44	9	11	16	4	5	7	2	3	4

5. CRITÉRIOS PARA A COLETA REPRESENTATIVA DA(S) AMOSTRA(S)

Alguns critérios que são comuns a todas as variáveis de coleta de espécimes para exames laboratoriais são: o material deve ser coletado de animais vivos ou recentemente mortos / “eutanasiados” (máximo 2 a 4 horas); ser baseado nas conclusões clínicas para que seja realmente representativo da doença; as amostras devem ser coletadas com boas condições de assepsia e logo após o aparecimento dos sinais clínicos; no caso de isolamento microbiológico, evitar coletar materiais de animais que tenham sido recentemente medicados com antimicrobianos; coletar amostras de tecido contemplando tecido macroscopicamente normal e lesionado (bordas das lesões); salvo exceções (fetos ou animais de pequeno porte), evitar o envio de animais inteiros sob refrigeração, principalmente quando passar muito tempo em transporte, pois as porções internas do animal tendem a demorar para resfriar e, portanto, sofrem alterações cadavéricas com facilidade.

Sempre que for necessário, contatar o serviço de apoio laboratorial para orientar sobre todos os procedimentos de coleta, amostragem e envio de amostras. Essa é a melhor forma de garantir que as amostras atendam adequadamente todas as necessidades do processamento labora-

torial. É importante, também, manter sempre um canal de comunicação aberto com o laboratório, criando uma relação de confiança e cooperação.

6. CRITÉRIOS PARA A REMESSA DA(S) AMOSTRA(S)

Remeter o material ao laboratório imediatamente após a coleta (de modo geral as amostras não devem ultrapassar o período de 24 a 48 horas até iniciar o processamento laboratorial, dando preferência à via mais rápida); identificar individual e adequadamente todas as amostras (usar sacos plásticos ou frascos identificados, constando tipo de material, animal, se suave ou esfregaço, e o local da coleta; acondicionar adequadamente as amostras (a embalagem deve garantir a manutenção das condições de conservação da amostra); etiquetar adequadamente a embalagem (a etiquetagem deve ser na parte superior ou lateral, dependendo da transportadora, com informações referentes ao nome, endereço e telefone do laboratório de destino e do remetente, e no envelope do conhecimento aéreo ou terrestre, colocar uma ficha com a descrição do conteúdo da caixa ou a ficha epidemiológica); fixar firmemente na lateral do compartimento de envio (caixa de isopor) uma ficha num saco plástico com as informações pertinentes à amostra (histórico epidemiológico, anamnese, descrição das observações da necropsia, dados acerca do animal, exames requeridos e dados de identificação para remessa dos resultados, contatos e cobrança); despachar o material pela via de transporte mais rápida disponível (empresas de transporte rodoviário, empresas aéreas e correios); após o despacho, comunicar ao laboratório (informar o nome da empresa transportadora, horário de saída, horário previsto de chegada, e número do protocolo fiscal de envio)

É importante observar que durante o armazenamento e transporte, o material coletado deve ser embalado com segurança, impedindo de maneira absoluta os vazamentos, a entrada de substâncias e o contato dele com superfícies inadequadas. No caso de acidentes com amostras envolvendo riscos à saúde, os responsáveis poderão ser processados judicialmente com base na falha dos procedimentos de transporte das amostras.

7. CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DO TESTE DIAGNÓSTICO MAIS EFICIENTE

Ao optar pelo exame laboratorial para confirmar um diagnóstico, muitas vezes surgem dúvidas sobre qual o melhor teste diagnóstico a ser solicitado. A qualidade de uma técnica se determina através de uma série de propriedades estabelecidas em comparações com outras técnicas ou testes chamadas “prova de referência”, ou *gold standard*, ou validadas através da repetibilidade sob condições ditas padrão (cepas ou抗ígenos padronizados)^[1,3,10].

O estudo de um teste analítico laboratorial (prova ou exame laboratorial) gera as seguintes variáveis:

		Prova de referência		Total
		Positivos	Negativos	
Prova testada	Positivos	a (verdadeiros positivos)	b (falsos positivos)	a + b
	Negativos	c (falsos negativos)	d (verdadeiros negativos)	c + d
		a + c	b + d	a + b + c + d

As propriedades que definem uma ferramenta analítica laboratorial (técnica de diagnóstico) a partir do número de amostras ou de amostragem realizada como sendo eficiente incluem:

7.1 Segurança do teste Diagnóstico

Expressa a confiança da prova, determinada pela proporção de resultados corretos, tanto positivos quanto negativos, caracteriza a probabilidade de o resultado estar correto. A estimativa da segurança (S_{eg}) é dada por $\{S_{eg} = (a + d) / (a + b + c + d)\}^{[1,8]}$.

7.2 Sensibilidade do teste Diagnóstico

É a probabilidade de um teste não gerar um resultado falso-negativo. Ou seja, é a probabilidade de que o teste identifique corretamente as amostras positivas (taxa de verdadeiros positivos). Uma amostra positiva revela resultado positivo quando processada e não um falso-negativo. A estimativa da sensibilidade (S) é dada por $\{S = a / (a + c)\}$. Já a taxa de falso-negativo (T_{fn}) pode ser calculada por $T_{fn} = (1 - S)^{[8,10]}$.

A aplicação de um teste altamente sensível é importante quando se deseja eliminar uma doença de um plantel ou impedir a sua entrada.

7.3 Especificidade do teste Diagnóstico

É a probabilidade de um teste não gerar um resultado falso-positivo. Ou seja, é a probabilidade de que o teste identifique corretamente as amostras negativas (taxa de verdadeiros negativos). Isto é, uma amostra negativa revela resultado negativo quando processada e não um falso-positivo. A estimativa da especificidade (E) é dada por $\{E = d / (b + d)\}$. Já a taxa de verdadeiro-negativo (T_{vn}) pode ser calculada por $T_{vn} = (1 - E)^{[1,8,9]}$.

A adoção de um teste altamente específico torna-se relevante quando o resultado envolve um primeiro diagnóstico de doença até então considerada ausente num determinado rebanho ou região ou em circunstância que envolve o sacrifício de animais valiosos ou a decisão sobre adoção de medidas de controle para doenças que demandem alto investimento^[5,10].

É importante estar consciente que um teste 100% sensível não resultaria em falso-negativo, e um teste 100% específico não apresentaria falso-positivo. Entretanto, não existem testes 100% sensíveis nem 100% específicos. Em geral, à medida que aumentamos a sensibilidade, diminuímos a especificidade, e vice-versa.

7.4 Repetibilidade do teste Diagnóstico

Indica o grau em que a prova oferece os mesmos resultados com as mesmas amostras. Quanto maior a repetibilidade do teste, maior a confiabilidade^[1,3].

7.5 Valor preditivo do resultado positivo (VPP)

É a probabilidade de uma amostra realmente positiva dar um resultado positivo no teste. É determinado pelos verdadeiros positivos, ou seja, a proporção de amostras verdadeiras positivas que, pelos resultados da técnica utilizada, realmente dão positivo. A estimativa do VPP é dada por $\{VPP = a / (a + b)\}^{[8,10]}$.

7.6 Valor preditivo do resultado negativo (VPN)

É a probabilidade de uma amostra realmente negativa dar um resultado negativo no teste. É determinado pelos verdadeiros negativos, ou seja, a proporção de amostras verdadeiras negativas que, pelos resultados da técnica utilizada, realmente dão negativo. A estimativa do VPN é dada por $\{VPN = d / (c + d)\}^{[1,10]}$.

Os valores preditivos não são inerentes à propriedade das técnicas, mas relativos à flutuação da prevalência da infecção na população estudada. À medida que diminui a prevalência, diminui o VPP, ou seja, aumentam os resultados falso-positivos. À medida que aumenta a prevalência, diminui o VPN ou aumentam os resultados falso-negativos.

7.7 Disponibilidade do teste Diagnóstico

À medida que são solicitados os testes ou exames laboratoriais, é importante que o médico-veterinário se certifique previamente da disponibilidade dos testes por parte do laboratório para que não se criem expectativas e não haja perda de tempo. Nesse caso, deve-se optar pelo diagnóstico realizado pelos métodos disponibilizados pelo laboratório.

7.8 Tempo para obtenção dos resultados

O tempo decorrido entre a coleta do material e a disponibilização do laudo (resultados) é um fator primordial sempre, indiferentemente da situação, e deve ser um fator limitante para a escolha do seu laboratório de confiança. Esse critério se torna mais importante e imprescindível ainda em situações como enfermidades agudas e superagudas, controle de surtos, suspeita de enfermidades infectocontagiosas, enfermidades de controle oficial, zoonoses, enfermidades que têm característica de alta morbidade e mortalidade, necessidades de intervenções cirúrgicas, animais que representam alto valor sentimental, entre outras justificativas que tornam esse fator altamente relevante.

Ao se estimar o tempo que vai ser gasto entre a coleta e a obtenção dos resultados, deve-se prever: (I) tempo de transporte das amostras até o laboratório, que também está associado à qualidade da amostras a ser processada, principalmente a viabilidade para cultivos bacteriológicos; (II) tempo necessário para entrar na rotina do laboratório; (III) carga horária semanal de trabalho do laboratório; (IV) tempo gasto na execução da prova, que deve ser solicitado ao laboratório (de maneira geral, essa informação é disponibilizada pelos mesmos); e (V) tempo entre envio do resultado e seu recebimento.

LITERATURA CITADA

1. BAYSINGER, A. Use of descriptive statistics in the interpretation of population serology. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 30, 1999, Ames, EUA. **Proceedings...** Ames, EUA, 1999, p. 345-355.
2. DAWSON, B.; TRAPP, R.G. **Basic and clinical biostatistics**. 3. ed. New York: Lange Medical Books, 2001, 399p.
3. FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; VAGNER, E.H. **Clinical epidemiology**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996, 276p.

4. HULLEY, S.B. et al. **Designing clinical research: an epidemiologic approach.** 3. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001, 336p.
5. NOORDHUIZEN, J.P.T.M. et al. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology.** 2ed. Netherlands: Wageningen Press, 2001, 430p.
6. SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
7. SOBESTIANSKY, J. et al. **Suínos: coleta e remessa de material para laboratórios para fins de Diagnóstico.** Goiânia, 2005, 122p.
8. THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology.** 2. ed. EUA: Blackwell, 1995, 521p.
9. VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística.** 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1988.
10. ZEMAN, D.H. The “best” diagnostic test. **Swine Health and Production.** v. 5, n. 4, p. 159-160, 1997.

CAPÍTULO 4

NECROPSIA

Álvaro Menin

Carolina Reck

Celso Pilati

Débora Cristina Olsson

Josaine Cristina da Silva Rappeti

Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

Renata Dezengrini Slhessarenko

Vagner Miranda Portes

Epistemologicamente, o termo ‘necropsia’ é derivado dos radicais gregos *nekrós*, que significa ‘cadáver’, e *opsis* significa ‘vista’ ou ‘ver’. Pela definição, necropsia é um procedimento médico que consiste na abertura e inspeção sistemática e pormenorizada das cavidades, de órgãos de tecidos de um cadáver objetivando determinar a causa e o modo de morte, extensão ou natureza das lesões e avaliar qualquer doença ou ferimento que possa estar presente^[7,22].

Em todos os casos, quando se realiza uma necropsia se busca responder à pergunta: qual terá sido a causa da morte do animal? A necropsia pode ser considerada um conjunto de procedimentos, sistemáticos e hierarquizados, orientados para examinar um cadáver na busca de informações que possibilitem conhecer alterações que esclareçam ou predigam as causas de sua morte.

Obviamente, isso supõe atingir uma série de objetivos, como: i) avaliar a perícia e os procedimentos clínico-terapêuticos ou o meio de avaliação do desempenho clínico do profissional, pois a necropsia permite, em alguns casos, conhecer a eficiência do diagnóstico clínico; ii) conhecer a *causa mortis* de um animal, o que permite estabelecer medidas terapêuticas ou preventivas para o cenário coletivo. Igualmente, a necropsia pode ser uma medida útil de controle para avaliar as diferentes formas de profilaxia e tratamento; iii) entender a patogênese ou a patogenia das enfermidades, diagnosticar doenças superagudas e assintomáticas, orientar e avaliar procedimentos diagnósticos e interpretações clínico-terapêuticas e servir como base para a profilaxia, a preservação e o controle da saúde animal, coletiva ou individual; iv) realizar parecer judicial final em estudos jurídicos e de perícia; v) proporcionar uma série de dados macroscópicos que, no diagnóstico diferencial, orientam sobre a enfermidade da qual o animal padecia; vi) demonstrar interesse, téc-

nica e conhecimento profissional, visto que em alguns casos, esteticamente, o procedimento pode determinar envolvimento emocional^[18,28].

1. MATERIAL NECESSÁRIO PARA NECROPSIA

A recomendação de instrumentos a serem utilizados na prática da necropsia depende da espécie, do tamanho e da idade do animal em questão, bem como do local onde o procedimento será realizado, da suspeita clínica e da necessidade de coleta de material. O instrumental apropriado de necropsia propicia boas condições de trabalho. Entretanto, a falta deste não deve ser encarada como limitação para a não realização da necropsia, visto que de posse de uma simples faca o animal pode ser aberto e examinado.

Podemos citar como instrumentos básicos apropriados para necropsia^[17,22,23]: I) facas de esfolia, utilizadas para abertura do cadáver, desarticulação, corte de tecidos e inserções das vísceras; II) bisturi, utilizado principalmente em espécies ou animais pequenos para corte de tecidos moles e coleta de material; III) tesoura reta (ponta reto-romba ou romba-romba), utilizada para tecidos moles e abertura de órgãos ocos; IV) pinça atraumática e pinça dente de rato, instrumentos utilizados para manuseio de vísceras, tecidos e coleta de material; V) machadinha, para abertura do crânio, púbis e desarticulações, VI) serra de arco, para corte de ossos, abertura do crânio e corte transversal do focinho (suínos); VII) costótomo, tesoura para corte dos ossos das costelas em grandes e médios animais; VIII) chaira, para amolar as facas, IX) lupa, para visualizar alterações tênuas; X) régua de alumínio de 30 cm, para mensuração das lesões anatomo-patológicas (para confecção do laudo, principalmente no caso de Medicina Veterinária Legal); XI) tesoura de desossa ou destrincha, no caso de aves; XII) EPI (equipamento de proteção individual), sendo indicados para tal: macacão, botas de borracha, luvas de borracha, óculos protetores, máscara cirúrgica e gorro; XIII) insumos para coleta de material (barbante, sacos plásticos, frascos boca larga com fixador para tecidos, etc.). Sugerem-se ainda instrumentos e materiais acessórios: martelo, escopro, enterótomo, balança, sabão, desinfetante, toalhas de papel e escova para limpeza do instrumental.

É importante que, se se adotar um procedimento de eutanásia, prever a metodologia a ser empregada e seus referidos insumos.

2. INFORMAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DA NECROPSIA

Antes de proceder a uma necropsia, o profissional deve cercar-se do máximo de informações sobre as circunstâncias e ocorrências que antecederam a morte do(s) animal(is), principalmente nos casos de Medicina Legal, mas sem estabelecer um diagnóstico presuntivo, o que poderia causar tendenciosidades investigatórias. Quanto maiores e mais completas forem as informações disponíveis (identificação do(s) animal(is) e histórico clínico-terapêutico e epidemiológico), mais rapidamente e com maior segurança se poderá chegar a um diagnóstico efetivo^[5,26].

As informações básicas que devem ser registradas e estar de posse do profissional antes de se iniciar o procedimento de necropsia são: identificação do animal (espécie, raça, sexo, idade, estado físico, peso, circunstâncias que exigiram a necropsia, características intrínsecas que identificam o animal (brinco/pelagem) e hora provável da morte, principalmente nos casos de Medicina Veterinária Legal). Além disso, são necessárias as informações sobre a necropsia propriamente dita, como: data, hora e executor da necropsia. Para o estabelecimento de um diagnóstico final conclusivo, é importante que o profissional tenha disponíveis informações que o orientem, tais

como: dados da anamnese, histórico clínico do(s) animal(is) afetados (sinais clínicos e sua evolução), intervenções cirúrgicas, dados epidemiológicos (número de animais afetados, tendências quanto a idade, sexo, raça ou estado fisiológico, ocorrência de casos anteriores), tratamentos terapêuticos, programa de vacinação, e dados do ambiente que se inter-relacionam com o processo patológico sob ação investigativa.

Todas essas informações antes da necropsia orientam o médico-veterinário para a coleta e contemplação de amostras adequadas e para a eleição/requisição de exames específicos que vão auxiliar o diagnóstico conclusivo. Isso evita o dispêndio econômico e de tempo com amostras e exames desnecessários.

3. ALTERAÇÕES CADAVÉRICAS

A morte somática não acarreta a morte simultânea de todas as células e todos os tecidos de um indivíduo. Após a morte clínica do animal, células individuais ou tecidos podem permanecer vivos (células finalizam os processos de mitose) por um período de tempo variável, possibilizando, assim, procedimentos como o transplante de órgãos. Quanto mais diferenciado e especializado for um tecido, mais rapidamente se instalará o processo de autólise em razão da alta taxa metabólica e, por conseguinte, da maior necessidade de nutrientes e de oxigênio^[11,12].

A sequência do processo de degeneração e morte celular e as consequentes alterações cadavéricas implicadas que possibilitam a estimativa da hora da morte é denominada *cronotanatognose*. O termo é etimologicamente derivado dos radicais gregos *kronós*, tempo; *thanatos*, morte; e *gnosis*, conhecimento, ou seja, conhecimento do tempo/hora da morte. A estimativa da hora da morte é básica e fundamental em Medicina Legal^[8,17,20].

3.1 Classificação das alterações cadavéricas

As alterações cadavéricas podem ser classificadas didaticamente em: *alterações cadavéricas abióticas*, que não modificam o cadáver no seu aspecto geral e são divididas em imediatas (associadas à morte somática ou clínica) e mediatas, ou consecutivas (associadas à autólise), e *alterações cadavéricas transformativas*, aquelas que modificam o cadáver no seu aspecto geral dificultando o trabalho na análise dos achados macroscópicos (determinantes da decomposição, putrefação ou autólise). Nessas condições, só se deve proceder à necropsia se existir envolvimento judicial.

3.1.1 Alterações cadavéricas abióticas imediatas

Essas alterações são determinantes da morte somática ou clínica. Podem ser divididas em: insensibilidade; imobilidade; parada das funções cardiorrespiratórias; inconsciência e arreflexia, que é a ausência de reflexos^[7,17].

3.1.2 Alterações cadavéricas abióticas mediatas

As alterações abióticas *mediatas* são correspondentes ao processo de autólise. A autólise é a destruição de um tecido por enzimas proteolíticas produzidas pelo próprio tecido. Ela traz como consequências a perda de detalhes celulares e tintoriais, o que pode causar alguma confusão no seu diagnóstico diferencial com processos degenerativos. O citoplasma torna-se granuloso e

hialino e há perda dos limites celulares e da afinidade pelos corantes^[16,23]. A ausência de reação inflamatória e a ocorrência de hemólise intravascular diferenciam essas alterações das de necrose. Quanto mais diferenciado o tecido, mais rápida é a autólise.

3.1.3 Hipóstase cadavérica (Livor mortis; lividez cadavérica)

A hipóstase cadavérica manifesta-se por manchas violáceas (chamadas *lividices*) nos locais de declive, que desaparecem pela compressão digital. A manifestação ocorre pela parada da função cardíaca e consequente acúmulo de sangue nas regiões mais baixas por ação da gravidade. O aparecimento ocorre entre duas e quatro horas após a morte caso o animal não seja manipulado e permaneça na mesma posição^[7]. É importante diferenciar da congestão hipostática, que ocorre no animal vivo em processos diversos em virtude da desvitalização dos tecidos.

3.1.4 Frialdade cadavérica (Algor mortis)

A frialdade cadavérica caracteriza-se pelo resfriamento gradual do cadáver até alcançar a temperatura ambiente (ou mesmo mais baixa, devido à dissipação do calor por evaporação). O aparecimento se dá pela parada das funções vitais (inclusive da termorregulação), que permite que, com a evaporação e a dissipação do calor, ocorra o resfriamento gradual a fim de equilibrar-se com a temperatura ambiente. Em geral, torna-se perceptível três a quatro horas após a morte^[8,12,17]. Genericamente, para efeito de crontanatognose, considera-se a queda na temperatura corporal de 1°C por hora após a morte^[12].

3.1.5 Rigidez cadavérica (Rigor mortis)

A rigidez cadavérica caracteriza-se pela rigidez dos músculos, que também se reflete na pouca mobilidade das articulações. O aparecimento ocorre em torno de duas a quatro horas após a morte e perdura em por 12 a 24 horas, dependendo principalmente do estado de nutrição do animal e da *causa mortis*^[8,16]. O enrijecimento tende a se iniciar primeiramente pelos músculos involuntários, abrangendo posteriormente os voluntários, na seguinte sequência: coração (primeira hora após a morte), músculos respiratórios, mastigatórios, perioculares (promovendo a retração do globo ocular), músculos do pescoço, dos membros anteriores, do tronco e dos membros posteriores. Essa mesma sequência também é válida para o término da alteração. Também, é importante ressaltar que a musculatura lisa intestinal – principalmente a do jejunum –, ao entrar em *rigor mortis*, pode determinar até mesmo intussuscepções *post mortem*^[7,23,26]. O estabelecimento do *rigor mortis* se dá em três etapas^[7,11,17,20]:

a) *Etapa pré-rigor* - mesmo com a morte clínica do animal, o tecido muscular ainda persiste vivo por algum tempo devido ao glicogênio, ao ATP (trifosfato de adenosina) e à fosfocreatina residual. O nível de ATP (10µmol/g) é mantido por conversão do ADP a ATP (fosfocreatina + ADP \leftrightarrow creatina + ATP). Nessa fase o músculo apresenta um pH em torno de 6,9 a 7,2. Com hipoxemia e anoxia, não há oxigenação e o músculo inicia um processo de metabolismo anaeróbico; a fosfocreatina é exaurida, o ácido pirúvico não entra no ciclo de Krebs e cadeia citocrômica para formar ATP (que mantém a actina e a miosina separadas durante o relaxamento muscular), as reservas energéticas se esgotam, ocorre a conversão do ácido pirúvico em ácido láctico e a diminuição do pH.

b) *Etapa de rigor* - com o esgotamento das reservas energéticas (glicogênio, ATP e fosfocreatina residual), anoxia e acidificação resultante do metabolismo anaeróbico, as mitocôndrias

liberam cálcio para o sarcoplasma e ocorre diminuição da atividade da bomba de cálcio. Em consequência, a concentração de cálcio nas miofibrilas aumenta (10-8 moles/L para 10-6 moles/L) levando a uma forte união entre a actina e a miosina, que persiste até que sejam destruídas totalmente pelos fenômenos líticos (autólise e heterólise).

c) *Etapa pós-rigor* - com a degeneração da actina e da miosina por enzimas proteolíticas, ocorre o relaxamento dos músculos e das articulações.

3.1.6 Coagulação sanguínea pós-morte

A coagulação sanguínea pós-morte é a formação de uma massa sólida e estável composta por elementos sanguíneos que ocorre no interior do compartimento cardiovascular. Os coágulos pós-morte podem ser divididos em: cruóricos e lardaceos. Os coágulos cruóricos possuem coloração vermelha e a massa coagulada inclui todos os elementos do sangue na proporção em que estavam circulantes no sangue. Os coágulos lardáceos (*lardum, bacon*) são amarelados e constituídos basicamente por fibrina e ocorrem após a sedimentação dos elementos celulares (frequente nos casos de anemia/fase agônica no final da doença decorrente da diminuição na taxa de eritrócitos). Os coágulos pós-morte possuem aspecto liso e brilhante, consistência firme e elástica, não são aderentes às paredes cardiovasculares e não causam a oclusão total do lúmen vascular^[7,23].

Os coágulos tendem a se formar em um período de duas a oito horas após a morte do animal, dependendo da atividade enzimática. Após o período de coagulação, os coágulos começam a se desfazer pelo processo de hemólise. Nesse caso, deve-se diferenciar de algumas doenças que causam hemólise *ante mortem* (ex.: tristeza parasitária), em que a hemólise/anemia está presente antes da coagulação *post mortem*.

A coagulação pós-morte deve ser diferenciada da coagulação extravascular e da formação de trombos. A coagulação extravascular é um evento hemostático decorrente de uma lesão da parede vascular; já a formação de trombos é a solidificação dos constituintes normais do sangue dentro do sistema cardiovascular, principalmente em decorrência de lesões do endotélio^[8,16]. Os trombos são opacos, friáveis e tendem à oclusão do lúmen. Tanto a coagulação extravascular quanto a formação dos trombos ocorrem em animais vivos.

3.1.7 Impregnação pela hemoglobina (Embebição hemolítica)

A embebição hemolítica caracteriza-se por manchas avermelhadas nos endotélios vasculares, no endocárdio, nas proximidades de vasos, nas serosas (peritônio, pleura, omento, mesentério, etc.) (mais evidentes em tecidos claros e não visíveis em tecidos escuros). O aparecimento se dá em torno de oito horas após a morte (após ocorrer a formação do coágulo), quando, pelo mecanismo de hemólise, ocorre a liberação de hemoglobina, que se difunde nos vasos e tecidos. A embebição pela hemoglobina deve ser diferenciada das hemorragias subendocárdicas e subendoteliais. Na hemorragia, a mancha avermelhada toma uma tonalidade mais viva e é sempre mais profunda, enquanto na embebição a mancha é superficial e, à medida que se aprofunda, a cor diminui de intensidade^[7].

3.1.8 Impregnação pela bile (Embebição pela bile)

A alteração se caracteriza pela coloração amarelo-esverdeada nos tecidos circunvizinhos à vesícula biliar. O tempo para o aparecimento após a morte é muito variável, sendo mais comum em um período aproximado de oito horas. A alteração ocorre pela autólise da parede da vesícula

biliar e por ação dos sais biliares, que a fazem perder a capacidade de reter os líquidos biliares, ocorrendo a difusão dos pigmentos biliares para os tecidos (fígado e tecidos próximos)^[20,22].

3.1.9 Timpanismo ou meteorismo cadavérico (Timpanismo post mortem)

A alteração se verifica pela distensão abdominal e é devida à fermentação contínua e à putrefação do conteúdo gastrintestinal formando grandes volumes de gás. Esse gás distende as vísceras ocas e aumenta a pressão intra-abdominal. O tempo para o aparecimento é muito variável; geralmente ocorre em torno de 24 horas após a morte^[16].

No caso de ruminantes, é importante diferenciar o meteorismo *post mortem* do meteorismo *ante mortem*: como regra geral, no meteorismo *post mortem* há ausência total de alterações circulatórias na submucosa do tubo gastrointestinal. Já no meteorismo *ante mortem* é possível observar hiperemia e hemorragias na submucosa gástrica, congestão passiva nos órgãos abdominais (exceto no fígado e baço, que deverão estar anêmicos pela compressão do rúmen, no timpanismo ruminal). Congestão e edema pulmonar também são frequentes^[5,28].

3.1.10 Deslocamento, torção e ruptura de vísceras

Neste caso, verificam-se deslocamento e modificações na posição das vísceras sem alterações circulatórias. Às vezes, pode estar presente torção ou ruptura. Essa alteração ocorre em torno de 24 horas após a morte do animal e está associada à fermentação e à putrefação do conteúdo gastrintestinal que determina a formação de gases. Esses gases tendem se deslocar-se para as porções mais elevadas das vísceras, deslocando, distendendo, torcendo e, às vezes (conforme a distensão e a torção), causando rompimento^[17,18,26]. É importante diferenciar essas alterações víscerais *post mortem* das torções e das rupturas de vísceras *ante mortem* com base na ausência de alterações circulatórias (congestão, edema, hemorragia), ausentes nas alterações *post mortem*.

3.1.11 Pseudoprolapso retal (Prolapso retal cadavérico)

Verifica-se pela exteriorização da ampola retal, com ausência de alterações circulatórias que indiquem um processo *ante mortem*. Ele é decorrente do aumento da pressão intra-abdominal e intrapélvica por consequência da grande produção de gás (meteorismo/timpanismo)^[17,20].

3.2 Alterações cadavéricas transformativas

São correspondentes aos processos de decomposição e putrefação. A putrefação se distingue por ser decorrente da ação de enzimas proteolíticas do próprio organismo e por enzimas proteolíticas estranhas (heterólise), geralmente da proliferação de bactérias saprófitas oriundas do próprio trato gastrintestinal do animal^[7,16,18].

3.2.1 Pseudomelanose (Manchas de putrefação)

Apresenta-se por manchas irregulares cinza-esverdeadas na pele da região abdominal e em órgãos circunvizinhos ao trato mesentérico. Esta alteração é decorrente da deposição de ácido sulfídrico (H_2S). Esse é um produto da multiplicação bacteriana (putrefações) que reage com íons ferro produzidos no processo de catabolismo da hemoglobina, formando o composto sulfureto de ferro, que cora os tecidos dando aspecto de cinza-esverdeado^[7,11,23].

3.2.2 Enfisema cadavérico tecidual (Crepitação post mortem)

A alteração se caracteriza pela crepitação (presença de gás) nos tecidos subcutâneo e muscular, e em órgãos parenquimatosos. A ocorrência é consequente da proliferação de bactérias saprófitas (produtoras de gás) que decompõem os tecidos, levando à formação de pequenas bolhas de gás sulfídrico^[7,11,22].

3.2.3 Maceração das mucosas

Neste caso, ocorre o desprendimento das mucosas, em geral, pela ação de enzimas proteolíticas oriundas da proliferação bacteriana saprófita que age nas mucosas, degenerando-as. De modo geral, apresenta-se em até 24 horas após a morte. Entretanto, em ruminantes, principalmente, na mucosa do pré-estômago o desprendimento é extremamente precoce e não representa putrefação desse órgão^[5,7,18].

3.2.4 Coliquação/Liquefação (liquefação parenquimatosa post mortem)

Verifica-se pela perda progressiva do aspecto e da estrutura das vísceras, que se tornam amorfas. O processo é resultado da ação de enzimas proteolíticas geradas na proliferação bacteriana, que decompõem, desintegram e liquefazem o parênquima das vísceras^[17,23]. A ocorrência dessa alteração parece dar-se em aproximadamente sete dias após a morte do animal. Entretanto, é extremamente precoce na região medular da ad-renal e não representa a putrefação do referido órgão.

3.2.5 Redução esquelética (“Esqueletização”)

Fase final do processo de putrefação, caracterizada pela desintegração dos tecidos moles, restando apenas o esqueleto^[20]. Essa característica pode ser observada três a quatro semanas após a morte do animal.

3.3 Fatores que interferem no aparecimento das alterações cadavéricas

As alterações cadavéricas sofrem influencia de condições intrínsecas ou extrínsecas, que podem acelerar ou retardar a sequência e a intensidade dos processos. Os principais fatores incluem: i) temperatura ambiente (o calor acelera o aparecimento das alterações, pois estimula o crescimento bacteriano, e a baixa temperatura inibe a ação e a síntese de enzimas proteolíticas, assim como o crescimento bacteriano); ii) tamanho do animal (quanto maior o animal, mais difícil é o resfriamento e maior a velocidade de instalação das alterações); iii) estado de nutrição (quanto maior o teor de glicogênio muscular, mais tempo o *rigor mortis* levará para se instalar) e cobertura tegumentar (pelos, cerdas, penas, plumas, gordura, lã) dificultam a dissipação do calor (resfriamento) acelerando a instalação das alterações; iv) causa da morte (como as septicemias, com hipertermia pré-agônica, tétano, intoxicação por estricnina e traumatismos encefálicos – tetania, convulsões e hipertermia – aceleram a instalação das alterações cadavéricas por causa da grande atividade metabólica, do gasto de glicogênio e do aumento da temperatura^[5,8,12,17,18,23].

4. EXAME EXTERNO

O exame externo do cadáver é imprescindível, devendo obrigatoriamente fazer parte da rotina de inspeção antes de iniciar o procedimento de necropsia. Ele serve para facilitar a observação e a interpretação de quaisquer alterações que forem encontradas. Neste procedimento são verificadas e registradas informações como: estado nutricional, tempo de morte estimado (animais não *eutanasiados*), presença de corpos estranhos e alterações *post mortem* evidentes. Após esta etapa, deve ser realizada a seguinte rotina de exame/inspeção^[17,20,22,23,26]:

- i) Tegumento: a superfície da pele deve ser minuciosamente examinada para verificar a existência de soluções de continuidade, tumorações, alopecias, presença de parasitos ou de lesões subsequentes, manchas, eritema, nódulos, vesículas, pústulas, umidade, exsudatos e presença de corpos estranhos. Características de pelos, lã, cerdas ou penas, tais como facilidade de desprendimento, alopecias, opacidade, pelos arrepiados/eriçamento de penas, e presença de alterações/lesões nas estruturas das patas ou cascos (ungulados).
- ii) Aparelho locomotor: as articulações devem ser avaliadas quanto a aumento de volume e inchaço. Devem, também, ser abertas e examinadas quanto a: características do fluido sinovial, estrutura da cartilagem e cápsula articular e presença de exsudatos. Quando são encontradas alterações, elas devem ser avaliadas e submetidas à coleta de material para exames laboratoriais.
- iii) Coluna vertebral: presença de tumorações, abscessos e outras lesões/alterações.
- iv) Boca e fossas nasais: presença de secreções anormais, soluções de continuidade, pigmentações anormais, tumorações, corpos estranhos, parasitas (miíases), abscessos, integridade das mucosas. Também pode ser observada a integridade da arcada dentária e das gengivas.
- v) Olhos: presença e característica de secreções anormais, coloração da esclera e da mucosa ocular, presença de regiões de opacidade, congestão ou hemorragias e hidratação do globo ocular.
- vi) Pavilhão auricular: presença de parasitas, secreções anormais, soluções de continuidade, pigmentações anormais, tumorações e corpos estranhos.
- vii) Ânus e região perianal: coloração da mucosa, presença e característica das fezes e sujidades na região perianal.
- viii) Aparelho geniturinário: tanto na fêmea quanto no macho deve-se observar coloração e integridade das mucosas, presença de secreções anormais, soluções de continuidade, tumorações, corpos estranhos, parasitas (miíases) e abscessos. No caso do macho, devem fazer parte do exame a mucosa do pênis, a bainha prepucial, o prepúcio, o escroto e os testículos. No caso da fêmea, devem fazer parte do exame as glândulas mamárias para a detecção de possíveis lesões ou alterações.

5. TÉCNICA DE NECROPSIA

A realização de uma necropsia não supõe grandes complicações. De modo geral, independentemente da técnica, se são buscadas conclusões representativas e válidas, necessita-se estabelecer uma ordem sistemática de acordo com o método. De fato, é possível dizer que existem tantas técnicas de necropsia quantos forem os necropsiadores, uma vez que cada profissional tende a adaptar o método para melhor atender suas necessidades e inquisições. O importante é que quando definida a técnica pelo profissional médico-veterinário, é imprescindível que ele preserve e sistematize os procedimentos e as observações para garantir a ordenação e a competência do exame.

Existem diferentes formas de executar uma necropsia, porém todas devem possuir algumas características em comum, tais como:

- a) **Necropsia sistemática:** expressar sistematização dos procedimentos, sendo eles aplicados da mesma maneira todas as vezes;
- b) **Necropsia ordenada:** seguir necessariamente a mesma ordem de exploração em todos os casos;
- c) **Necropsia completa:** jamais deixar partes ou órgãos de um animal sem examinar, pois de maneira frequente não se realizam buscas completas, tendendo a necropsias parciais baseadas na suspeita clínica. A busca de lesões preconcebidas é prejudicial, pois faz com que o executor se precipite na realização da necropsia e focalize as atenções nos órgãos/tecidos que crê estar afetados e desconsiderando ou desvalorizando o restante da investigação e comprometendo o valor do diagnóstico.

Em geral, a necropsia deve incluir os seguintes passos básicos:

- i) preparação e exame externo do cadáver;
- ii) abertura do cadáver;
- iii) estudo dos órgãos, das estruturas e dos tecidos da cavidade abdominal;
- iv) estudo dos órgãos, das estruturas e dos tecidos da cavidade torácica;
- v) estudo da cabeça e dos anexos;
- vi) estudo dos nódulos linfáticos e da medula óssea;
- vii) estudo do aparelho locomotor (ossos, articulação e músculos).

5.1 Exame das vísceras

O exame das vísceras deve ser sistematizado a fim de preconizar os órgãos e tecidos que mais rapidamente podem sofrer alterações *post mortem* e, portanto, interferir no diagnóstico. O exame das vísceras, assim como sua retirada, pode ser alterado em consequência do histórico, de suspeita clínica e de lesões macroscópicas observadas na avaliação *in situ* das vísceras. Claramente, se há histórico clínico de transtornos gastrintestinais, deve-se iniciar a retirada e o exame das vísceras, a partir do sistema digestivo, melhorando a qualidade do exame macroscópico e garantindo a preservação das amostras para a execução de exames laboratoriais, haja vista a rapidez da autólise desse sistema. A mesma prioridade pode ser direcionada ao sistema respiratório desde que este seja o motivo clínico mais evidente para a necropsia.

De modo geral, é preferível iniciar o estudo e a coleta de material pelas vísceras consideradas limpas (língua, esôfago, traqueia, pulmão, coração, fígado, pâncreas, baço, rins, aparelho geniturinário e outros, sendo o estômago e os intestinos deixados por último porque são consideradas vísceras sujas, pois podem contaminar/sujar o restante do material com seu conteúdo).

Os aspectos a serem observados no exame macroscópico das vísceras são: tamanho (o órgão pode estar aumentado, diminuído ou compatível com a idade, espécie animal, sexo e estágio fisiológico); cor (vísceras e tecidos possuem uma pigmentação própria e intrínseca que pode sofrer alterações no curso de uma enfermidade ou sob ação de fatores extrínsecos; representa sempre uma informação importante, devendo ser avaliada minuciosamente); consistência (principalmente em órgãos parenquimatosos; devem-se verificar em toda sua extensão, através da palpação, os aspectos friável, endurecido e crepitação, exceto o pulmão); conteúdo (as características do conteúdo presente no interior dos órgãos ocos que constituem tubos, fisiológicas ou não, são básicas para o estabelecimento do diagnóstico); superfícies (a observação de superfícies, pele, mucosas e serosas de aspectos como liso, rugoso, granular, presença de nódulos e projeções

é importante para caracterizar algumas patologias); **odor** (o cheiro é uma característica inerente ao organismo animal e quando alterado ou presente em proporções anormais denota alguma alteração)^[7,10,18,20,29]. No Quadro 1 está sintetizada a descrição do aspecto das alterações realizada no exame macroscópico das vísceras.

Quadro 1. Terminologia utilizada na descrição dos aspectos das alterações a serem observados no exame macroscópico das vísceras.

Aspecto	Terminologia	Observações
Consistência e textura	Dura, firme, cede à pressão dos dedos, friável, mole, caseosa, crepitante (exceto pulmão), túrgida, viscosa ou pegajosa, adesiva, arenosa, granular, maleável	Principalmente em órgão parenquimatosos, verificar em toda sua extensão, através da palpação
Forma	Ovoide, esférica, cônica, elíptica, triangular, achatada, nodular, lobulada, tortuosa, discoide, pontilhada, crateriforme, bulbosa, cuneiforme, fusiforme, filiforme, rendada, espiralada, entrelaçada, fungoide	Característica importante, principalmente nas enfermidades que cursam com lesões pontuais
Cor	Usar a palavra precisa na designação da cor, indicando o grau e a distribuição e dar os qualitativos como: escuro, brilhante, claro, pálido, manchado, pontilhado, listrado	Vísceras e tecidos possuem uma pigmentação própria e intrínseca, que pode sofrer alterações no curso de uma enfermidade ou sob ação de fatores extrínsecos
Superfície	Com pelos, ulcerada, coberta com exsudato (especificar), lisa, erodida, rugosa, escavada, elevada, deprimida, brilhante, ondulada, áspera, escamosa, granular, presença de nódulos e protusões	A observação das superfícies de órgãos e tegumento (pele), mucosas e serosas é importante para caracterizar algumas alterações patológicas
Estruturas tubulares	Patente, dilatada, obstruída, estreitada, diverticulada, ramificada, comunicante, tortuosa	Nível de alteração e características pontuais de determinadas enfermidades
Tamanho da lesão	Registrar sempre no sistema métrico, mesmo que seja uma estimativa	Obter parâmetros de extensão e acometimento

Materiais necessários para coleta de material por ocasião da necropsia

Além do instrumental destinado ao procedimento de necropsia, é importante prever para coleta de amostras para exames laboratoriais os seguintes itens:

- i) frascos de boca larga, de 50 ou 250ml, com tampa que permita completa vedação;
- ii) solução de formaldeído a 10%;
- iii) sacos plásticos ou bolsas plásticas estéreis, que possibilitem vedação hermética;
- iv) suabes com meio de transporte;
- v) seringas hipodérmicas e agulhas estéreis;
- vi) barbante limpo;
- vii) caneta com tinta permanente ou lápis;
- viii) gelo reciclável e caixa de isopor;
- ix) placas de Petri esterilizadas.
- x) laminas histológicas;
- xi) material para anotação das informações pertinentes.

6. TÉCNICA DE NECROPSIA EM AVES

Não existe uma única técnica de necropsia; ela é realizada de acordo com a habilidade e a preferência do médico-veterinário. É recomendado que a necropsia seja realizada em aves recém-sacrificadas, pois as lesões encontradas em aves mortas (mesmo há algumas horas) podem estar mascaradas por alterações *post-mortem*. A necropsia tem por finalidade o diagnóstico ou monitoramento, e deve preconizar uma avaliação macroscópica minuciosa de todos os órgãos e tecidos, independentemente da suspeita clínica.

Antes de iniciar a necropsia, é importante a escolha de um local adequado, que possibilite a realização do procedimento de forma tranquila e confortável, sendo o ideal um local iluminado, com uma superfície lisa, possível de lavar e desinfetar ao término do trabalho. Como normalmente em campo o profissional não dispõe de tal ambiente, o procedimento de necropsia é realizado no chão, na grama, em mesas improvisadas, revestidas por algum material impermeável. A realidade em campo nos mostra que um local adequado e com o mínimo de conforto para desenvolver a técnica é difícil. Independentemente do ambiente onde a necropsia é realizada, deve-se proceder à desinfecção da área onde se realizou a necropsia.

As aves a serem *necropsiadas* devem representar as condições do plantel, evitando assim a escolha de aves refugo. Quando se investiga uma patologia, o ideal é escolher aves com sinais clínicos, aves aparentemente sadias e aves debilitadas.

6.1 Material necessário

O material necessário para a necropsia em aves é simples, podendo ser resumido apenas na tesoura de desossar/destrinchar e pinças. O uso de outros instrumentos proporciona uma necropsia de melhor qualidade, principalmente para a colheita de material para exames microbiológicos, devendo ser utilizados, além da tesoura de desossa, tesouras cirúrgicas, pinças dente de rato e pinças lisas^[14]. Em todos os procedimentos de necropsia, é imprescindível o uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs) por parte do profissional.

6.2 Exame *ante mortem*

O exame *ante mortem* é extremamente importante na investigação das diferentes patologias. A associação dos sinais clínicos, histórico e exame *post mortem*, na grande maioria dos casos, permite um diagnóstico presuntivo, que é normalmente confirmado através de exames laboratoriais. Para a realização dos exames clínicos *ante mortem* é necessária a correta contenção e imobilização da ave, cuidando para não causar traumas ou fraturas^[3]. Vários métodos para a contenção da ave podem ser utilizados; entretanto, o método da chave de asas, cruzando as asas uma sobre a outra, é o mais frequentemente utilizado, principalmente pela praticidade e nível de contenção, apesar de esse método ser de extremo desconforto para a ave e esta não deve permanecer nessa posição por tempo prolongado^[2,13]. A seguir, serão descritos alguns procedimentos de observação/inspeção durante a execução da necropsia de uma ave.

Pernas/jarrete: os jarretes devem ser estendidos e mantidos numa posição fixa. Deve-se examinar a articulação tibio-metatarsiana, procurando qualquer alteração que possa estar relacionada com artrite (aumento de volume ou de temperatura, hiperemia). Comparar simultaneamente as duas articulações para observar a assimetria. Examinar os pés, buscando evidências de anomalias, compactação de excrementos e tamanho das unhas. Checar a evidência de claudicação ou de incoordenação (desordens neurológicas ou motoras)^[3,4].

Crista e Barbelas: devem ser examinadas observando o desenvolvimento, a cor, as colecções de líquido e a presença de lesões cutâneas.

Olhos: são examinados e deve-se procurar algum tipo de anomalia que possa produzir cegueira ou assimetria das pupilas, presença de conjuntivite ou queratoconjuntivite.

Narina e sínus: pressione as narinas com os dedos no sentido caudo-rostral, observando se há saída de exsudato.

Cavidade oral e bico: examinar a orofaringe quanto à presença de crosta nas comissuras.

Penas e pele: examinar quanto à presença de parasitas externos, pigmentação da pele, empenamento e desprendimento das penas.

Cloaca: os parasitas externos são muitas vezes encontrados em torno desta região, bem como nas regiões entre as pernas, debaixo das asas e no dorso. Observar a consistência e a coloração dos excrementos (presença de diarreia), bem como o aspecto externo da região da cloaca, para a presença de assaduras.

6.3 Exame post mortem

O exame *post mortem* em aves consiste em avaliar macroscopicamente os órgãos ou tecidos, associando lesões macroscópicas com os sinais clínicos e o histórico do lote para, então, chegar a um diagnóstico presuntivo da enfermidade. É importante considerar que a macroscopia se inicia com um cuidadoso e minucioso exame externo e se acompanha a sequência da necropsia através da avaliação dos diferentes órgãos e tecidos^[3,4]. A sequência de avaliação vai depender da técnica de eutanásia adotada.

6.4 Técnica de necropsia

Não existe uma técnica padrão para a realização de necropsia, ficando a cargo do médico-veterinário definir a sequência e os procedimentos que melhor atendem suas inquisições. Desse modo, segue a descrição sequencial e os pontos de inspeção para a execução de um procedimento de necropsia em aves:

i) O primeiro passo da necropsia é umedecer as penas da ave com água contendo preferencialmente detergente ou desinfetante a fim de facilitar a visualização e a manipulação das diferentes estruturas e evitar a suspensão de dejetos.

ii) Posicionar a ave em decúbito dorsal com a cabeça direcionada para o lado oposto ao do executor.

iii) Realizar uma incisão medial em cada coxa a fim de liberá-las e desarticular a articulação coxofemoral, imobilizando a ave sobre a superfície apoiada.

iv) Rebater a pele da região torácica anterior (região do peito) deixando a musculatura exposta. Nesta fase é importante observar as características do tecido subcutâneo, da musculatura das coxas e das sobrecoxas. A musculatura da perna é examinada com o objetivo de evidenciar a presença de hemorragias ou de descoloração.

v) Na região das coxas, é importante expor o nervo ciático, através da disjunção cuidadosa dos músculos adutores, e analisar simultaneamente o nervo ciático esquerdo e o direito, considerando a consistência e a simetria deles.

vi) Na região da cabeça do fêmur, cortar a epífise distal longitudinalmente para expor a placa de crescimento ósseo e a medula óssea.

vii) Cortar o bico ao nível das narinas para expor os ossos turbinados. É conveniente fazer um corte lateralmente ao bico para visualizar os sínus infraorbitários.

viii) Fazer uma incisão longitudinal na pele do pescoço e expor a traqueia, o esôfago e o timo. Em alguns casos, quando o método de eutanásia for a desarticulação cervical, esta região pode apresentar lesões que dificultam a visualização dessas estruturas. Na sequência, cortar longitudinalmente a traqueia observando a presença de muco ou sangue na luz.

ix) Na porção distal do esôfago, avaliar a presença de alterações no inglúvio.

x) Para exposição dos órgãos internos, desarticular lateralmente o esterno estendendo-se até o osso coracoide, promovendo a abertura da cavidade torácica/abdominal, expondo os sacos aéreos, os pulmões, o coração e o fígado (Figura 1).

xi) Avaliação dos pulmões: uma vez removidos o coração e o fígado, podem-se examinar os pulmões, que ficam intimamente aderidos às costelas. Os pulmões podem ser separados da caixa torácica com certa facilidade e agilidade utilizando-se uma tesoura romba^[3].

xii) Quanto ao trato gastrointestinal (moela, intestino delgado, pâncreas, intestino grosso, válvula ileocecal), observar:

- *Proventrículo e moela*: fazer uma pequena incisão no proventrículo, introduzir a ponta fina da tesoura na abertura abrindo até a moela. Remover o conteúdo da moela e, se necessário, lavar cuidadosamente expondo a mucosa. O proventrículo é o estômago glandular; já a moela possui uma cutícula queratinizada, secretada por uma mucosa subjacente (coilina)^[3,4]. Examinar a integridade e a coloração do revestimento queratinizado. Posteriormente, remover e examinar as mucosas do proventrículo e da moela.
- *Alça duodenal e pâncreas*: seguindo o fluxo intestinal, após a moela encontramos o duodeno, e entre as alças duodenais está localizado o pâncreas.
- *Baço*: localizado abaixo do proventrículo, é uma estrutura ovoide, facilmente removível.
- *Intestino*: começar a abrir o intestino na região do duodeno ao longo de toda a sua extensão, incluindo o ceco. Durante o exame macroscópico, procurar evidências de lesões por coccidiose e presença de parasitas.

xiii) Os rins nas aves são compridos e lobulados, e estão intimamente aderidos à região dorsal da coluna vertebral.

xiv) Bursa de Fabricius: localiza-se sobre a parede dorsal da cloaca e está presente em aves saudáveis até elas alcançarem a maturidade sexual. Durante a macroscopia observar tamanho, consistência e coloração, bem como presença de hemorragias.

xv) Na fêmea em reprodução é importante observar também o ovário e os ovidutos, lembrando que o ovário e o oviduto direito são rudimentares e não funcionais.

xvi) Para a visualização do sistema nervoso, iniciar uma incisão através do forame magno, seguindo lateralmente, expondo meninges, cerebelo e cérebro.

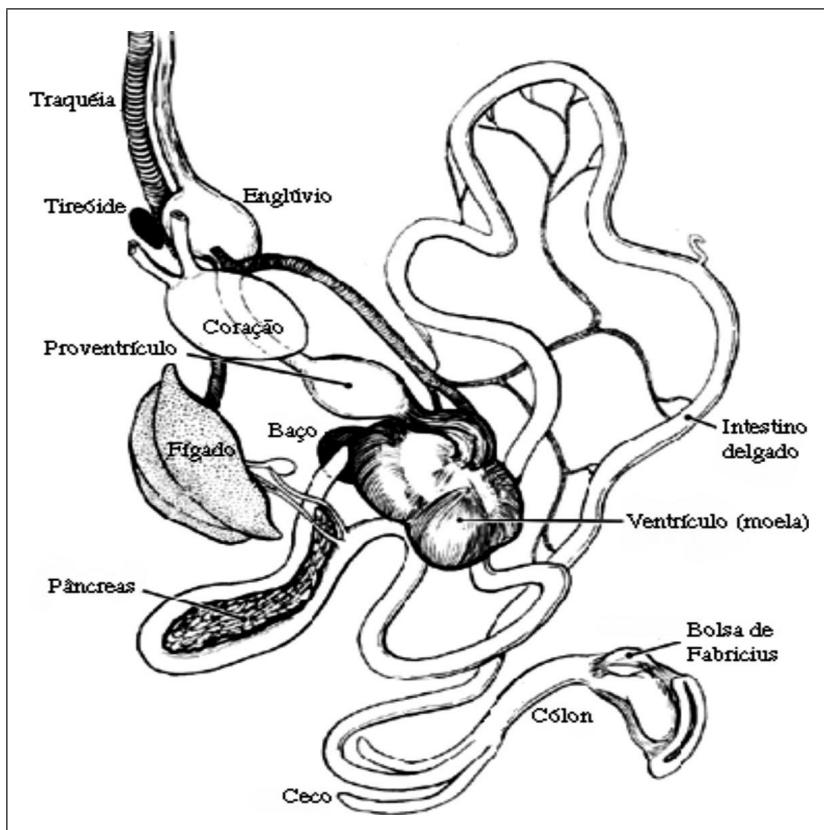


Figura 1. Órgãos internos das aves.

7. NECROPSIA EM BOVINOS

Para a pecuária moderna, a necropsia é uma prática fundamental para confirmação, esclarecimento ou correção do diagnóstico, sendo por vezes a única forma de chegar ao diagnóstico correto, elucidando enfermidades, porém muitas vezes é negligenciada^[19]. Numerosos erros de diagnóstico podem ser evitados ou corrigidos com a realização da necropsia^[19]. Em se tratando de sanidade bovina, adquire maior importância quando se trata de uma enfermidade que acomete a coletividade animal. É de suma importância para o desenvolvimento e a aplicação de medidas profiláticas e de controle, principalmente quando se trata de programas integrados de prevenção à saúde bovina.

A necropsia deve ser um procedimento habitual a fim de proporcionar um método de contínuo aperfeiçoamento profissional. Para tal, o profissional deve adotar uma rotina de necropsia, procurando aprimorá-la a cada vez, evitando, dessa forma, que lesões em determinados órgãos e tecidos passem despercebidas, as quais poderão ser importantes para a determinação do diagnóstico^[32]. A coleta e remessa dos materiais e o contato prévio com os laboratórios de diagnóstico animal são também pontos chave para o auxílio e a confirmação do diagnóstico nos sistemas de produção.

7.1 Técnica de necropsia em bovinos

Para que a necropsia contribua com a elucidação do diagnóstico, ela deve ser feita logo após a morte do animal e, preferencialmente, havendo a concordância do proprietário. Deve-se sacrificar um animal em fase agônica para a realização do procedimento, evitando que as lesões

patológicas sejam confundidas com as alterações cadavéricas, pois em bovinos e nos demais ruminantes, devido à grande flora microbiana gastrintestinal, a decomposição *post mortem* inicia rapidamente^[15].

A necropsia deve ser realizada em ambiente próprio para esse fim (sala de necropsia). Porém, quando da necessidade de ser realizada no campo, deve-se escolher um local que permita a eliminação dos restos cadavéricos por cremação ou enterro, bem como a desinfecção e o isolamento do local. Esses cuidados reduzem o risco de contaminação de outros animais^[32].

Mais importante que a escolha do método de necropsia é o exame cuidadoso de todos os órgãos e a correta coleta de material para exames laboratoriais.

7.2 Material necessário

O profissional deve levar em conta que o animal a ser *necropsiado* pode ser uma fonte infecciosa tanto para os animais como para o homem. A possibilidade de adquirir uma zoonose nunca deve ser subestimada. Por essa razão deve-se manter o máximo cuidado na assepsia, evitando o contato de fluidos e tecidos do cadáver com as pessoas que trabalham na necropsia. O uso de EPIs, como macacão, botas de borracha e luvas, é imprescindível aos executores, e devem ser esterilizados após a realização do trabalho^[15].

Para realização de necropsia em bovinos, basta que tenhamos em mãos faca, pinça, tesoura e serra ou machadinha, apesar de que a falta de instrumento não impede a realização do exame *post mortem*, pois uma única faca é o bastante para se necropsiar um bovino. Todavia, outros instrumentos, como costótomo, enterótomo, podão (para realizar o corte das costelas), cinzel para a raqueotomia, chaira e uma faca de lâmina curva, facilitam o exame e melhoram sua qualidade. Ter em mãos uma régua milimetrada facilita a descrição das lesões, e um frasco de boca larga rotulado é importante para acomodar o material a ser coletado. Cuidar para que os instrumentos se mantenham com bom fio e livres de oxidação e de restos de materiais.

7.3 Exame *ante mortem*

Antes de iniciar a necropsia, atenção especial deve se dada ao histórico clínico e aos dados da anamnese, os quais podem fornecer importantes indícios sobre a causa da morte do animal em questão.

Deve-se tomar nota da maior quantidade de dados possível do animal a se necropsiar, tais como: raça, sexo, idade, estado geral, peso aproximado, informações do ambiente (onde o animal se encontrava), dados sobre alimentação (forragem e suplementação), número de animais do lote, carga animal e disponibilidade de forragem, programa sanitário da propriedade, porcentagem de prenhez e de parição (principalmente nos casos de aborto), descrição dos sinais clínicos, tempo transcorrido entre aparecimento dos sintomas e a morte, morbidade e mortalidade, e tratamento se houver e resposta a ele.

7.4 Técnica de necropsia

Inicia-se pela inspeção externa do cadáver a fim de determinar seu estado de conservação, estado nutricional em que se encontrava o animal antes da morte, passando de imediato para um exame cuidadoso da superfície corporal, incluindo orifícios, pelos, úbere, dentes e olhos. Identificam as marcas superficiais, escoriações, ectoparasitos e todo sinal de traumatismo externo.

A abertura do cadáver deve ser realizada em decúbito lateral esquerdo, se possível com o dorso mais alto que o ventre (de forma que as estruturas grandes e pesadas não atrapalhem), sendo a cabeça do animal posicionada à esquerda do necropsista (destro); procede-se à incisão da pele na linha média (linha alba), desde a região mentoneana, junto à mandíbula, até o ânus. Rebate-se a pele e o membro anterior (com cuidado para não perfurar as cavidades). Desarticula-se o membro posterior junto à articulação coxofemoral. Examina-se o tecido subcutâneo, os linfonodos superficiais e o tecido adiposo.

Em seguida, abrem-se as cavidades abdominal e torácica (verificando pressão negativa no tórax), inspecionam-se as serosas das paredes cavitárias, as vísceras e os órgãos; neste momento, coleta-se material para estudos bacteriológicos e virológicos (antecedendo a manipulação no interior das cavidades). Dando continuidade, promove-se a remoção e o exame detalhado das vísceras abdominais, inclusive dos aparelhos genitourinário e ad-renal.

Na sequência, realiza-se abertura da cavidade oral e da região cervical. Remove-se como um monobloco língua, esôfago, traqueia, pulmões e coração promovendo-se o exame detalhado individualmente. Procede-se à abertura da cavidade craniana e do canal medular e, em seguida, ao exame de músculos, dos ossos e articulações^[1,15]. Quando da abertura de cavidades, deve-se examinar cuidadosamente a posição dos órgãos, a relação entre eles e a presença de fluidos. Os órgãos devem ser retirados e examinados sistematicamente com atenção ao tamanho, à simetria, à textura e à coloração. Também se deve observar a superfície de corte, e sempre que aparecerem lesões, procede-se à coleta de amostras para exames histopatológicos.

As amostras coletadas devem conter parte normal e parte lesada. Os fragmentos devem ser finos (2 x 3 x 0,5cm, possibilitando a penetração do fixador: formalina a 10% e outros fixadores).

Ao final da necropsia, eliminar o cadáver e providenciar o registro escrito de todos os achados. A descrição macroscópica das lesões fornece subsídios ao patologista para fechar o diagnóstico, com maior precisão.

8. TÉCNICA DE NECROPSIA EM CANINOS

8.1 Descrição técnica

Exames de necropsia constituem o melhor método para que se possa chegar ao diagnóstico de uma série de doenças que acometem a espécie canina. O estabelecimento do uso da necropsia como rotina na prática veterinária proporciona um meio de contínuo aperfeiçoamento profissional, permitindo a compreensão dos dados clínicos quando comparados às lesões macroscópicas observadas à necropsia e propiciando um meio de relacionar os sinais clínicos observados no paciente enfermo com as lesões que não eram visíveis ou aparentes durante a vida.

A necropsia permite ao médico veterinário confirmar seus diagnósticos ou descobrir erros. A observação frequente de pacientes na necropsia aumenta consideravelmente a experiência do clínico e lhe fornece compreensão mais significativa dos processos patológicos. O exame macroscópico permite, ainda, uma maior abrangência na colheita de material para exames virológicos, bacteriológicos, parasitológicos e toxicológicos, além de ser uma forma de acesso a órgãos para confecção de impressões ou esfregaços de tecidos, ou, por vezes, o único meio para se diagnosticar certas doenças (por exemplo, a babesiose cerebral).

Há diversos métodos de necropsia, todos com vantagens e desvantagens. Devem ser colhidos, pelo menos, fragmentos dos principais órgãos: fígado, rins, pulmões, coração, baço, além do sistema nervoso central e de diversas porções do tubo digestório. Outros órgãos ou tecidos, como

ad-renal, pâncreas, ovário, útero, bexiga, próstata, paratireoide, hipófise, pele, linfonodos, músculos, olhos e trato respiratório, devem ser colhidos dependendo do histórico e dos sinais clínicos. Em muitas ocasiões, não é possível chegar ao diagnóstico pelo exame de apenas alguns órgãos, o que pode resultar em resultados inconclusivos, ou ainda não estar afetados^[1].

Os fragmentos devem medir aproximadamente 2 x 3 x 0,5 cm, podendo chegar a até 1cm. A fixação dos fragmentos de tecidos deve ser feita com formalina a 10%, já que é um meio de fixação eficiente, barato e disponível no mercado. É muito importante que se observe a proporção de 10 partes da formalina 10% para cada parte do tecido a ser fixado e que a fixação deve ser realizada antes do envio ao laboratório. Pequenos fragmentos são fixados em um ou dois dias, enquanto para o hemiencéfalo são necessários de 4 a 7 dias, de acordo com seu tamanho. Após a fixação, o material pode ser enviado em vidros ou recipientes plásticos com formalina a 10% desde que sejam totalmente vedados e bem acondicionados para não ocorrerem quebras ou vazamento. Um método alternativo e mais barato consiste na redução dos fragmentos colhidos a uma espessura de 2 ou 3mm, mantendo-se, entretanto, as outras medidas. Depois de fixados, esses fragmentos são acondicionados entre duas espessas camadas de algodão embebidas no fixador. Esse material é, então, colocado em sacos plásticos hermeticamente fechados e são colocados em envelope para remessa^[27].

9. TÉCNICA DE NECROPSIA EM EQUINOS

A técnica de necropsia para solípedes aqui apresentada é resumida e pressupõe um conhecimento prévio de técnica para ruminantes.

a) Estude a história clínica e considere todos os diagnósticos possíveis. Observe a existência ou não de algum pedido específico do clínico para exames mais detalhados de determinadas partes ou órgãos. Exemplo: na requisição de necropsia de um animal que apresentou cegueira antes da morte, pode haver uma solicitação especial para o exame dos olhos. A não observância desse item poderá levar o patologista a negligenciar essa parte.

b) Examine externamente o cadáver, virando-o de lado, de modo a examinar ambos os lados. Ao ser concluído esse procedimento, o animal deverá permanecer em decúbito lateral direito e, se possível, com o dorso mais elevado que o ventre.

c) Seguindo a linha média, faça uma incisão na pele desde o mento até o ânus, desviando o prepúcio ou mama pela parte superior. Rebata a pele e os membros esquerdos dorsalmente, desarticulando o fêmur do acetábulo.

d) Verifique se há pressão negativa na cavidade torácica fazendo um pequeno orifício entre as costelas.

e) Faça uma pequena abertura na cavidade peritoneal imediatamente abaixo da ponta da protuberância da cabeça do fêmur. Estenda em direção ao crânio essa abertura até um ponto na última costela imediatamente abaixo dos grandes músculos do dorso. Usando um podador de ramos de árvore, corte as costelas, iniciando pela última e indo até a primeira, usando um traçado imaginário imediatamente abaixo dos grandes músculos do dorso. Depois de cortar o diafragma rente a sua inserção na parede da carcaça e após cortar levemente as articulações costocondrais no seu aspecto medial, as paredes da cavidade torácica e abdominal podem ser rebatidas em direção ao ventre de uma só vez. Examine todas as vísceras *in situ* e observe se há exsudatos ou transudatos nas cavidades do corpo. Nesse ponto, considere a necessidade ou não da coleta de material para cultura ou histopatologia.

f) Remova o omento e o baço, juntos.

g) Puxe a curvatura pélvica do grande cólon em direção ao ventre de maneira que a maior parte deste fique em ângulo reto com o corpo do animal. Rebata o pequeno cólon para a parte posterior do cadáver. Usando barbante grosso, ate-o duas vezes à altura das entradas na cavidade pélvica e no cólon transverso. Remova a parte do pequeno cólon e do mesentério que ficam entre as duas ataduras.

h) Remova a ad-renal e o rim esquerdo. Remova o rim com o ureter intacto.

i) Abra a aorta abdominal desde o tórax até sua bifurcação. Se necessário, limpe o sangue com toalhas de papel. Usando tesouras afiadas, abra a artéria mesentérica anterior e tantos dos seus ramos quanto for possível. Abra também os outros ramos da aorta. Depois da remoção do ceco e do cólon, a abertura dos ramos da artéria mesentérica anterior deve ser completada procurando por lesões de arterite verminosa por *Strongylus vulgaris*, que é uma importante causa de cólica em cavalos.

j) Remova o intestino delgado com seu mesentério correspondente. Amarre com barbante o piloro e a entrada ileocecal. O mesentério deve ser cortado rente a sua inserção para permitir que o intestino seja colocado numa linha em zigue-zague antes de ser aberto com o enterótomo. Um pequeno segmento de íleo e um de duodeno são deixados ligados ao ceco e ao estômago respectivamente.

k) Remova juntos, o grande cólon, o ceco e a artéria mesentérica anterior com aproximadamente 15cm da aorta donde ela se origina. Nessa operação haverá muito sangue uma vez que a veia cava posterior e a artéria aorta serão seccionadas.

l) Remova o estômago com o pequeno segmento de duodeno ainda ligado a ele. Isso é feito seccionando o esôfago na altura da cárdia e das ligações mesentéricas do estômago.

m) Remova a ad-renal direita e o rim direito com o ureter a ele ligado.

n) Remova juntos o fígado, o diafragma e a maior parte da veia cava posterior.

o) Depois de abrir a cavidade pélvica, separe a pelve na sínfise pubiana. Após isso, usando uma serra, seccione o lado direito dos ossos púbis e ísquio. Remova a parte direita da pelve que acaba de ser serrada. Remova, como um monobloco, o reto, a genitália e a bexiga. O próximo passo é separar o reto e o ânus da genitália, abrir todas as outras estruturas removidas e examiná-las. Remova em seguida o prepúcio, pênis e testículos e examine-os.

p) Remova língua, faringe, laringe, traqueia, esôfago, coração e pulmões e coloque esse monobloco numa mesa com língua voltada para o lado direito. Palpe os pulmões profunda e cuidadosamente a fim de detectar lesões não visíveis na inspeção da superfície do órgão.

q) Abra o esôfago longitudinalmente, examine sua mucosa e então o destaque do monobloco.

r) Examine as glândulas tireoides.

s) Examine a superfície natural e a superfície de corte de todos os linfonodos.

t) Abra a laringe e a traquéia. Em seguida, separe os pulmões do coração e do mediastino.

Abra as veias pulmonares, as artérias pulmonares e os brônquios principais.

u) Abra, examine e remova o pericárdio parietal, verificando as características do líquido do saco pericárdico.

v) Examine o coração e a aorta, abrindo e removendo o pericárdio e anotando possíveis conteúdos anormais e o aspecto das superfícies epicárdicas e pericárdicas. Observe a configuração geral do coração, especialmente o tamanho e forma relativa das câmaras cardíacas vistas externamente. A flacidez ou a firmeza aparente do miocárdio podem estar relacionadas com o grau de sístole por ocasião da morte ou com alterações patológicas reais associadas à dilatação ou à hipertrofia cardíaca. Observe a presença de sangue coagulado nos ventrículos. Presença de sangue coagulado no ventrículo esquerdo indica processos degenerativos do miocárdio.

Existem diferentes técnicas de abertura do coração. A seguir, está descrita uma das técnicas frequentemente utilizadas em campo. Para abrir o ventrículo direito, segure o coração na mão esquerda, com o lado esquerdo do órgão voltado para você. Faça a incisão começando no tronco pulmonar, penetrando no ventrículo direito, margeando o septo interventricular. Abra o tronco pulmonar passando pela bifurcação e examine a artéria pulmonar, as válvulas semilunares e o endocárdio do ventrículo direito. Vire o coração de maneira que o ventrículo direito fique voltado para você. Continue a incisão seguindo o septo interventricular para dentro do átrio direito. Abra o ventrículo e o átrio. Examine a válvula atrioventricular direita (tricúspide), o endocárdio, as veias cavas, etc. O átrio e os ventrículos esquerdos são abertos com uma incisão reta. Corte através da cúspide parietal da mitral. Observe a válvula mitral e as aberturas das veias pulmonares. Para abrir a aorta, coloque a faca sob a cúspide septal da válvula mitral e corte a parede do átrio em direção à aorta. Com a aorta aberta, observe as válvulas semilunares da aorta, o orifício das coronárias, e o tronco braquiocefálico. Feito isso, corte o miocárdio em várias fatias procurando possíveis alterações.

- w) Disseque a pele e os músculos da cabeça e remova o cérebro, examinando-o a seguir.
- x) Examine os músculos, os ossos e as articulações; em seguida, disseque a pele da cabeça e remova os músculos dessa região. Finalmente, desarticule a cabeça na articulação atlantoccipital.
- y) Registre todos os achados de necropsia por escrito.

10. TÉCNICA DE NECROPSIA EM FELINOS

Para a obtenção de um laudo laboratorial preciso é necessário que o patologista esteja ciente da história, dos sinais clínicos, da evolução, do tratamento e da resposta ao tratamento ao qual o animal foi submetido. O médico-veterinário é responsável por encaminhar essas informações juntamente com a amostra para que o patologista possa decidir sobre os testes a serem realizados.

A falha no diagnóstico, frequentemente, é causada pela submissão ou conservação inadequada do material. Outro problema que pode ocorrer está relacionado com a colheita inadequada da amostra, o manuseio inapropriado e o atraso no envio ou na entrega. Esses fatores resultam em perda da qualidade da amostra, sendo impossível realizar os testes fundamentais para se obter o diagnóstico^[1]. Comumente, o processo diagnóstico é interrompido devido à ausência de tecido apropriado ou quantidade insuficiente da amostra. Por isso, a importância de se conhecer as doenças e lesões que elas causam^[9]. No envio de mais de uma peça ao laboratório, elas devem ser armazenadas e identificadas individualmente^[30].

A necropsia deve ser realizada de forma sistemática para que todos os órgãos e sistemas sejam avaliados. Inicia-se examinando externamente a carcaça e observando a presença de feridas, condição da pelagem e estado nutricional do animal. Em casos de presença de alterações na derme, devem-se colher amostras de pele de áreas normais e anormais. Em seguida, o cadáver deve ser posicionado em decúbito dorsal, se possível, ou em decúbito lateral. A pele deve ser incisada na região do mento até a pelve. Nas fêmeas devem-se palpar as glândulas mamárias para verificar a existência de nodulações. Nos machos, deve-se examinar o prepúcio e o pênis. A pele das laterais deve sofrer divulsão para que se exponha a musculatura até a coluna vertebral. Os membros pélvicos e torácicos devem ser desarticulados.

A musculatura abdominal é incisada e, após a abertura da cavidade, devem-se observar os órgãos internos quanto a sua posição anatômica. Nessa etapa, devem ser colhidas as amostras estéreis de sangue e tecidos para cultura bacteriana ou diagnóstico virológico. As amostras de san-

gue podem ser retiradas do coração (preferencialmente do átrio direito). Amostras adicionais também podem ser colhidas para estoque de soro e testes sorológicos.

Os órgãos devem ser então removidos individualmente, examinados e amostrados sistematicamente. Alterações ou lesões devem ser descritas de forma criteriosa, conforme localização, número, distribuição, cor, tamanho, formato, consistência e textura. Fotografias podem ser a melhor forma de documentação. Deve-se ainda verificar a quantidade e a coloração de qualquer fluido nas cavidades. Observe a ocorrência de aderências entre órgãos e a cavidade, e se estas se desprendem facilmente.

Na inserção do esôfago ao estômago, antes de se realizar a secção, liga-se a abertura do estômago com um cordão, evitando que o conteúdo extravase. Retira-se integralmente estômago e intestinos unidos, seccionando as ligações mesentéricas. Retiram-se também alguns linfonodos mesentéricos. O pâncreas deve ser mantido junto ao duodeno, e o baço ao estômago. Completando a retirada dos intestinos, antes de seccionar o reto é importante ligar sua extremidade a fim de evitar extravasamento de conteúdo fecal. No final da necropsia, intestino e estômago são incisados longitudinalmente, observando seus conteúdos, avaliando a presença de substâncias potencialmente patogênicas, como plantas tóxicas. Amostras estomacais são colhidas para toxicologia, bem como fragmentos do pâncreas e de todas as áreas do trato gastrintestinal para avaliação histológica. Essas amostras e possíveis parasitas encontrados são fixados em formol a 10%.

O baço é separado do estômago e avalia-se a presença de anormalidades realizando cortes seriados no parênquima do tecido. Remove-se o fígado da cavidade, examina-se internamente a vesícula biliar quanto ao seu conteúdo, e realizam-se cortes seriados no parênquima hepático.

As glândulas ad-renais e os rins devem ser examinados e amostras para exame histológico devem ser coletadas. O material para histologia dos rins deve incluir córtex, medula e pelve. Amostras para toxicologia também devem ser colhidas. Remove-se a bexiga urinária, examinando-a interna e externamente. Examinam-se útero e ovários nas fêmeas e testículos nos machos. Esse exame é feito após a realização de cortes longitudinais nas gônadas e outros expondo a luz uterina antes de fixar as peças em formol a 10%.

Após avaliar a cavidade abdominal, perfura-se o diafragma para observar se há presença de pressão negativa no tórax. Em seguida, expõe-se a cavidade torácica seccionando as costelas na junção costocondral. Os ossos da laringe, os caudais e a língua são separados e a traqueia, juntamente com o esôfago, é dissecada, indo até o tórax, retirando os pulmões, coração e grandes vasos. O timo, quando presente, deve ser colhido. Deve-se, ainda, abrir e examinar o esôfago, a traqueia, os brônquios e os bronquíolos. Amostras dos linfonodos ao redor das vias aéreas devem ser colhidas. Examinam-se os pulmões e avalia-se a presença de nódulos e áreas de consistência aumentada. Devem-se colocar amostras das áreas anormais e de áreas macroscopicamente normais. Após isso, as câmaras cardíacas são abertas para examinar as válvulas e, caso haja alteração, retire amostras abrangendo todas as camadas cardíacas e os tecidos valvulares.

Examinar os olhos, a boca e as narinas avaliando a presença de úlceras e corrimientos anormais. Remover um dos globos oculares para histologia seccionando os músculos perioculares. Examine a cavidade oral, as tonsilas e os dentes e remova as tonsilas e os linfonodos subcutâneos localizados na região posterior da cavidade oral e sobre a laringe para exame histológico.

Para o exame do encéfalo, primeiramente se deve segmentar a articulação atlantoccipital. Retirar a pele da porção superior do crânio e a calota craniana. Remover o encéfalo e seccioná-lo ao meio. Conservar um hemisfério em formol 10% e o outro sob refrigeração para virologia, bacteriologia, micologia e toxicologia. Em casos de suspeita de raiva, maiores cuidados devem ser tomados, com o emprego de máscaras e óculos. O encéfalo deve ser, neste caso, seccionado ao meio enviando um hemisfério para exame de raiva e devendo a outra metade ser fixada para ava-

liação histológica. Para a avaliação da medula óssea, deve-se remover um dos ossos longos dos membros pélvicos e fragmentá-lo ao meio, fixando uma parte para histologia e armazenar outra para cultura microbiológica.

11. TÉCNICA DE NECROPSIA EM SUÍNOS

Inicialmente, é necessário constatar o grau e a extensão das alterações cadavéricas, as quais nos darão uma informação aproximada do tempo transcorrido desde a morte do animal e, sobretudo, do estado de decomposição do cadáver. Os cadáveres em estado avançado de autólise não só oferecem pouca informação, mas também podem induzir a confusão quando se tem que estabelecer um diagnóstico macroscópico (fica difícil determinar se as alterações são devidas a uma enfermidade ou ao processo de autólise). A amostra considerada ideal é o suíno vivo, no qual podemos obter e estudar os sinais clínicos e, à medida que é realizada a eutanásia e a necropsia, garantir a eficácia do estudo macroscópico e da coleta de amostras para exames complementares.

Na sequência, deve ser realizado o exame externo completo: tegumento (pele, cerdas, mucosas em geral), cascós e articulações, boca e fossas nasais, olhos, pavilhão auricular, anus e região perianal, aparelho geniturinário, glândula mamária e cadeia de linfonodos superficiais.

11.1 Posição do animal para necropsia

A posição do animal para a realização da necropsia pode variar. De modo geral, recomenda-se a posição de decúbito dorsal, com a cabeça voltada para o lado esquerdo do operador, exceto se este for canhoto. Essa posição permite a observação dos dois antímeros do animal e a comparação *in situ* das vísceras.

11.2 Desmembramento do animal

Para separar os membros anteriores, incisar as regiões axilares (secção da musculatura peitoral entre a escápula e o tórax, os ligamentos e os músculos escapulares e costais) até que os membros formem um ângulo reto em relação ao eixo longitudinal do animal^[20]. Para a desarticulação dos membros posteriores, proceder a uma incisão na região inguinal, seccionando a pele e a massa muscular até a desarticulação coxofemoral (secção do ligamento redondo e separação da cabeça do fêmur do acetábulo), rebatendo-os da mesma forma que os anteriores. Os membros ficarão distendidos lateralmente, repousarão diretamente sobre a superfície de apoio (solo ou mesa) mantendo o cadáver estabilizado, facilitando a execução da necropsia.

11.3 Retirada da pele

Proceder à incisão mentoxifopubiana (desde a extremidade anterior da mandíbula ate a região da sínfise pubiana). Se o animal for macho, quando a incisão chegar à altura do pênis, este deve ser rebatido na direção da caudal com a bainha prepucial. Se for fêmea, dissecar e examinar as glândulas mamárias à medida que a pele é retirada. A pele deve ser rebatida em ambos os lados do cadáver o mais completamente possível a partir da linha média^[21]. Durante a retirada da pele, é importante que sejam observados: o tecido subcutâneo, os vasos, os músculos e os linfonodos superficiais (abscessos, lesões vasculares, reatividade e lesões nos linfonodos e na cadeia linfática, parasitas).

11.4 Retirada do conjunto língua-esôfago-traqueia

Seccionar o pavimento da cavidade bucal rasante à face interna da asa da mandíbula (em forma de triângulo seguindo a projeção da mandíbula) até atingir a entrada do tórax^[17]. A partir da incisão do pavimento da cavidade bucal, penetrar com os dedos na cavidade bucal e pôr a língua para fora. Puxar a língua para cima, seccionar o frênuco, desarticular o osso hioide seccionando a cartilagem entre a haste maior e menor, expor as tonsilas (corte em V no palato mole) e, finalmente, liberar e puxar o conjunto língua-esôfago-traqueia até a entrada anterior da cavidade torácica.

11.5 Abertura da cavidade torácica

Com uma faca ou serra, seccionar as articulações costocondrais no sentido crânio-caudal, iniciando nas primeiras costelas e retirar o esterno (plastrão esternal; nele se pode observar o timo em animais jovens). O corte das costelas na altura das junções costocondrais também pode ser realizado com um costótomo (podão), realizando a secção no sentido caudal-cranial, a partir da última costela e em seguida remover o plastrão esternal com uma faca^[23]. Após a abertura do tórax, é importante o exame das vísceras torácicas *in situ*, devendo-se observar a integridade e a ocorrência de distopias, presença de líquidos e fibrina (pleurite exsudativa) nas cavidades pleural e pericárdica, aderências, parasitas e abscessos^[24,31]. Nesse ponto, considerar a necessidade da coleta de material para exames microbiológicos ou complementares e deve-se fazer a coleta de líquidos (suave) pericárdicos e pleurais.

11.6 Retirada do complexo língua-esôfago-pulmão-traqueia-coração

Ligar o esôfago e os grandes vasos (aorta abdominal) próximos ao diafragma com dupla ligadura e seccionar. Puxar o conjunto língua-esôfago-traqueia, já liberados, até a entrada anterior da cavidade torácica. Seccionar os ligamentos mediastínicos anteriores e tracionar, na direção da caudal, o conjunto língua-esôfago-traqueia-pulmão-coração, retirando-os da cavidade torácica.

Separar o esôfago da traqueia e abrir cada órgão, seccionando longitudinalmente. A língua, as amídalas e a tireoide devem ser seccionadas transversalmente com tesoura ou bisturi. Examinar e coletar tonsilas na medida da necessidade.

É importante, neste ponto, quebrar uma ou mais costelas para avaliação da resistência óssea. Seccionar uma costela longitudinalmente, próximo à articulação costocondral, a fim de examinar a cartilagem de crescimento, a medula óssea e a espessura do periosteio.

11.7 Abertura da cavidade abdominal

Pinçar a linha média tracionando-a para cima e incisar do apêndice xifóide ao umbigo. Nesse ponto, considerar a necessidade da coleta de material para exames complementares. Na sequência, com pinça ou com os dedos indicador e médio, manter a linha media tracionada para cima e prolongar a incisão até a sínfise pubiana (púbis)^[24,25]. Na região cranial, a partir da incisão central, seccionar a musculatura abdominal acompanhando o arco costal na altura da última costela, em direção às vértebras torácicas até a região dorsal. Finalmente, na região caudal, a partir do púbis, também realizar um corte em direção às vértebras lombossacrais, liberando a musculatura da parede abdominal. Essa abertura possibilita o exame das vísceras torácicas *in situ*, devendo observar a integridade e a ocorrência de distopias, presença de líquidos, fibrina (peritonite), aderências, parasitas e abscessos na cavidade abdominal. Nesse ponto, considerar a necessidade da coleta de material para exames complementares^[22].

11.8 Retirada do baço e do omento maior

Secciona-se a inserção junto à curvatura maior do estomago, porção esquerda do colo e ramo esquerdo do pâncreas, tendo o cuidado para não retirar junto o pâncreas^[6].

11.9 Retirada do intestino

Fazer uma ligadura dupla no intestino delgado próximo à porção caudal do pâncreas e outra no reto, na região mais caudal possível. Seccionar entre as ligaduras e separar o intestino do mesentério cortando rente às alças (cuidado com a porção espiralada do cólon). A ligadura dupla permite o corte e a separação das estruturas evitando o extravasamento de conteúdo intestinal para o interior das cavidades abdominal/pélvica e consequente contaminação ou dificuldade de manipulação. Nesse ponto é possível observar as ad-renais, cuja posição é paravertebral e cranial em relação aos rins^[6,21].

11.10 Retirada do mesentério

Depois de ter sido separado do intestino, o mesentério deve ser retirado e sua inserção dorsal deve ser seccionada.

11.11 Retirada do conjunto estômago-fígado-duodeno-pâncreas

Deve-se ligar o esôfago em sua porção abdominal junto à passagem diafragmática, seccionando-o. Seccionar os ligamentos coronários, lateral direito, lateral esquerdo e falciforme do fígado e, por último, os ligamentos do omento menor existentes entre o fígado e o rim para liberação do conjunto para ser retirado da cavidade abdominal^[22,23].

11.12 Retirada do conjunto geniturinário-reto

Liberar os rins separando-os do peritônio e preservando os ureteres. Seccionar (com costótomo, serra ou faca), em ambos os lados, o ramo acetabular do púbis, passando pelo forame obturador e seccionar o arco isquiático. Retirar o arcabouço ósseo do assoalho da pelve^[6,20]. Uma alternativa é a desarticulação da sínfise isquiática com auxílio de uma faca ou serra. Para a retirada do conjunto geniturinário-reto com a genitália externa, ânus e região perineal, faz-se um corte perineal ou perivulvar-perianal (fêmea) e a partir de tração póstero-anterior, liberando a ligação da cavidade pélvica.

11.13 Retirada do diafragma

Seccionar sua inserção na parede torácica em ambos os lados até sua liberação total, o que possibilita sua retirada.

11.14 Desarticulação

A desarticulação deve ser realizada de modo a verificar a presença de alterações patológicas (físicas ou estruturais) nas articulações, particularmente relacionadas a distúrbios de locomoção. O acesso à articulação deve ser minucioso, visto que, além do exame da articulação, muitas

vezes há a necessidade de colher líquido sinovial ou estruturas da articulação para exames laboratoriais mais detalhados como por exemplo isolamento microbiológico (vírus/bactérias), o que exige um procedimento asséptico ou estéril.

11.15 Abertura do crânio e do encéfalo

Desarticulação atlantoccipital e separação da cabeça: Localizar o ponto exato da articulação colocando o dedo na região e mexendo a cabeça do animal. Seccionar os músculos e ligamentos e promover a extensão da articulação, empurrando o focinho do cadáver de encontro a suas costas. Nesse ponto é importante prever, com auxilio de um suave, a coleta de material do sistema nervoso para exame microbiológico, visto que é possível acessar o interior do crânio no espaço submeníngeo, principalmente nos casos de meningite estreptocócica.

11.15.1 Rebatimento da pele e dos tecidos moles

Apoiando a cabeça sobre a base do occipital, com auxilio de uma faca seccionar a pele no sentido longitudinal, da nuca ao focinho, rebatendo-a lateralmente e removendo os músculos e os tecidos moles.

11.15.2 Demarcação e secção da calota craniana

Traçar uma linha de marcação no limite anterior da cavidade craniana, imediatamente posterior aos processos supraorbitários e após as apófises supraorbitárias dos ossos frontais, unindo o extremo caudal de um olho ao outro. Deslocar (na altura do canto lateral da pálpebra), ventrolateralmente ao arco zigomático e em direção caudal até o forame magno. Seccionar (com escopro e um martelo, machadinha ou serra) os temporais, parietais e parte do occipital, unindo as extremidades da secção anterior ao forame magno removendo a calota craniana e expondo o cérebro (recoberto pela dura-máter) e a medula, que está localizada na linha média^[6,24].

Caso haja necessidade de colheita de material para exame bacteriológico, esse é o melhor momento para fazê-lo. Faz-se uma incisão na dura-máter com tesouras esterilizadas e nela se introduz um suave; pode-se, também, usar “pinças dente de rato” esterilizadas. Colhe-se o material da pia-aracnoide, do ventrículo e do plexo coroide.

11.15.3 Retirada da meninge e exposição do cérebro e do cerebelo

Utilizando pinça e tesoura, seccionar longitudinalmente e rebater lateralmente a dura-máter, certificando-se de que a porção de meninges entre o cérebro e o cerebelo tenha sido retirada. Antes de seccionar, é importante examinar as meninges quanto a: vascularização (congestão, hemorragias), deposição de exsudatos, cor, aspecto, espessura, etc.^[6,10,20].

11.15.4 Retirada do sistema nervoso central completo

O sistema nervoso central completo compreende os hemisférios cerebrais, o cerebelo e o tronco encefálico. Virar a cabeça do animal, de modo que o encéfalo fique por baixo. Assim, aproveitando a força da gravidade, seccionar cautelosamente a emergência dos nervos cranianos, retirando o encéfalo da cavidade craniana^[6,21,23].

Outra possibilidade para retirada do sistema nervoso central é, inicialmente, desarticular a mandíbula e, com uma faca ou lâmina posicionada entre os dois incisivos superiores, incisar o

crânio longitudinalmente seguindo a linha média, propiciando a separação do SNC e da calota craniana em metades simétricas. Essa técnica é indicada para animais de até 45kg de peso vivo.

Nesse ponto, atentar para coleta de material (hemisférios cerebrais, cerebelo e tronco encefálico). Quando necessário, colher o gânglio trigeminal (localizado na fosseta de Meckel e recoberto pelo pericrânio que forma o diafragma hipofisário) e fazer dois cortes longitudinais, paralelos como se estivesse unindo o clinoide cranial com o vértice do rochedo temporal. Posteriormente, seccionar transversalmente o diafragma hipofisário, cranial ao clinoide e sentido caudal próximo ao vértice do rochedo temporal. Utilizando-se de uma pinça, retirar o diafragma hipofisário e, em seguida, o gânglio trigeminal.

11.16 Retirada da medula espinhal

Desarticular todos os membros. Posicionar o cadáver em decúbito ventral (costelas seccionadas próximo às vértebras). Retirar os tecidos moles ao longo da porção dorsal das vértebras^[6,20]. Com um costótomo ou serra elétrica manual, seccionar as vértebras oblíqua e longitudinalmente, de maneira que possam ser retirados o processo espinhoso e o teto do arco vertebral da coluna vertebral, expondo a medula espinhal. Seccionar cautelosamente a emergência dos nervos espinhais, próximo aos forames intervertebrais. Retirar a medula.

11.17 Necropsia de leitões recém-nascidos, lactentes, natimortos e mumificados

A necropsia de leitões lactentes ou recém-nascidos é de fácil realização e de modo geral é muito praticada por médicos-veterinários na rotina diagnóstica em unidades de produção que contemplam a produção de leitões. Entretanto, por se tratar de animais de pequeno porte e estruturas proporcionais, o exame dos órgãos e tecidos, assim como a coleta de material, deve ser bastante detalhado e minucioso. Por se tratar de animais jovens, a utilização de facas de pequeno e médio porte, tesouras, pinças lisas e dentes de rato são suficientes para proceder à necropsia com sucesso.

A posição do animal para necropsia e o seu desmembramento seguem o mesmo procedimento de animais maiores. Nesse momento, é importante avaliar a reatividade e as lesões dos linfonodos superficiais (linfonodos inguinais superficiais).

11.17.1 Retirada do conjunto língua-esôfago-traqueia

Seccionar o pavimento da cavidade bucal, rasante à face interna da asa da mandíbula (em forma de triângulo seguindo a projeção da mandíbula) ate atingir a entrada do tórax. Puxar para trás a língua, seccionar o frênuco, desarticular o osso hioide, expor as tonsilas (corte em V no palato mole) e puxar o conjunto língua-esôfago-traqueia até a entrada anterior da cavidade torácica. Nesse ponto, é importante examinar as tonsilas e estudar a possibilidade de coleta delas para exames laboratoriais.

11.17.2 Abertura da cavidade torácica

Com uma faca, seccionar as articulações costocondrais, no sentido crânio-caudal, iniciando nas primeiras costelas, e retirar o esterno (plastrão esternal), permitindo o exame das vísceras torácicas *in situ*. Nesse ponto, é possível observar o timo ligado ao plastrão esternal. Na sequência, com o mesmo instrumento de corte, abrir a cavidade abdominal dando sequência à incisão ate a

sínfise pubiana (púbis). Essa abertura possibilita o exame das vísceras abdominais *in situ*. Tanto no momento de abertura da cavidade torácica como da abdominal deve-se observar a integridade e a ocorrência de distopias, presença de líquidos e fibrina (pleurites, pericardites, peritonites), características da vascularização, aderências, parasitas, abscessos, assim como a necessidade da coleta de material para exames laboratoriais^[6,22,26].

11.17.3 Retirada do conjunto língua-esôfago-traqueia-pulmão-coração

Tracionar o conjunto língua-esôfago-traqueia, já liberados, até a entrada anterior da cavidade torácica. Seccionar os ligamentos mediastínicos anteriores e puxar para trás o conjunto língua-esôfago-traqueia-pulmão-coração, retirando-os da cavidade torácica como um monobloco (língua, laringe, traqueia, esôfago, coração e pulmão).

11.17.4 Retirada das vísceras abdominais

Seccionar o esôfago em sua porção abdominal junto à passagem diafragmática e fazer uma ligadura no reto na região mais caudal possível, cortando-o logo em seguida. A partir da secção da porção abdominal do esôfago, puxar para cima e para trás os órgãos abdominais, como um monobloco, liberando os ligamentos coronários, falciformes do fígado, do omento menor e o conjunto, possibilitando a retirada do interior da cavidade abdominal.

Outra possibilidade é a técnica do monobloco, que consiste em seccionar o pavimento da cavidade bucal rasante à face interna da asa da mandíbula (em forma de triângulo seguindo a projeção da mandíbula). Liberar e puxar para trás língua, traqueia e esôfago (seccionar o frênuco, desarticular o osso hioide, expor as tonsilas) até a entrada anterior da cavidade torácica. Com uma faca, seccionar as articulações costocondrais, no sentido crânio-caudal, iniciando nas primeiras costelas, e retirar o esterno (plastrão esternal). Na sequência, com o mesmo instrumento de corte, abrir a cavidade abdominal dando sequência à incisão ate a sínfise pubiana (púbis). Tracionar o conjunto língua-esôfago-traqueia, já liberados, até o diafragma (seccionar a inserção do diafragma na parede torácica, em ambos os lados ate sua liberação total), continuar puxando o conjunto para cima e para trás formando um monobloco com as vísceras abdominais. Fazer uma ligadura no reto na região mais caudal, cortando-o logo em seguida e possibilitando a liberação total.

Para o exame do sistema nervoso central, com uma faca ou bisturi realizar a desarticulação atlantoccipital e a separação da cabeça. Rebater a pele e os tecidos moles. Com uma faca ou tesoura seccionar os locais de articulação entre os ossos temporais, parietais e occipital unindo ao forame magno e removendo a porção superior da calota craniana. Retirar a meninge e expor hemisférios cerebrais, cerebelo e tronco encefálico. Virar a cabeça do animal e, aproveitando a força da gravidade, seccionar cautelosamente os nervos cranianos e retirar o encéfalo da cavidade craniana.

11.18 Exame macroscópico

a) **Língua, amídalas e a tireóide:** examinar a superfície e as papilas. Seccionar transversalmente a língua, as amídalas e a tireoide (sobre as paratireoides) e verificar a superfície de corte. Observar aspecto, volume, cor, forma e consistência de cada órgão.

b) **Tonsilas palatinas:** identificar a localização e examinar a superfície.

c) **Esôfago:** separar o esôfago da traqueia até sua porção inicial. Abrir em sua extensão total, verificando a integridade da mucosa, espessura e consistência da parede e presença de corpos estranhos.

d) **Laringe e traqueia:** seccionar ventral e longitudinalmente, avaliar conteúdo, coloração e integridade da mucosa. A traqueia deve ser seccionada ate os brônquios, verificando também a espessura da parede bronquial e a presença de exsudatos (aspecto, volume, cor).

e) **Pulmões:** verificar com atenção a superfície pleural (brilhante, lisa ou rugosa, áreas desprimidas ou elevadas), coloração, consistência, crepitação, presença de exsudatos (fibrinoso ou purulento), lesões vasculares, áreas de consolidação e abscessos. Seccionar atentamente lobos pulmonares, linfonodos mediastínicos e bronquiais e avaliar aspecto, volume, cor, forma e consistência.

f) **Coração:** pinçar a extremidade do pericárdio na região do ápice cardíaco e fazer o corte observando o conteúdo do saco pericárdico. Posteriormente, retirar o coração do saco pericárdico e seccionar os grandes vasos. Comparar o diâmetro longitudinal do coração com o diâmetro transversal e verificar cor e consistência. O epicárdio deve ser avaliado quanto a: presença de lesões vasculares (como hemorragias), deficiência de vitamina E (selênio) e lesões degenerativas^[10,20]. Na sequência, o coração deve ser corretamente aberto, no lado direito. Com uma tesoura, fazer uma secção na entrada da veia cava cranial e caudal, indo até a ponta da aurícula e, depois, seguindo o fluxo do sangue pelo septo, seccionar o início da artéria pulmonar. Do lado esquerdo, fazer um corte longitudinal na porção média sobre a parede do átrio e do ventrículo esquerdo (da ponta do coração até a inserção das veias pulmonares) e seguindo o fluxo do sangue, seccionar o início da artéria aorta. Com o coração aberto, verificar a espessura das paredes em relação ao tamanho das câmaras cardíacas (miocardiopatias, fenômenos vasculares); observar coágulos, manchas ou granulações no endocárdio e nas válvulas (endocardite vegetante)^[24,26]. Examinar, também, os septos interatrial e interventricular, procurando localizar anomalias (intercomunicações).

g) **Vasos:** com auxilio de uma tesoura, abrir a veia cava posterior, a veia porta e a artéria aorta.

h) **Diafragma:** examinar ambos os lados (torácico e abdominal) e observar coloração, consistência, presença de exsudatos, lesões vasculares, nódulos e abscessos.

i) **Omento:** verificar cor, aspecto, transparência, deposição de fibrina e cistos parasitários (*Cysticercus tenuicoilis*)^[10,23].

j) **Baço:** observar volume, cor, consistência e aspecto. Realizar cortes transversais e examinar a disposição das polpas branca e vermelha.

k) **Bexiga:** primeiramente, examinar externamente quanto à repleção e ao aspecto da serosa (opacidade, lesões vasculares) e coletar urina com seringa para avaliação microbiológica. Em seguida, com uma tesoura, abrir longitudinalmente pela curvatura da região posterior expondo a mucosa. No exame da mucosa observar aspectos como coloração, hemorragias (cistite hemorrágica por *Actinobaculum suis*), exsudatos e espessura da parede.

l) **Rins e ureteres:** separar os rins e as ad-renais do tecido adiposo periférico por dissecação, individualizando os ureteres e os vasos renais. Examinar a superfície renal quanto à presença de hemorragias, assimetrias, cicatrizes, cistos e características da cápsula. Cortar longitudinalmente por sua parte convexa (curvatura maior) até o hilo. Em seguida, retirar a cápsula e observar: cor, volume, consistência, fibroses, abscessos, cistos e aderências da cápsula. Observar a superfície de corte (cortical, medular e pélvica) quanto a tamanho, forma, consistência, hemorragias, infartos, cistos, exsudatos e abscessos. Atenção para lesões parasitárias (*Stephanurus dentatus*)^[17,24]. No caso dos ureteres, abrir a partir da bexiga, observando, espessura da parede, diâmetro, presença de exsudatos e características vasculares (infecção urinária ascendente por *E. coli* ou *Streptococcus spp.*)^[10,23].

m) **Genital feminino:** com uma tesoura, abrir longitudinalmente, a partir da vulva, vagina, útero, cornos uterinos e ovários. Observar volume, cor, consistência, aspecto, hemorragias, espessura

sura da parede, diâmetro, presença de exsudatos, assimetrias, cicatrizes, indicativos de gestação ou parto. No caso do ovário, observar a evolução folicular e a presença de cistos^[17,23].

n) **Genital masculino:** abrir a bolsa escrotal e examinar epidídimos e testículos quanto a simetria, tamanho, forma, aspecto e consistência. Em seguida, abrir através de um corte mediano e avaliar as características e o aspecto do parênquima. As glândulas anexas também devem ser apreciadas.

o) **Fígado, vesícula biliar e pâncreas:** examinar a superfície hepática e o órgão como um todo observando volume, cor, consistência (friável ou endurecido), aspecto das bordas e superfície (aspecto liso, rugoso ou granular e presença de nódulos, abscessos e protrusões), hemorragias, cicatrizes e áreas de degeneração ou necrose. Em seguida, fazer cortes seriados nos diversos lobos, observando superfície de corte (migração de parasitos, degenerações [hepatose dietética], septicemias, toxemias e abscessos)^[6,21,25]. No caso da vesícula biliar, verificar se existe obstrução no colédoco; para tal, com uma tesoura seccionar longitudinalmente o duodeno sem separá-lo do fígado. Em seguida, comprimir a vesícula biliar e examinar se há fluxo de bile para o interior do duodeno através do colédoco. Depois, seccionar a vesícula biliar e observar o aspecto do conteúdo (cor e concentração), a mucosa, a espessura da parede e a presença de cálculos^[24]. Em relação ao pâncreas, seccioná-lo transversalmente e examiná-lo pormenoradamente.

p) **Linfonodos:** todos os linfonodos devem ser examinados, de preferência juntamente com a víscera ou o tecido de relação. Devem ser observados: volume, reatividade, consistência, cor e aspecto. É necessário fazer uma secção longitudinal para examinar a superfície de corte.

q) **Exame macroscópico dos cornetas nasais:** é método de rotina, mais rápido e eficiente para determinar o grau de severidade da atrofia dos cornetas nasais e prevalência de rinite atrófica em rebanhos suínos. Para a realização do exame macroscópico, fazer um corte em um plano sagital mediano ao comprimento do focinho na linha imaginária entre o primeiro e o segundo pré-molar ou na nona prega do palato e examinar as conchas nasais e as vias aéreas.

r) **Sistema nervoso central:** antes de seccionar as meninges, é importante examinar quanto à vascularização meníngea (congestão, hemorragias), deposição de exsudatos, cor, aspecto e espessura. Em seguida, observar a superfície do encéfalo, atentando para o aumento de volume, aspecto da vascularização, pontos de amolecimento, hemorragias. Separar longitudinalmente cérebro e cerebelo (separar os hemisférios). Em uma das metades fazer cortes transversais para melhor observação de possíveis alterações. No exame externo da medula, observar manchas, aumentos de volume, amolecimentos, cor e aspecto. Para um exame mais minucioso, seccionar transversalmente a medula, observando na superfície de corte a ocorrência ou não de manchas, amolecimentos e hemorragias^[6,21]. Na medida da necessidade, proceder ao encaminhamento de amostra para exame laboratorial. O exame da medula espinhal é indicado no caso de haver histórico de sinais clínicos indicativos de lesão da coluna vertebral ou necessidade de encaminhamento de amostra para exame laboratorial.

s) **Sistema muscular:** seccionar a musculatura em diferentes regiões para observação e identificação de possíveis alterações: áreas claras (deficiência de vitamina E, selênio) e áreas de necrose (necrose muscular aguda, evidenciada no *longissimus dorsi*); abscessos, parasitos^[10,20]. No caso da síndrome de estresse, a principal característica diferencial observada é o *rigor mortis* logo após a morte, visto que a lesão muscular pode ser confundida.

t) **Articulações:** Observar externamente características de aumento de volume, inchaço e, a partir da desarticulação, características do líquido sinovial, a cápsula articular e as superfícies das cartilagens epifisárias dos ossos envolvidos. É importante prever a coleta de material para exames laboratoriais.

u) **Ossos**: quebrar uma ou mais costelas para avaliação da resistência óssea. Seccionar uma costela longitudinalmente, próximo à articulação costocondral, a fim de examinar a cartilagem de crescimento, a medula óssea e a espessura do periósteo. Esse procedimento é muito importante, principalmente em animais da fase de crescimento, como forma de identificar algum tipo de distúrbio mineral ou enfermidade óssea.

v) **Estômago**: inicialmente observar repleção, presença de conteúdo (leitões lactentes com hipoglicemia por baixa ingestão de leite) e características da serosa (cor, aspecto, forma e estadio dos vasos). Abrir o estômago seguindo a curvatura maior, examinar o conteúdo (cor, aspecto, viscosidade, parasitas e corpos estranhos). Retirar o conteúdo gástrico, lavar levemente com água e examinar a mucosa esofágica-gástrica (cor, aspecto, espessura da parede, e características do comprometimento da *pars aesophagea*).

w) **Intestinos**: Dispor o intestino (duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto) em zigue-zague, dividido em seis seções, sendo a última o intestino grosso^[21,24]. Antes de abrir, examinar a serosa (cor, vascularização) e verificar a consistência através da palpação. Cada segmento intestinal deve ser submetido a cortes transversais segmentares e longitudinais, preservando somente as regiões dos segmentos que serão coletados para exames laboratoriais. No exame, observar características do conteúdo (cor, aspecto, parasitas e corpos estranhos), mucosa (espessura, lesões vasculares, presença de exsudato, parasitos) e diâmetro do lúmen.

Referências bibliográficas

1. BARROS, C.S.L. **Guia da técnica de necrópsia dos mamíferos domésticos**. Santa Maria: s.n., 1988. 47p.
2. BORDIN, E.L. Diagnóstico **post-mortem em avicultura**. São Paulo: Nobel, 1981. 165p.
3. BROWN, C.; RECH, R.; RISSI, D.; COSTA, T. **Poultry Necropsy Manual**. Department of Pathology, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.
4. BUTCHER, G.D.; Miles, R.D. **Avian Necropsy Techniques**. Medicine-Large Animal Clinical Sciences Department, Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, June, 2003.
5. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY: ANIMAL HEALTH. **Manual of Common Procedures**. Section: Specimen Collection and Submission; Specimen Packaging; Specimen Transportation. Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Canada, 2002, 61p.
6. CARRASCO, L. La necropsia en cerdos. **Revista SUIS**. n. 1, p. 70-87, 2008.
7. CHEVILLE, N.F. **Introduction to Veterinary Pathology**. 3. ed. Wiley-Blackwell, Hardcover, 2006, 581p.
8. COOK, R. et al. **Management Manual: Laboratory Preparedness**. Animal Health Australia, Canberra, 1996, 56p.
9. COOPER, V.L.; HELMAN, R.G. Selecting the best specimens for diagnosing disease. **Veterinary Medicine**, p. 968-973, 1999.
10. DOMINGO, M. et al. **Casos de patología porcina**. v. 1 e 2. Temis Pharma. Barcelona, 2000, 34p.
11. GONZÁLES, F.H.D, SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 198p.
12. JEACOCKE, R.E. The temperature dependence of anaerobic glycolysis in beef muscle held in a linear temperature gradient. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 28, n. 6, p. 551-556, 1977.
13. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.

14. KOERICH, P.K. et al. **Ave: Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New print, 2007. 165p.
15. MARTINS, E. Necropsia e coleta de material para laboratorio. In: SEMANA DE ATUALIZACAO EM BOVINOCULTURA: MÓDULO SAÚDE ANIMAL, 1989, Lages, SC. **Anais...** Lages, SC: Empasc/Estação Experimental de Lages, p. 175-179.
16. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES. **Procedures for Collection and Submission of Specimens**. National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, 2006, 47p.
17. NOGUEIRA, R.H.G. **Exame post-mortem em suínos**. Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG. n. 16, p. 31-37, 1996.
18. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE, **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed. World Organization For Animal Health, 2008.
19. PEIXOTO, P.V. e BARROS, C.S.L. A importância da necropsia em medicina veterinária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, n. 3. p. 132-
20. ROWLAND, A. Post-mortem examination of the pig. **In Practice**, v. 11, p. 203-206, 1989.
21. SEGALÉS, J; DOMINGO, M. **La necropsia en el ganado porcino: Diagnóstico anatomo-patológico y toma de muestras**. 2003, 125p.
22. SERAKIDES, R. **Colheita e remessa de material para exames laboratoriais**. Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG. n. 16, p. 39-57, 1996.
23. SILVEIRA, D.; SOBESTIANSKY, J. **Técnica de necropsia em suínos**. Goiânia, 1997. 112p.
24. SIMS, L.D.; GLASTONBURY, J.R.W. **Pathology of the pig**: a diagnostic guide. The pig research and development corporation, 1996, 86p.
25. SMITH, W.J.; TAYLOR, D.J.; PENNY, R.H.C. **Atlas en color de patología porcina**. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1990. 44p.
26. SOBESTIANSKY, J. et al. **Suínos: coleta e remessa de material para laboratórios para fins de Diagnóstico**. Goiânia, 2005. 122p.
27. VASCONCELOS, A.C. **Necropsia e conservação de espécimes para laboratório**. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG, n. 16. p. 1-86, julho, 1996.
28. VETERINARY LABORATORIES AGENCY. **Submission of Samples to the Veterinary Laboratories Agency**. Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addleston, Surrey, United Kingdom, 2003, 27p.
29. VETERINARY SERVICES OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Regulations for Classifying Infectious Substances and Diagnostic Specimens**, USDA Veterinary Services. N.06, 2005, 59p.
30. VOLMER, P.A. Help us help you! Getting the most from a diagnostic toxicology laboratory. **Veterinary Medicine**, 2007.
31. WHITTEMORE, C.T. **The Science and Practice of Pig Production**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 201p.
32. WINTER, H. **Guía para la necropsia de los ruminantes domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1969, 118p.

CAPÍTULO 5

COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO

Álvaro Menin

Carolina Reck

Débora Cristina Olsson

Josaine Cristina da Silva Rappeti

Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

Renata Dezengrini Shessarenko

Vagner Miranda Portes

O planejamento da coleta de amostras depende do objetivo que se quer contemplar. A amostra deve ser na quantidade suficiente e representativa do processo que se procura elucidar. Além disso, a representatividade dos procedimentos analíticos realizados no laboratório também dependem diretamente da qualidade das amostras disponíveis.

Considerando as diversas espécies animais, descrevemos brevemente as principais metodologias utilizadas na coleta de amostras clínicas destinadas ao diagnóstico veterinário, assim como as particularidades relacionadas à representatividade das amostras, os ensaios aplicáveis, a conservação e os determinantes da sua qualidade para utilização no processamento laboratorial.

1. COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM AVES

Para determinarmos o número e o tipo de amostras a serem colhidas, em geral, devemos levar em consideração a finalidade, a epidemiologia da doença pesquisada, o número de aves alojadas no plantel e a prevalência da enfermidade estudada. Existe a recomendação mínima de 20 amostras, devendo ser considerados a finalidade da colheita, o tipo e o sistema de produção e a patologia.

1.1 Colheita de sangue

A sorologia visa ao diagnóstico indireto de determinadas doenças, buscando o contato com抗ígenos específicos e a monitoria de níveis de anticorpos vacinais, comprovando a eficácia da vacinação ou o nível de proteção do plantel.

A colheita de sangue poderá ser realizada a partir da veia braquial ou por punção cardíaca, dependendo do tamanho da ave. O material necessário para proceder à colheita de sangue é: agulhas (medidas 25 x 8 ou 25 x 7), seringa de 3 ou 5ml, frascos ou tubos de ensaio limpos e secos, preferencialmente siliconados ou mesmo tubos do tipo *vacutainer*.

A quantidade de amostras a serem colhidas depende da finalidade do exame e do tamanho do plantel a ser amostrado. Já a quantidade de sangue que pode ser colhida seguramente de uma ave clinicamente saudável é 1% de seu peso de corporal, em gramas^[58]. Entretanto, de galinhas adultas indica-se a colheita de no mínimo 3ml de sangue.

Para a obtenção de soro, colher sangue sem anticoagulante, deixando ocorrer a formação do coágulo para posterior separação do soro. Para a obtenção de sangue total ou plasma, colher sangue utilizando anticoagulante (preferencialmente, EDTA ou citrato de sódio)^[58,60]. A obtenção do plasma se dá através de centrifugação, que permite a separação da fração líquida da fração celular do sangue.

a) Punção Cardíaca

A punção cardíaca é um método utilizado quando se trata de aves muito jovens, de pequeno porte, muito debilitadas, ou quando se necessita de grande volume sanguíneo. Essa técnica oferece alto risco de morte para o animal quando executada por pessoas inexperientes. Para a execução, deve-se realizar a contenção da ave através do cruzamento das asas e puncionar na região da base do esterno (região da quilha), cuidando para não atingir a traquéia^[24,63]. O uso do cateter ou da agulha, ao atingir o coração, resulta na drenagem de sangue para o interior da seringa.

b) Colheita de sangue na asa (veia ulnar)

A colheita de sangue na região da asa (veia ulnar) é o método mais indicado para aves maiores. Entretanto, podem ocorrer dificuldades quando a colheita é realizada em aves muito velhas ou muito debilitadas. Para a realização do procedimento de coleta deve-se colocar a ave em decúbito lateral e contê-la pelas patas e pelo pescoço, sendo a colheita realizada a partir da veia da asa (veia ulnar)^[58,63]. Inicialmente, retirar o excesso de penas da parte interna da asa para melhorar a visualização do vaso. Introduzir lentamente a agulha com o chanfre para cima, retirando lentamente o sangue, sempre respeitando a vazão da veia (Figura 1). Ao colher a fração de sangue desejada, remover a agulha e realizar a hemostasia por pressão ao vaso no local da punção durante alguns segundos, o que ajudará a minimizar a ocorrência de hematomas. Ao utilizar uma seringa, após a colheita, realizar a transferência de forma lenta do sangue para um frasco apropriado (tubo), com anticoagulante (por exemplo, EDTA) para a obtenção de sangue total ou plasma, ou sem anticoagulante para a obtenção de soro, lembrando que se deve retirar a agulha da seringa para realizar esse procedimento de transferência para evitar que ocorra hemólise^[58]. Para a obtenção de soro, deve-se deixar o frasco levemente inclinado em repouso, em temperatura ambiente, tendo o cuidado para não preencher totalmente o volume do frasco, deixando um espaço vazio para que ocorra a separação do soro. Jamais se deve deixar esse sangue exposto ao sol.

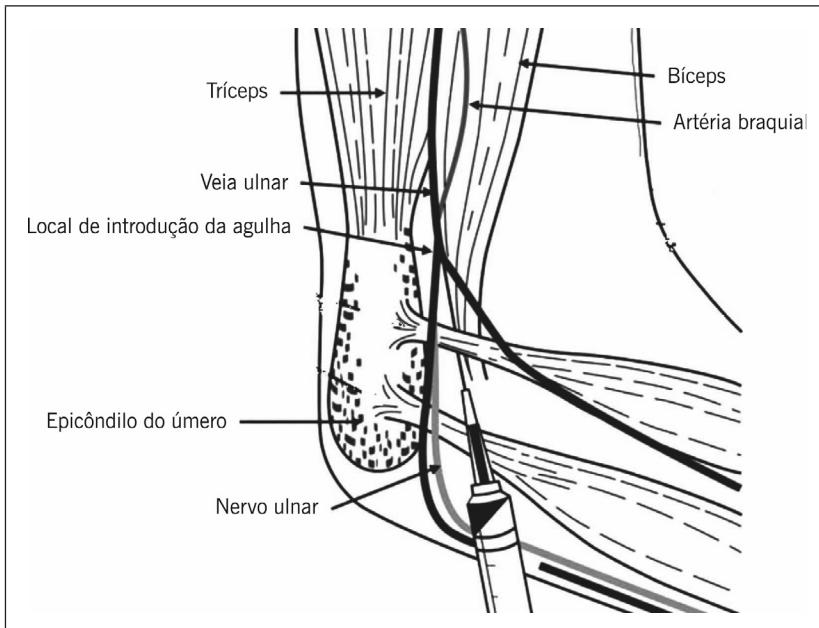


Figura 1. Local de punção com agulha para colheita de sangue na veia ulnar em aves.

1.2 Colheita de amostras utilizando suabes

A utilização de suabes para colheita de material destinado a exames laboratoriais pode ser aplicada em aves vivas, principalmente traqueia e cloaca, ou ser utilizado para monitoria do ambiente, nos suabes de arrasto, de fundo de caixa ou ninho. Em aves submetidas a necropsia, também podem ser empregados suabes para colher materiais para exames laboratoriais, principalmente para a colheita e amostragem de determinados exsudatos.

Os materiais colhidos com auxílio de suabes podem ser destinados à realização de exames bacteriológicos, virológicos, PCR, e devem ser acondicionados/armazenados de acordo com a exigência do exame requerido. Para isolamento viral, o suabe deve ser acondicionado em meio seletivo com a adição de antimicrobianos. Para isolamento microbiológico, deve ser acondicionado somente sob refrigeração. Para exames utilizando a PCR, deve-se levar em conta o agente a ser pesquisado, podendo ser acondicionado sob refrigeração ou congelado.

a) Suabe de traqueia

Para realizar a colheita de material traqueal utilizando um suabe de traqueia, deve-se abrir o bico da ave, puxar delicadamente a língua para expor a traqueia e mantê-la na posição desejada através de uma leve pressão com o dedo indicador na região entre os ramos mandibulares. Na sequência, introduzir delicadamente o suabe na traqueia, cuidando para não lesionar o animal nem contaminar o suabe com conteúdo de origem alimentar. Ao retirar o suabe, observar se não há restos alimentares aderidos, pois isso é indício de que o suabe foi introduzido no esôfago. Os suabes com material colhido devem ser acondicionados em meio de transporte adequado, de acordo com a finalidade/exigência do teste diagnóstico a ser realizado, podendo estes ser armazenados em *polos* ou simplesmente acondicionados em tubos estéreis ou em meio específico.

b) Suabe de cloaca

O procedimento exige a exposição da cloaca, cuidando para não tocar o suabe nas penas da região pericloacal, visto que mantém aderido grande quantia de matéria orgânica.

c) Suabe de arrasto

Para a realização de suabes de arrasto, são necessários suabes estéreis apropriados, podendo ser utilizadas gazes amarradas a um cordão e protetor de pés de algodão. No caso das gazes amarradas a um cordão, devem ser arrastadas pela extensão do galpão ou contemplando a região necessária a ser amostrada. Ao se utilizar protetores de pés, estes devem ser vestidos sobre as botas e o executor caminhar por toda a extensão do galpão ou pela extensão que se deseja amostrar. Em ambas as situações, os suabes, após a colheita, devem ser acondicionadas em meio de transporte (por exemplo, contendo água Peptonada Tamponada (BPW), PBS ou solução de leite desnatado 10% estéril) e mantidos sob refrigeração 2-8°C. Iniciar o arrasto ou a caminhada do centro até a extremidade do galpão, a fim de amostrar todo o ambiente.

d) Fundo de caixa/ninho

Para este procedimento, é indicado, preferencialmente, montar um suabe utilizando uma haste (madeira ou metal) e gaze. Passar o suabe pela extensão da caixa, principalmente no fundo, onde ocorre acúmulo de fezes. Após a colheita, os suabes devem ser acondicionados em meio de transporte como água Peptonada Tamponada ou mesmo PBS. Manter sob refrigeração (4°C).

1.3 Colheita de cama de aviário

Colher amostras de vários pontos do galpão, totalizando aproximadamente 500 gramas. Armazenar em sacos plásticos estéreis e encaminhar ao laboratório em temperatura ambiente ou sob refrigeração caso o tempo entre a coleta e processamento ultrapasse 48 horas.

1.4 Colheita de mecônio

O mecônio pode ser colhido nas primeiras 48 horas, sendo feito um *pool* (50 a 200ml) a fim de amostrar o lote em questão e enviar para o laboratório sob refrigeração. O tempo entre a coleta e processamento não deve ultrapassar 48 horas.

1.5 Colheita de fezes

Quando houver necessidade de realizar exames bacteriológicos ou parasitológicos, colher em média 20 a 50g de fezes frescas (24 horas), contemplando vários pontos do aviário, sempre com auxílio de espátulas. Quando utilizados sacos plásticos, eles também podem ser usados para dinamizar a coleta. Armazenar em sacos ou frascos estéreis e acondicionar/encaminhar o material sob refrigeração o mais rápido possível ao laboratório de diagnóstico.

1.6 Colheita de amostras de água para exames laboratoriais

A qualidade da água pode ser avaliada por meio de exames físicos, químicos e microbiológicos. A água ideal para aves deve ser limpa, insípida e inodora. A composição química da água afeta a condição sanitária do intestino dos animais e a eficácia de medicamentos, pois podem não solubilizar em águas que são muito duras ou que tenham um pH inadequado. O exame físico considera as características de coloração, sabor, cheiro, turbidez e temperatura. Exame químico é determinado por características como: sólidos dissolvidos totais, dureza, pH e porcentagem de certos elementos na água, como nitrato, amoníaco, sulfato, pesticidas, ferro, potássio e cloro.

O exame microbiológico da água determina o nível de contaminação, identificando os microrganismos e determinando o total de bactérias por unidade de amostra. Para exame da qualidade da água, deve-se coletar água em frasco estéreis descartáveis. Os pontos de coletas podem ser na caixa de água, torneira e *nipples*. Nos dois últimos, deve-se proceder primeiramente a uma limpeza externa, deixar a água sob vazão por pelo menos um minuto e, em seguida, colher a amostra de água. As amostras colhidas devem ser identificadas e acondicionadas/armazenadas sob refrigeração (4°C), sendo remetidas ao laboratório o mais rápido possível.

2. COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM BOVINOS

A interação entre médicos-veterinários clínicos e laboratórios veterinários, através de estudos clínicos, epidemiológicos e patológicos gera dados que, integrados, favorecem o diagnóstico em bovinocultura. A correta colheita e preservação do material para a análise laboratorial, assim como dados de anamnese, histórico clínico e necropsia são de fundamental importância para a integridade e a segurança dos resultados gerados.

2.1 Amostras para exame histopatológico

Por ocasião da necropsia devem ser coletados, pelo menos, fragmentos dos principais órgãos: fígado, rins, pulmões, coração, baço, além do sistema nervoso central (encéfalo e fragmentos de medula espinhal) e de diversas porções do tubo digestivo; outros órgãos ou tecidos, como ad-renal, pâncreas, ovário, útero, bexiga, próstata, paratireoide, hipófise, pele, linfonodos, músculos, olho e trato respiratório superior devem ser coletados na dependência do histórico e dos sinais clínicos^[94].

Os fragmentos para exame histopatológico não devem medir mais que 1cm de espessura^[120], sendo recomendado selecionar fragmentos de aproximadamente 2 x 3 x 0,5cm^[94]. No caso de órgãos tubulares, retirar um fragmento que inclua a circunferência completa. Em relação ao encéfalo, proceder à coleta conforme o tópico amostragem de SNC. Tomar cuidado para não comprimir ou esmagar o tecido e para que o fragmento seja coletado no limite da lesão, contendo porção patológica e tecido normal adjacente. Acondicionar as amostras em frasco de boca larga, tampa de rosca e limpos. Evitar o manuseio excessivo para não produzir alterações histológicas que prejudiquem o diagnóstico, especialmente quando se trata de sistema nervoso.

A fixação pode ser realizada em formalina a 10% (diluição de formalina comercial 37-40% em água, na relação de 1:10). Também é muito importante que se observe a proporção de 10 partes de fixador (formalina 10%) para cada parte do tecido a ser fixado^[94,120]. Tecidos que tendem a flutuar, como pulmão e medula óssea, podem ser envoltos por gaze^[11].

O material a ser enviado ao laboratório deve ser, de preferência, fixado antes de ser remetido. O tempo de fixação é de 1 a 2 horas para cada milímetro de espessura do tecido^[118]. Transcorrido o período de fixação inicial, a formalina deve ser descartada, as amostras lavadas em água corrente e, posteriormente, nova formalina 10% deve ser adicionada ao recipiente^[11]. As amostras não devem ser congeladas, pois inviabilizam a obtenção de secções histológicas adequadas para exame^[118]. A remessa do material deve ser acompanhada de uma descrição da necropsia.

Amostras de testículos e ovários devem ser fixadas em solução de Bouin (solução saturada de ácido pícrico, formaldeído e ácido acético), pois formalina a 10% promove alterações histológicas nesses tecidos^[21].

2.2 Amostras de biópsia

Fragmentos amostrados em biópsias devem apresentar dimensões com no mínimo 0,3cm de espessura e 0,4cm de profundidade, de preferência na área de transição, contendo tanto a lesão como a área adjacente não afetada^[118]. Nos casos de massas sólidas (neoplasias, granulomas) removidas cirurgicamente, deve ser assegurada uma margem de segurança com no mínimo 0,2cm na amostragem para biópsia, permitindo a avaliação adequada das margens da lesão, particularmente quanto a neoplasia for invasiva^[118]. As amostras devem ser fixadas, de preferência, em formalina tamponada 10%.

2.3 Biópsia hepática

Este procedimento é realizado em bovinos adultos após sedação e anestesia infiltrativa local. O local da punção é o 11º espaço intercostal direito ao nível da fossa meio-paralombar. Após assepsia, realizar incisão da pele com bisturi e introduzir a agulha de biópsia hepática no sentido crânioventral^[100]. O procedimento pode ser realizado às cegas, porém o auxílio de um ultrassom para a localização hepática correta é importante para o sucesso do procedimento^[100].

2.4 Amostras para citologia

O exame citológico necessita de uma pequena quantidade de material. Proporciona um rápido diagnóstico, gerando um prognóstico precoce. É uma importante ferramenta para diferenciar processos inflamatórios agudos ou crônicos e neoplásicos benignos e malignos.

A coleta é realizada por punção aspirativa, esfoliação (raspagem), impressão ou esmagamento. Fixar as lâminas ao ar, conservar a temperatura ambiente e encaminhar ao laboratório em no máximo 48 horas. Se houver demora maior para o envio, fixar o material em álcool metílico ou etanol por 3 a 5 minutos^[118].

A impressão é realizada a partir de fragmentos de 1 a 2cm do tecido a ser analisado. Primeiro, deve-se fazer a impressão do tecido em papel-toalha, retirando o excesso de sangue e, posteriormente, em uma lâmina limpa. A técnica do esmagamento consiste em comprimir e espalhar entre duas lâminas uma amostra de 0,2cm do material a ser examinado, como em um esfregaço.

2.5 Amostras para exame bacteriológico

A coleta de material para exame bacteriológico pode ser realizada em animal vivo ou recentemente morto, devendo esta ser de forma mais asséptica possível. As amostras devem ser acondicionadas em recipientes estéreis e hermeticamente fechados e conservadas refrigeradas até chegarem ao laboratório, à temperatura entre 4 e 8°C.

Quando o tempo entre a coleta do material e a chegada ao local do exame for maior que 24 horas e a refrigeração não puder ser usada como meio de preservação, devem ser utilizados meios de transporte (Stuart ou de Amies), que fornecem condições mínimas para que os microrganismos suportem o transporte e cheguem viáveis ao laboratório^[72]. Amostras de animais recentemente tratados com antibióticos têm pouco valor no isolamento de bactérias.

- **Pus e Líquidos:** a amostragem é realizada utilizando agulhas e seringas descartáveis estéreis e, de preferência, posteriormente acondicionar o material em frascos estéreis. Atenção especial deve ser dada à coleta de conteúdo de abscessos, uma vez que na região central, normalmen-

te, não há presença de agentes viáveis, sendo aconselhável coletar conteúdo próximo às paredes do abscesso.

- **Secreções:** a coleta é feita através de suabes em contato com secreções ou superfícies suspeitas e de imediato devem ser acondicionados em recipientes estéreis.
- **Órgãos:** devem ser amostrados por meio de fragmentos de tecidos e colhidos com o auxílio de instrumentos estéreis em volume que permita a sua esterilização superficial (5 x 5 x 5cm ou 30 a 100g), em laboratório. O intestino é sempre acondicionado separadamente e deve ser coletado em segmentos com as extremidades amarradas para que o conteúdo permaneça intacto no seu interior^[12]. Os órgãos de eleição para isolamentos bacteriológicos são: baço, pulmão, fígado, rim e ossos longos, devendo cada amostra ser enviada em recipiente separado e identificado. Amostras de cérebro devem ser encaminhadas resfriadas, já que alguns dos patógenos que afetam o sistema nervoso não suportam o congelamento.

Esfregaço *ou impressão de tecidos e secreções em lâminas, para a realização de exame direto, pode ser uma alternativa à diagnose no caso de algumas bactérias*. É aconselhável obter amostras das bordas das lesões onde a multiplicação bacteriana é mais ativa.

2.6 Amostras para exame virológico

O diagnóstico viral na rotina da bovinocultura, normalmente, é gerado a partir de provas sorológicas, testes imunológicos e isolamento viral. Amostras de soro sanguíneo são indicadas normalmente para essas análises.

Para isolamento de vírus, devem ser destinadas apenas amostras em bom estado de conservação (coletadas de animais recentemente mortos) da forma mais asséptica possível. A amostra deve conter tecidos com lesões e os gânglios linfáticos que drenam a área afetada. As amostras clínicas devem chegar ao laboratório, de preferência, poucas horas após a colheita, sob refrigeração (4 a 8°C) ou imersas em solução aquosa de glicerina 50%^[40,72].

2.7 Colheita de sistema nervoso central (SNC)

Com auxílio de um cutelo ou uma serra retira-se a capa óssea e o cérebro é então exposto com a dura-máter intacta. Com auxílio de uma tesoura, seccione a foice do cérebro, o tentório do cerebelo e os nervos cranianos, retirando intacto o cérebro da cavidade craniana^[12,72]. Evite o manuseio excessivo do tecido nervoso durante o processo de remoção para evitar artefatos histológicos que prejudiquem o exame no laboratório.

O material para exames virológicos e bacteriológicos deve ser colhido antes da fixação do encéfalo. Por outro lado, o congelamento torna o encéfalo inadequado para o exame histológico. Normalmente, há necessidade de realização de exames microbiológicos, histológicos e provas biológicas, portanto diferentes amostras devem ser obtidas:

- **Colheita de amostras do SNC para exame microbiológico:** primeiramente separe cerebelo e tronco encefálico do restante do encéfalo. Assepticamente, retire uma amostra de cerebelo (uma fatia de cerca de 0,5cm), seccione transversalmente a medula espinhal cervical obtendo uma amostra de cerca de 2,5cm. Em relação ao tálamo, retira-se uma fatia de aproximadamente 1cm de espessura e a quarta amostra do SNC é a metade caudal de um dos hemisférios encefálicos. No caso de suspeita de raiva, incluir na amostragem o gânglio trigeminal^[12,118].
- Essas quatro amostras devem ser armazenadas em recipientes estéreis e hermeticamente fechados e remetidas refrigeradas entre 2 e 4°C. No entanto, se o tempo entre a coleta e a remessa

for maior que 24 horas, é aconselhável, para alguns agentes, congelar as amostras para a remessa, mas nunca fixá-las^[12].

• **Colheita de amostras do SNC para exame histopatológico:** o restante do encéfalo deve ser fixado em formalina tamponada a 10% (formalina a 10% pode também ser usada sem grandes prejuízos ao diagnóstico), remeter juntamente o gânglio do nervo trigêmeo e a hipófise. O volume do fixador deve ser, pelo menos, 10 vezes maior que o volume de tecido a ser fixado. O tempo mínimo de fixação de um encéfalo de bovino adulto é uma semana, variando com o tamanho do encéfalo. Para remeter ao laboratório, acomodar o material em recipiente não deformável e completamente preenchido por fixador, amortecendo, assim, os efeitos do movimento^[12].

2.8 Colheita de líquido cefalorraquidiano (LCR)

A amostra deve ser obtida assepticamente no espaço lombossacral com agulha de calibre 18 x 9mm e seringa estéril^[100]. O local da coleta deve ser previamente lavado com água e sabão, *tricotomizado* e feita a assepsia com álcool 70%. Um volume de 5ml deve ser coletado, tomando cuidado para não contaminar com sangue. A amostra deve ser enviada ao laboratório com urgência, pois no LCR há ausência de nutrientes, oferecendo reduzida viabilidade aos microorganismos^[118]. O LCR também pode ser utilizado para análise citológica, devendo a coleta ser realizada em tubos com anticoagulante^[100].

No caso de necropsia, ao retirar a cabeça, desfazendo a articulação atlantoccipital, a coleta pode ser realizada assepticamente antes de a dura-máter ser seccionada^[12].

2.9 Colheita de sangue

Por ocasião da necropsia para obtenção de soro, hematologia ou hemocultura, o sangue deve ser punctionado diretamente do coração, antes da abertura deste, com agulha e seringa estéreis (sem anticoagulante para bacteriologia e provas sorológicas, e com anticoagulante para isolamento virológico). Possível apenas em animal recém-morto.

• Sangue total

Em bovinos a amostra pode ser obtida por punção da veia jugular ou da veia coccígea média, utilizando um agulha de aço inoxidável de calibre 1,8 ou 2 x 4mm^[21]. O sangue deve fluir com facilidades e escorrer sobre as paredes do tubo contendo anticoagulante (assegurando que não ocorra produção de espuma e, consequentemente, hemólise). Recomenda-se usar tubos de 10ml, onde se cola 5 a 7ml de sangue, mantendo a proporção de 5mg de anticoagulante para cada 2,5ml de sangue. Inverte-se o tubo três a quatro vezes para homogeneizar e resfria-se o mais rápido possível. No transporte deve-se evitar a agitação^[21].

• Obtenção de soro

Deve-se realizar a coleta de sangue da mesma forma que a descrita no item anterior. Entretanto, neste caso, usar tubos sem anticoagulante, preenchendo não mais que 60% do tubo. As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente, em posição vertical, e não devem ser agitadas até a formação do coágulo (aproximadamente 30min) para que não ocorra hemólise. Separar o soro, descolando suavemente o coágulo da parede do tubo, evitando rompê-lo. Essa separação também pode ser realizada por centrifugação. O soro pode ser conservado refrigerado ou até congelado em caso de não ser remetido imediatamente ao laboratório^[21]. O soro sanguíneo contribui muito para o diagnóstico de enfermidades infecciosas, pois permite determinar a dinâmica de an-

ticorpos circulantes. Para isso, através de amostras pareadas de soro sanguíneo, coletados com intervalo de 15 a 30 dias, pode-se acompanhar a variação nos títulos de anticorpos ou *soroconvergência* para um determinado agente infeccioso^[18].

• Colheita de amostra para exame hemoparasitológico

Amostras de sangue para diagnósticos de hemoparasitas podem ser obtidas a partir de sítios de irrigação periféricos, como a ponta da orelha ou da cauda. Para obtenção do sangue, deve-se *tricotomizar* a região e realizar a punção do vaso de forma a produzir uma gota de sangue na superfície:

- a) Com uma gota prepara-se um esfregaço com aproximadamente 1cm de diâmetro, deixando secar à temperatura ambiente.
- b) Com outra gota prepara-se um fino esfregaço. Com auxílio de uma segunda lamina em inclinação de 45° desliza-se sobre a primeira, produzindo uma distribuição homogênea e fina. Deixa-se secar à temperatura ambiente. De preferência, fixar com álcool metílico^[40,72].
- c) Alternativamente, outra amostra de sangue com anticoagulante pode ser encaminhada juntamente com os esfregaços.

Quando da possibilidade de realizar uma necropsia, a melhor amostra a ser obtida é a impressão de vísceras. Deve-se coletar material para fazer impressão de órgãos internos, como fígado, baço, coração, rim e córtex cerebral. Se possível, amostrar todos esses órgão para ter maior segurança no diagnóstico^[21,40]. Em animais mortos, na impossibilidade de impressão de órgãos, podem-se realizar esfregaços de pequenos vasos do extremo distal de membros, ponta da orelha e da ponta da cauda^[21].

2.10 Raspado de pele

Para pesquisa de ectoparasitos, diagnósticos de bactérias ou fungos, deve-se fazer uma boa assepsia no pelo do animal utilizando álcool etílico 70% (não esfregar) devido à presença de microrganismos saprófitos que podem interferir no resultado do exame. Realizar tricotomia parcial, deixando os pelos com no máximo 0,5 a 1cm de comprimento. Em seguida, com uma lâmina de bisturi, realizar um raspado profundo na pele, até a rósea sanguínea, devendo ser realizado na periferia da área lesionada. As amostras devem ser armazenadas em frascos estéreis, placas de Petri bem vedadas ou entre lâminas limpas, que devem ser mantidas unidas^[118]. Não é necessário refrigeração^[44], exceto nos casos em que as amostras sejam destinadas ao exame bacteriológico.

2.11 Coleta de ectoparasitas

Amostras para identificação de gênero ou espécie de ectoparasitas devem ser preservadas em frascos com álcool etílico 70%^[40] ou glicerina^[44].

Quando se deseja enviar carapato para diagnóstico de resistência a produtos carrapaticidas, enviar aproximadamente 200 teleóginas (fêmeas grandes, repletas e ingurgitadas, prontas para a postura dos ovos) desprendidas, espontaneamente ou por tração manual cuidadosa, de bovinos parasitados que não tenham sido banhados com produto carrapaticida de contato há pelo menos 30 dias ou com produtos sistêmicos por no mínimo 45 dias^[21,48]. Para remeter as amostras, elas devem ser acomodadas em frascos de boca larga, colocando no fundo um algodão ligeiramente umedecido com água e fazer pequenas perfurações na tampa para permitir a aeração. Colocar os

frascos em caixas de papelão e encaminhar ao laboratório para que cheguem ao destino dentro de 24 a 48 horas após a coleta^[44,48].

2.12 Colheita de urina

A urina deve ser coletada no momento da micção. Para exame do sedimento e cultura, de preferência coletar através de cateterismo ou por cistocentese (durante a necropsia), assepticamente. Refrigerar imediatamente (4 a 8°C). Se a suspeita for leptospirose, alcalinizar a urina com bicarbonato de sódio para melhorar a preservação das leptospiras.

2.13 Colheita de amostras fecais

As amostras de fezes de bovinos devem ser coletadas diretamente da ampola retal ou imediatamente após defecação na porção central do bolo com uma espátula. Essa porção não deverá ser contaminada por material estranho a ela.

Para exame bacteriológico, coletar no mínimo 2g, acomodar em frasco estéril, conservar refrigerado e encaminhar ao laboratório no menor tempo possível^[118]. Para exame parasitológico, coletar de 10 a 20g de fezes. Se as amostras chegarem ao laboratório em até 2 a 4 horas, não necessitam de resfriamento; do contrário, podem ser conservadas a 4°C, sendo viáveis por até 2 meses^[44,57]. Essas amostras devem ser acondicionadas em sacos plásticos limpos, tendo-se o cuidado de retirar todo o ar e identificá-las^[44,72].

Quando o tempo entre a coleta e o exame for muito longo, ou na ausência de refrigeração, as amostras podem ser estocadas indefinidamente em formalina a 10% (uma parte de fezes e nove de formalina a 10%), porém algumas limitações podem ser observadas, como a redução na contagem de estrongilídeos (em 200 dias a redução é de 50%)^[44]. No caso de rebanho, recomenda-se a coleta de 10 a 15 amostras de cada faixa etária ou amostrar entre 5 e 10% da população^[40].

2.14 Amostras e amostragem para diagnóstico de aborto bovino de origem infecciosa

Diversas são as causas de aborto bovino. Estudo tem revelado que a maioria dos casos com causa determinada é ocasionada por agentes infecciosos^[24].

A porcentagem histórica de diagnóstico de causas de aborto bovino é muito baixa, principalmente dividido ao não envio de amostras necessárias e à coleta de material em condições não adequadas^[21]. A obtenção do sucesso no diagnóstico de aborto depende de alguns fatores, como: o envio de fetos abortados, juntamente com a placenta; a realização de necropsia, incluindo coleta adequada de materiais; e a execução de exames histopatológicos, microbiológicos, imuno-histoquímicos, sorológicos e micológicos^[24,102].

Os dados de anamnese são importantes para agrupar as causas patológicas em função do tipo de apresentação, da categoria afetada, do período de gestação (Tabela 1) e da possibilidade de relação com o sistema de manejo a que as fêmeas gestantes foram submetidas (introdução de animais ao rebanho, mudança de alimentação, tratamentos recentes, vacinações, entre outros)^[21]. Uma importante informação é o tamanho do feto abortado, pois determinados agentes infecciosos retardam o crescimento fetal (Tabela 2).

Tabela 1. Principais causas infecciosas de aborto em bovinos relacionadas com o provável período de interrupção da gestação.

Período de gestação	1º Trimestre			2º Trimestre			3º Trimestre			Período perinatal										
	Morte embrionária			Aborto			Morte perinatal													
Mês de gestação	1	2	3	4	5	6	7	8	9											
<i>Tritrichomonas foetus</i>																				
<i>Neospora caninum</i>																				
<i>Escherichia coli</i>																				
<i>Campylobacter fetus</i>																				
<i>Listeria monocytogenes</i>																				
Agente	<i>Leptospira interrogans</i>																			
	<i>Brucella abortus</i>																			
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>																				
<i>Virus da Diarreia Viral Bovina / BVD</i>																				
<i>Hepes Vírus Bovino / IBR</i>																				
<i>Língua Azul</i>																				
<i>Micotoxinas (<i>Aspergillus</i>, <i>Absidia</i>)</i>																				

Tabela 2. Estimação da idade gestacional de fetos bovinos.

Idade gestacional (meses)	Medida* (cm)
3	13 a 21
4	21 a 31
5	32 a 43
6	44 a 57
7	59 a 67
8	68 a 85
9	< 86

*Medida da nuca até a inserção da cauda.

Fonte: Barr (1990), apud Antoniassi (2007)^[24].

Considerando que o aborto muitas vezes pode ser um problema multifatorial, deve-se proceder à coleta de material sistematicamente, independentemente da suspeita inicial ou do diagnóstico presuntivo.

- **Soro:** devem-se colher amostras de soro pareadas das fêmeas que apresentaram aborto, sendo uma coleta no momento do aborto e outra 15 a 20 dias mais tarde. Isso é para avaliar a soroconversão para determinado microrganismo^[18,21].

- **Muco cervicovaginal:** após assepsia da vulva, procede-se à coleta, com pipeta ou com suave através de espéculo estéril, em ventres até 45 dias após o aborto. Acondicionar em frascos

estéreis e remeter sob refrigeração^[40]. Para maior segurança de isolamento, a amostra deve ser fractionada e remetida em diferentes meios, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Meios de transporte para isolamento de diferentes microrganismos.

Meio de transporte	Microorganismo a ser isolado
Amies	<i>Brucella, Haemophilus</i>
Stuart	Aerobios e <i>Listeria</i>
Cary Blair	<i>Campylobacter</i>
Sutherland mod.	<i>Trichomonas</i>
Hank's	Isolamento viral

Fonte: adaptado de Caspe (2009)^[21].

- **Feto:** deve ser conservado refrigerado em recipiente bem fechado e encaminhado ao laboratório o mais rápido possível em caixa isotérmica com gelo em abundância. O material não deve ser congelado devido ao risco de inativação de certos microrganismos^[21,40].
- **Necropsia fetal:** por ocasião de necropsia, raramente alterações macroscópicas são observadas, e normalmente a autólise fetal está presente^[40]. Na Tabela 4 são elencados os órgãos que devem ser coletados durante a necropsia e os respectivos exames a ser realizados, considerando o aborto como um problema multifatorial.

Tabela 4. Amostras necessárias para o diagnóstico de aborto bovino a partir da necropsia do feto abortado

Amostra	Conservação	Exames realizados
Pulmão, fígado e conteúdo do abomaso	Refrigerado	Cultivo aeróbio e cultivo anaeróbio de conteúdo do abomaso para <i>Brucella</i> sp.
Amostra de rim ou pulmão	Refrigerado	Imunofluorescência direta para <i>Leptospira</i> sp.
Soro fetal (cavidade torácica)	Refrigerado	Sorologia para <i>Leptospira</i> sp.; <i>Neospora caninum</i> ; vírus da diarreia viral bovina (BVDV)
Cérebro, fígado, rim, pulmão, coração, músculo esquelético, baço, timo, abomaso e placenta	Fixado em formalina	Histologia
Amostra de timo, pulmão ou pele (orelha)	Fixado em formalina	Imuno-histoquímica para BVDV
Amostra de fígado	Fixado em formalina	Imuno-histoquímica para IBR
Amostra de cérebro	Fixado em formalina	Imuno-histoquímica <i>Neospora caninum</i>

Fonte: Adaptado de Antoniassi et al. (2007)^[24].

2.15 Colheita de amostras clínicas para exame toxicológico

Quando há suspeita de intoxicação, coletar no mínimo 100 gramas das seguintes amostras, remetendo-as resfriadas ou congeladas no interior de sacos plásticos ou frascos limpos:

- a) Conteúdo ruminal e intestinal.

- b) Fígado, baço, coração, pulmões, rins, cérebro, medula, músculos e sangue (5ml) com anticoagulante.
- c) 50ml de urina.
- d) Grãos ou feno, utilizados na alimentação.

As amostras não devem ser lavadas para evitar perda de substâncias ou contaminação. Suspeitas das substâncias químicas responsáveis pela intoxicação ou pelo envenenamento devem ser relatadas^[40].

2.16 Colheita de amostras clínicas para exame micotoxicológico:

O processo de amostragem é importante para que se tenha representatividade do lote. Portanto, procede-se à coleta da amostra de grãos ou ração segundo as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa).

a) Rações e grãos ensacados: deve-se coletar em diferentes alturas da pilha e em diferentes locais do depósito através de calagem; 30g de cada saco para se fazer uma amostra média que represente 10% do lote, homogeneizá-la e enviar 1kg da amostra ao laboratório^[40].

b) Grãos e ração a granel: coletar alíquotas que formem uma amostra média de 40kg para cada 500t, homogeneizar e enviar 1kg da amostra ao laboratório^[40].

2.17 Coleta de material para exame botânico

No caso de suspeita de intoxicações por plantas tóxicas, pesquisar no conteúdo gastrintestinal por partes não digeridas e sementes de plantas. Procurar no pasto ou em ambientes em geral plantas suspeitas. No caso de plantas de pequeno porte, retirar toda a planta (raiz, caule, folhas, flores e frutos). Das plantas de porte maior colher ramos de 20 a 30cm com folhas, frutos, flores e sementes. Desidratar e prensar o material em folhas de jornal sob peso (pilhas de livros) por dois dias e trocando-o cinco a seis vezes. Enviar as amostras secas em jornal recoberto com papelão grosso^[118].

2.18 Colheita de amostras de leite cru

2.18.1 Amostra de leite para exame bacteriológico ou micológico

Os elevados custos relativos ao tratamento das mastites aumentam a necessidade de segurança e eficiência no diagnóstico. A ineficiência de tratamentos e a promoção da resistência bacteriana podem incorrer em altos prejuízos.

Primeiramente, selecionar os animais e quartos mamários positivos através do Califórnia Mastitis Test (CMT). Não realizar coleta de animais submetidos ao tratamento com antimicrobiano por um período mínimo de 10 dias após o término do tratamento. A amostra deve ser acondicionada em frascos estéreis de boca estreita (5mm) e tampa com vedação e rosca. Os cuidados na coleta são de extrema importância para evitar a contaminação das amostras.

O responsável pela coleta deve lavar e desinfetar as mãos, preparar as tetas, limpando-as com solução desinfetante (iodofor 1%, hipoclorito de sódio 4%), aguardar 30 segundos e secá-las com papel-toalha, iniciando pelas mais distantes do coletador. Antes de proceder à coleta, limpar a extremidade da teta utilizando-se de algodão embebido em álcool 70%. Desprezar os três primeiros jatos de leite de cada teta. Abrir o frasco apenas no momento da coleta, evitando contato

com sua superfície interna, mantendo-o em ângulo de 45°. Coletar de 5 a 10ml de leite e fechar o recipiente imediatamente após a coleta. Coletar cada quarto mamário individualmente, iniciando sempre pelos mais próximos do coletador. A correta identificação da amostra, constando número do animal e quarto coletado, é importante.

As amostras devem ser imediatamente refrigeradas. Se chegarem ao laboratório em até 24 horas, são mantidas resfriadas (4°C), sendo encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo; do contrário, devem ser congeladas para manterem-se viáveis por mais tempo.

2.18.2 Colheita de amostras de leite para análise de qualidade: contagem de células somáticas (CCS) e contagem de bactérias totais (CBT)

As amostras devem ser representativas do volume total do leite que se pretende examinar, podendo ser de milhares de litros, no caso de tanques de refrigeração. Essa representatividade se torna ainda mais importante quando se pensa em programas de pagamento por qualidade, em que o resultado da análise vai influenciar no pagamento do leite, pelas indústrias, aos produtores. Por isso, alguns cuidados devem ser observados.

Além da obrigatoriedade de a amostra ser representativa, existem outros fatores que podem interferir nos resultados das análises. Um deles é a facilidade de contaminação do leite seguida da multiplicação dos microrganismos em números suficientes para causar sua deterioração em poucas horas ou minutos. A contaminação do leite é propiciada tanto pelas condições inadequadas de obtenção, armazenamento, coleta e transporte, quanto por suas propriedades nutritivas, que são ideais para a multiplicação microbiana^[19].

As amostras de leite devem ser coletadas após uma boa homogeneização, em recipientes apropriados e limpos, e enviadas ao laboratório sob refrigeração. No ato da coleta deve-se tomar cuidado com o manuseio dos conservantes usados, evitando a contaminação do leite total.

a) Material básico para a realização da coleta de leite

- **Frascos:** devem ser de plástico, com tampas rosqueáveis, para evitar tanto o vazamento do líquido quanto a contaminação do leite com água, poeira ou qualquer outro produto. Os frascos de amostragem são fornecidos pelo laboratório, no tamanho e formato requeridos pelos equipamentos, para facilitar e agilizar a rotina do laboratório, e são acondicionados em caixas de papelão, específicas para o transporte^[19].

Tratando-se de CCS, podem ser utilizados frascos reutilizados, nos quais se deposita o conservante. No entanto, para CTB é necessária a utilização de frascos estéreis e o conservante é enviado num frasco com conta-gotas, para ser pingado após a coleta.

Os frascos usados para a coleta de amostras de leite devem ser abertos somente no momento da coleta, sendo fechados imediatamente após. Evita-se, assim, o contato com o conservante e uma possível contaminação da amostra. Frascos não utilizados devem ser devolvidos ao laboratório.

- **Conservantes:** são usados para preservar ou conservar as amostras de leite inalteradas por um período maior de tempo^[36]. Possibilitam maior intervalo entre a coleta e a análise pelo laboratório. Existem vários tipos que podem ser usados desde que não interfiram nos testes físicos ou químicos^[19]. No manuseio dos conservantes devem ser usadas luvas de látex (cirúrgicas), pois são substâncias tóxicas. Portanto, cuidados extremos devem ser tomados, evitando o contato deles com o leite de consumo.

Os conservantes reconhecidos pela International Dairy Federation (Federação Internacional de Laticínios – FIL) são: ácido bórico, dicromato de potássio, Bronopolâ (2-bromo-2-nitro-

propano-1, 3-diol) e azida sódica^[19]. O ideal é que as análises sejam realizadas obedecendo ao prazo máximo de cinco dias, dando-se preferência ao exame entre 48 e 72 horas após a coleta^[19].

b) Procedimentos para coleta do leite

A coleta de amostras requer uma agitação adequada e eficiente do leite total, evitando amostras não representativas por homogeneização deficiente, pois o leite, quando permanece por um longo tempo sem sofrer agitação, forma uma camada ou “placa” de gordura na sua superfície. Isso se deve à tendência dos glóbulos de gordura de subir (por serem mais leves); eles atraem bactérias e células somáticas, levando-as consigo. Portanto, o leite da camada superior contém mais bactérias, mais células somáticas e mais gordura do que o leite da parte inferior.

• Coleta de amostras de leite do tanque de refrigeração

Deve-se ligar o sistema de agitação do tanque por no mínimo cinco minutos imediatamente antes da coleta da amostra. Quando a capacidade do tanque for de mais de 5.700 litros, o tempo de agitação deve ser aumentado para 10 minutos^[19]. Coletar aproximadamente um litro de leite pela torneira de esgotamento do tanque. Usar um coletador (concha de inox) para transferir o leite para o frasco. Nunca ultrapassar três quartos (3/4) do frasco com leite (permitindo, assim, a mistura do leite com o conservante). Deixar o frasco em repouso durante 5 minutos e homogeneizar o leite para que o conservante se distribua uniformemente.

A amostra destinada à CBT deve seguir o mesmo processo, utilizando frascos estéreis e com o máximo de assepsia. Após a coleta do leite, pingar duas gotas do conservante e homogeneizar. Colocar a amostra de leite imediatamente em uma caixa isotérmica com gelo e enviar o mais rápido possível ao laboratório. É importante ressaltar a não utilização do frasco de amostragem para retirar amostra do leite total, pois accidentalmente pode contaminá-lo com o conservante, que é tóxico.

• Coleta de amostras de leite de latões ou tarros

Agitar o leite de cada latão usando um agitador manual (agitador de latão) por aproximadamente 7 segundos. Para isso, deve-se misturar o leite das camadas superiores com o das camadas inferiores pelo menos sete vezes.

No caso de existirem vários latões, transferir quantidades de leite proporcionais de cada latão para outro recipiente e deste retirar a amostra. Assim se obtém uma amostra da composição média de várias ordenhas. Evitar que uma amostra de um único tarro, não representativo, seja usada para avaliar a composição e a qualidade do leite do referido produtor^[36]. Os procedimentos seguintes são idênticos aos citados para a coleta em tanques de resfriamento.

• Coleta de leite diretamente do úbere do animal

Os cuidados para a coleta de amostras de animais devem ser os mesmos seguidos para a coleta do leite total do rebanho. No caso de rebanhos submetidos ao controle leiteiro, normalmente a coleta é feita a partir de uma amostra da produção diária de leite de cada animal, sendo esse o procedimento ideal. É necessário homogeneizar o leite ao final de cada ordenha. Quando o sistema adotado for de duas ordenhas diárias, devem-se coletar, no mesmo frasco, dois terços (2/3) na ordenha da manhã e um terço (1/3) na ordenha da tarde. No caso de três ordenhas, coleta-se um terço a cada ordenha.

Em ordenha manual, a homogeneização deve ser feita com a ajuda de outro recipiente (tipo balde), vertendo-se o conteúdo de um recipiente para o outro sete vezes pelo menos, para garantir a mistura adequada do leite produzido.

Na ordenha mecânica, há casos em que existe um coletador automático que retira a amostra de forma homogênea. Deve-se realizar a coleta após a homogeneização dessa amostra por aproximadamente 5 segundos. Quando o leite é armazenado em balões volumétricos, deve-se retirar o volume necessário de leite do balão após a homogeneização por 7 a 10 segundos. Quando o equipamento é do tipo “balde ao pé”, a homogeneização deve ser feita com a ajuda de outro recipiente (tipo balde), vertendo-se o conteúdo de um recipiente para o outro sete vezes pelo menos, para garantir a mistura adequada do leite.

Dependendo do equipamento de ordenha e do manejo adotado na fazenda, não há como separar o leite de cada animal. Nesse caso, recomenda-se: obter a amostra de leite da ordenha total (pela manhã, por exemplo), ou obter a amostra no início da ordenha (após a eliminação dos primeiros jatos de leite). Essa fração do leite representa razoavelmente o volume total do leite do animal. O mesmo não acontece com amostras de leite obtidas ao final ou no meio da ordenha.

3. COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM CANINOS

3.1 Colheita de amostras por ocasião da necropsia

Na ocasião da necropsia, o material colhido deverá ser identificado com lápis ou outro meio que não borre, no caso de umedecimento acidental do rótulo, deixando-se claro na embalagem externa o indicativo de material biológico com possível contaminação. Para colheita, armazenamento e remessa das amostras (frascos, plásticos e outros), deve-se sempre utilizar embalagens limpas e secas. O vazamento e a consequente perda de material e inutilização do laudo e da identificação devem ser prevenidos pelo uso da vedação e do lacre do recipiente com fita adesiva e outros materiais, como *parafilm*. Todas as amostras deverão ser colhidas no menor espaço de tempo após o óbito do animal, evitando-se, assim, que a autólise comprometa a qualidade dos tecidos colhidos para o diagnóstico.

O material da necropsia pode ser colhido para histopatologia, citologia, imuno-histoquímica, microscopia eletrônica, microbiologia, parasitologia, sorologia, toxicologia, hematologia, urinanalise, identificação de células e sedimentos e diagnóstico molecular.

Durante a necropsia retirar três ou mais fragmentos da lesão (na área de transição) de 0,5 a 1 cm de espessura e acondicioná-los em frasco de boca larga em formol tamponado neutro 10%. No caso de órgãos tubulares, retirar um fragmento que inclua a circunferência completa, um anel, de amostra. Deve-se tomar cuidado para não comprimir ou esmagar o tecido. Nas biópsias por excisão (exérese de toda a lesão) de neoplasias cutâneas devem-se incluir margens de segurança com no mínimo 0,2cm na biópsia para permitir a correta secção dos fragmentos e avaliação adequada das margens da lesão, particularmente quanto há *invasividade* da neoplasia.

Existe uma confusão frequente entre aldeído fórmico (ou formaldeído) e formalina comercial (ou formol). Formaldeído é um gás com o qual se prepara uma solução aquosa 35 a 40%. Essa solução constitui a formalina comum. O termo ‘formalina’ refere-se, portanto, à apresentação comercial da solução de formaldeído. Assim, formol (ou formalina) a 10% representa uma solução preparada misturando-se 10ml de formalina comercial (formaldeído 35 a 40%) com 90ml de água. O formol tamponado fornece uma fixação com resultados melhores, mas não é essencial para a histopatologia, tendo seu uso recomendado para técnicas específicas, como a imuno-histoquímica.

As doenças do sistema nervoso central (SNC) frequentemente não apresentam lesões óbvias na necropsia. Por esse motivo, o histórico clínico e a colheita adequada de amostras para exames complementares se tornam imprescindíveis. Se o material for destinado ao exame histológico, é extremamente importante que o tecido nervoso ainda não fixado seja manuseado o mínimo possível. Para histopatologia, todo o encéfalo deverá ser imerso em formol, e a secção para obtenção de fragmentos realizada 24 horas após a fixação inicial. No entanto, o material para exames virológicos e bacteriológicos deve ser colhido antes da fixação do encéfalo no formol, podendo ser refrigerado ou congelado, dependendo da suspeita. Por outro lado, o congelamento torna o encéfalo inadequado para o exame histológico. Como em muitos casos se necessita da realização dos três tipos de exames (histopatológico, virológico e bacteriológico), um meio termo deve ser alcançado. Para bacteriologia e virologia deve-se resfriar ou congelar as amostras: porção de 0,5cm de espessura do cerebelo, 2,5cm da medula cervical, 1cm do tálamo, metade caudal de um dos hemisférios telencefálicos. Para raiva, também adicionar o gânglio trigêmeo. Para diagnóstico de raiva (imunofluorescência e prova biológica), o material a ser enviado deverá ser refrigerado, acondicionado em frasco com tampa ou dupla embalagem plástica, hermeticamente fechado e colocado em caixa isotérmica contendo gelo reciclável para manter a temperatura em 2 a 4°C.

O exame citológico apresenta como característica principal a rapidez do diagnóstico quando comparado ao exame histopatológico e por necessitar de pequena quantidade de material. Sua desvantagem é não permitir a visualização da arquitetura do órgão e, portanto, deve ser considerada uma tentativa de antecipar o diagnóstico. É indicada particularmente para diferenciar processos inflamatórios agudos ou crônicos e neoplásicos benignos e malignos. Deve-se, ainda, utilizar sempre lâminas limpas e desengorduradas em álcool comum. Após a colheita do material, as lâminas devem ser fixadas ao ar, conservadas em temperatura ambiente, identificadas em adesivo ou esparadrapo e enviadas ao laboratório em no máximo 48 horas juntamente com as informações relacionadas. Se houver demora maior para o envio dos materiais colhidos, deve-se fixar o material em álcool metílico ou metanol por 3 a 5 minutos. Métodos de colheita: punção aspirativa, impressões (*claps* ou *imprints*) e esmagamento (*squash*). Para *imprints*, colher um fragmento de 1 a 2cm do órgão ou nódulo a ser examinado, fazer várias impressões preliminares sobre um papel toalha para retirar o excesso de sangue e em seguida fazer a impressão sobre a lâmina^[11,65,71,125].

3.2 Colheita de sangue para soro

Para a colheita de sangue venoso periférico em cães, inicialmente deve-se conter o animal adequadamente, proporcionando-se o mínimo de estresse para que se obtenha um resultado hematológico representativo.

Após a assepsia, introduzir a agulha percutaneamente através da veia distendida por prévio garrote manual abaixo do ponto de colheita. A colheita pela veia jugular é a mais adequada para análises hematológicas em cães. Deve-se conectar seringa descartável graduada e colher lentamente o sangue correspondente à quantidade de anticoagulante contido no frasco de acondicionamento. Após completar o volume desejado, retirar a seringa. Desfazer o garrote antes de remover a agulha e comprimir manualmente o local de punção com algodão embebido em álcool iodado.

Para a obtenção de sangue total, o sangue colhido deve ser transferido da seringa, com suave compressão do êmbolo para evitar hemólise, para dentro de vidro estéril contendo anticoagulante.

a) Anticoagulantes mais frequentemente utilizados

• **EDTA (etilenodiaminotetracético):** este anticoagulante é o mais indicado ao estudo da morfologia sanguínea e deve ser utilizado diluído a 10% na proporção de 0,1ml para cada 5ml de sangue. É recomendado para a rotina hematológica (hemograma completo, fibrinogênio e contagem de plaquetas) porque não interfere na morfologia celular, preservando-a por até 24 horas quando refrigerado adequadamente. Utilizar o EDTA na concentração de 2mg/ml de sangue. O EDTA reage através de seus dois radicais ácidos com cálcio plasmático, formando um quelato com os elementos alcalino-terrosos, tornando-se insolúvel.

• **Fluoreto de sódio:** outro anticoagulante, quelante de cálcio, que forma sais insolúveis. Como este anticoagulante impede a glicólise sanguínea, realizada *in vitro* principalmente pelos eritrócitos, é indicado para determinação da glicose.

• **Heparina:** possui uma atividade como inibidor da trombina e tromboplastina. Como interfere na coloração do esfregaço sanguíneo, não é recomendada para hemograma^[26,67]. A diluição é de 0,1ml de solução a 1% para não coagular 5ml de sangue. A heparina retarda a coagulação do sangue por apenas 8 horas.

• **Citrato de sódio:** é um anticoagulante, quelante de cálcio, que forma sais insolúveis, sendo utilizado para provas de coagulação (tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada). Seu emprego se faz em soluções 1,34g%, na proporção de 10%, ou seja, 0,5ml para 4,5ml de sangue^[59].

b) Preparo de esfregaços e colorações

Duas lâminas novas e desengorduradas devem ser previamente preparadas, uma delas com os cantos arredondados. Homogeneizar o sangue no frasco de colheita com anticoagulante fechado, por inversão, e, com auxílio do capilar de micro-hematórito, antes de fechá-lo, descarte uma gota de sangue na lâmina. Coloque a segunda lâmina (com os cantos arredondados) à frente da gota de sangue, num ângulo de 45°, conforme a ilustração na Figura 2-A. Após fazer um leve movimento para trás, até o sangue espalhar-se lateralmente na lâmina (Figura 2-B), deslizar a lâmina com um movimento uniforme e ininterrupto para a frente (Figura 2-C). O sangue se estenderá por sobre a lâmina, formando um esfregaço (Figura 2). Agitar a lâmina até o esfregaço secar completamente e identificá-lo com lápis na borda mais espessa^[26,67].

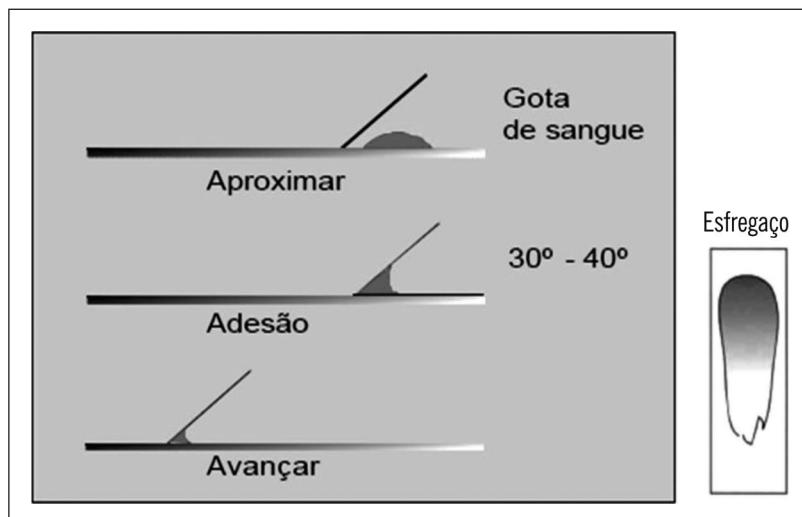


Figura 2. Desenho esquemático da preparação de um esfregaço de sangue.

Fonte: Adaptado de Lopes, (2002)^[5].

3.3 Métodos de colheita de urina para análise em laboratório

- **Micção natural**

A amostra de urina pode ser obtida no momento da micção natural por meio de recipiente posicionado oportunamente. É uma técnica de difícil manejo em cães pela dificuldade de colher uma quantidade adequada para análise. A micção pode ser estimulada realizando-se um breve passeio com o animal. Devem-se desprezar os primeiros jatos de urina, por conter muitos contaminantes do trato urinário inferior, que podem interferir nos resultados finais da urinanálise^[93,59].

- **Cateterismo**

A amostra de urina pode ser obtida por cateterismo vesical, utilizando-se sondas apropriadas para o sexo e tamanho do animal. Este procedimento é indicado quando há necessidade rápida de colheita, ou quando terapêutico, como em urolitíases ou cirurgias. Deve-se tomar cuidado para evitar contaminação com substâncias que possam interferir na urinanálise, a exemplo das substâncias lubrificantes, bem como evitar a traumatização da uretra^[26,77].

- **Cistocentese**

A cistocentese¹ se constitui na técnica de colheita de urina mais adequada para animais de pequeno porte pela facilidade, baixo custo e confiabilidade no resultado do exame. Ela é especificamente indicada para obtenção de amostras destinadas à cultura bacteriana e ao antibiograma. A cistocentese só é praticável quando a bexiga estiver com volume de urina suficiente, permitindo sua palpação e punção sem riscos de injúrias à bexiga nem às estruturas adjacentes. Este método de colheita deve ser realizado com auxílio de uma seringa de 10 ou 20ml e agulha hipodérmica 25 x 7 ou 30 x 8, precedido de tricotomia e antisepsia local^[39,59].

Independentemente do método de colheita, a urina deve ser colhida em recipiente limpo, podendo ser de vidro ou de plástico. Se a amostra de urina não for analisada imediatamente após a colheita, os frascos escuros são preferíveis, pois a luz solar pode causar a degradação de certos constituintes da urina, tais como bilirrubina e urobilinogênio, em menos de uma hora. A cateterização em recipientes estéreis é obrigatória quando a amostra de urina se destina à cultura e ao antibiograma. A primeira urina da manhã é preferível, pois provavelmente contém os elementos de significado diagnóstico, enquanto a ingestão de líquidos durante o dia dilui a urina^[37,39].

3.4 Colheita de medula óssea para mielograma e biopsia

O mielograma é o exame direto das células da medula óssea. Ele permite verificar se a produção do sangue é normal ou não, se o aspecto das células é normal ou doente e se há presença de células malignas. Em princípio, o mielograma é realizado após o achado de alguma alteração no hemograma.

O mielograma é indispensável, por exemplo, para diagnóstico e classificação das leucemias agudas. Nesse caso, um grande número de células tumorais, chamadas blastos, é encontrado no interior da medula óssea. Como a medula óssea está localizada anatomicamente no interior dos ossos, a colheita de material para a realização de um mielograma é realizada pela punção da medula óssea, seguida de aspiração, sendo realizada sob anestesia geral em cães. Os ossos mais abordados são o ilíaco, o fêmural e a tibia (este último em cães obesos).

¹ Nota do revisor: Termo ainda não dicionarizado, mas de largo uso na medicina veterinária.

Outro exame que complementa a avaliação da medula óssea é a biópsia de medula (BMO), realizada com técnica semelhante. O BMO é um exame complementar ao mielograma. Em comparação ao mielograma, que consiste no exame direto das células, a biópsia de medula óssea permite avaliar também sua estrutura, pois ela é feita a partir de um fragmento compacto de osso. Pela biópsia pode-se detectar a presença de fibrose e focos de infecção, por exemplo, além de avaliar a quantidade de gordura presente dentro da medula óssea, o aspecto do osso e dos vasos sanguíneos.

O exame da medula óssea é de grande importância para o diagnóstico (análise das células) e para a avaliação da resposta ao tratamento, indicando se, morfologicamente, essas células leucêmicas foram erradicadas da medula óssea (remissão completa medular). Esse exame é realizado sob anestesia geral em cães e consiste na aspiração da medula óssea seguida da confecção de esfregaços em lâminas de vidro para exame ao microscópio. A avaliação da medula óssea é indicada quando são descobertas anormalidades no sangue periférico. As anormalidades mais comuns em que o exame é indicado são: neutropenia persistente, trombocitopenia, leucocitose, morfologia anormal de células sanguíneas, presença inexplicável de células imaturas no sangue, anemia regenerativa, ou ainda uma combinação dessas patologias. O exame de medula óssea também pode ser usado para determinar a causa de uma hiperproteinemia, quando acontece secundariamente ao mieloma múltiplo, linfoma, leishmaniose, brucelose, erliquiose e doenças sistêmicas de origem fúngica, entre outras. Também pode revelar a causa de uma hipercalcemia quando associada com neoplasmas e ainda diagnósticos de lesões ósseas^[90,92].

3.4.1 Técnica de colheita de medula óssea para mielograma ou biópsia

Para o procedimento de colheita para mielograma ou biópsia da medula óssea de cães, o animal deverá sofrer anestesia geral de maneira segura. O pré-operatório deverá constar de jejum alimentar de 12 horas e hídrico de seis horas, com posterior anestesia geral. Após todos os procedimentos para cirurgia asséptica, o cão anestesiado e previamente *tricotomizado* deverá ser mantido em decúbito lateral, se a colheita for realizada em osso femoral ou tibial, ou em decúbito ventral, se a escolha for o osso da crista ilíaca. As amostras podem ser obtidas por punção rotacional e aspiração com o auxílio de uma agulha anatômica do tipo Steis, Rosenthal ou Jamshidi. O local da punção com maior facilidade de introdução da agulha é a fossa trocantérica femoral (Figura 3) devido à facilidade de acesso anatômico e à quantidade de medula presente no fêmur. As amostras são colhidas com auxílio de seringas de 10ml previamente *heparinizadas* (heparina 10.000 UI) e pode ser colhida uma quantidade de 12 a 20ml de medula. Para penetrar no espaço medular dos ossos deve ser aplicada uma pressão manual moderada à agulha, girado-a e alternando os movimentos para direita e esquerda.

Se o exame for biópsia, deve-se escolher uma agulha de maior calibre, sendo a Jamshidi a agulha de escolha. A amostra colhida de medula para citologia deve ser encaminhada ao laboratório na mesma seringa utilizada para colheita, previamente *heparinizada*, em temperatura ambiente ou, ainda, pode-se confeccionar as lâminas para serem analisadas. Uma gota da amostra deverá ser estendida sobre uma lâmina e seca antes de ser enviada ao laboratório. A extensão será feita disposta a amostra sobre a extremidade de uma lâmina seca e limpa, colocando-se outra lâmina sobre o material, no sentido transversal e em seguida estendendo até a extremidade seguinte (Figura 4). No mínimo duas lâminas deverão ser enviadas para cada amostra de seringa. As lâminas deverão ser protegidas e enviadas em temperatura ambiente^[90,91,122].

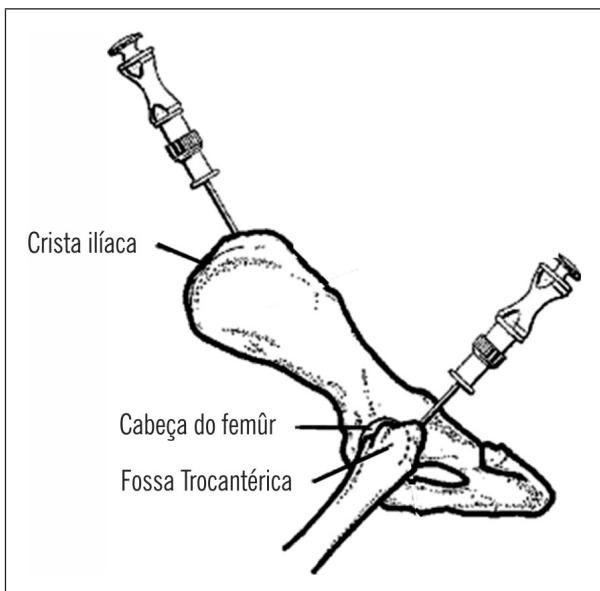


Figura 3. Ilustração demonstrativa de introdução de agulha Rosenthal na fossa trocantérica femoral e na crista ilíaca.

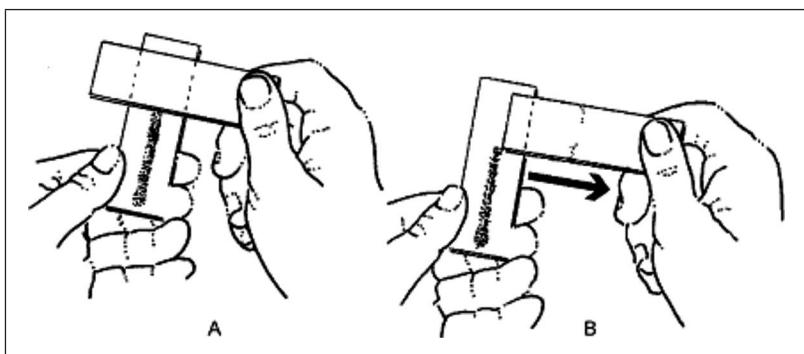


Figura 4. Ilustração do método de confecção de lâminas de sangue e medula óssea para análise citológica.

3.5 Raspado de pele

Para pesquisa de ectoparasitos e fungos deve-se fazer uma boa assepsia no pelo do animal utilizando álcool 70° (não esfregar) devido à presença de microrganismos saprófitos que podem interferir no resultado do exame. Para a colheita de material de pele em animais de pelo longo deve-se realizar uma tricotomia parcial, deixando o pelo com no máximo 0,5 a 1cm de comprimento^[80]. Devem-se incluir na amostra pelos partidos associados às lesões e pelos íntegros retirados do centro dos folículos com pinça hemostática.

O raspado de pele deve ser profundo e realizado na periferia da área lesionada quando esta for descamativa. Quando a suspeita é de sarna demodécica, deve-se comprimir fortemente a pele com os dedos para remover com a amostra os ácaros que se localizam profundamente na pele. No caso de micose, arrancar pelos da periferia da lesão junto com o raspado. As amostras devem ser obtidas de raspados de diversas lesões, aleatórias, utilizando lâmina de bisturi estéril.

As amostras podem ser armazenadas em frascos ou placas de Petri bem vedados ou em lâmina limpa^[107]. A lâmina deve ser coberta por outra lâmina fixando as duas com esparadrapo ou fita adesiva. Muitos dos métodos diagnósticos de patologias de pele podem ser realizados na própria clínica; outros devem ser encaminhados para laboratório^[75].

O exame parasitológico do raspado de pele visa descartar ou confirmar casos de demodície ou escabiose e sempre deve ser realizado na primeira observação da lesão. Para isso, seleciona-se uma área lesionada da pele e pressiona-se entre os dedos indicador e polegar o tecido cutâneo lesado, escarificando a região com bisturi até que ocorra extravasamento sanguíneo. Em seguida, o material deve ser delicadamente colocado em lâmina de vidro, com algumas gotas de óleo mineral ou solução de cloreto de potássio, cobrindo-se com lamínula e levando-o ao microscópio óptico (lentes a 10x ou 40x) para proceder à leitura e à análise^[80]. A leitura da lâmina deve ser feita em todas as suas áreas, com movimentos ordenados. Em suspeitas de escabiose deve-se colher material da borda do pavilhão auricular, das articulações úmero-rádio-ulna e das articulações tarso-tíbia-fíbula (pesquisa para sarna sarcóptica), além da cabeça, face e orelhas (na pesquisa para sarna notoédrica)^[96].

Os exames parasitológicos de cerúmen podem e devem ser realizados em animais com sintomas de otites parasitárias. Nesse caso, deve-se colher com o auxílio de otoscópio e curetas, transferindo à lâmina de vidro.

O método citológico é útil para distinguir infecções (bacterianas ou *leveduriformes*) e avaliar o tipo celular predominante das lesões encontradas, seja em pele, seja em canais auditivos. É um exame simples, rápido e com informações bastante importantes para o plano diagnóstico^[53]. Há várias maneiras de obter o material a ser visualizado: com um cotonete previamente friccionado na pele (ou conduto) e rolado em lâmina; com fita dupla face aplicada na pele e transferido para uma lâmina; em raspados superficiais com bisturi e posteriormente transferido para uma lâmina de vidro^[75]. Independentemente do método de colheita, as lâminas são coradas e secas ao ar ou ao fogo e lidas em microscópio com lentes de imersão. Podem ser facilmente identificados microrganismos como *Malassezia* spp., bactérias e células dérmicas ou inflamatórias, orientando a terapia das infecções de pele e anexos.

Para análise de leishmaniose, realiza-se o raspado de pele no local lesado e também em área íntegra com o auxílio de lâminas de bisturi^[3]. Do material obtido, realizam-se esfregaços em lâminas de vidro para microscopia que, depois de secas, devem ser submetidas ao método de coloração rápida (*panótico*) e examinados em microscópio óptico com objetiva de imersão^[53,75].

3.6 Colheita de líquido cefalorraquidiano (LCR)

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é produzido nos ventrículos cerebrais e circula no sistema nervoso central (SNC) e parte do sistema nervoso periférico^[1]. Este possui funções de proteção, nutrição e promoção da defesa do sistema nervoso, transportando e promovendo o encontro de agentes etiológicos com células e moléculas de defesa. Os constituintes do liquor podem refletir tanto situações de normalidade quanto patológicas, visto que sua composição varia diretamente nestas diferentes situações^[13].

A colheita e a análise do LCR demonstram ser meios viáveis e eficazes de acesso e avaliação do sistema nervoso no que diz respeito ao diagnóstico e ao prognóstico de inúmeras enfermidades. É possível, ainda, aplicar ao LCR alguns dos inúmeros testes sanguíneos e de outros fluidos biológicos obtendo-se informações importantes e de grande valor diagnóstico. Entre esses testes destacam-se coloração, aspecto, pH, densidade, níveis de glicose, proteínas totais e *celularidade*. A colheita do liquor deve ser realizada em meio ambulatorial ou cirúrgico, com material asséptico, e o animal sob anestesia geral^[104].

O LCR deve ser obtido por punção da cisterna magna com o auxílio de agulhas apropriadas (25 x 8), sendo transferido em seguida para frascos de vidro. O aspecto e a cor do liquor são avaliados comparando-se o tubo contendo a amostra com outro tubo de água destilada, ambos contra

uma superfície de cor branca com letras impressas^[121]. A densidade deve ser obtida por refratometria, e os valores de pH são determinados mediante uso de tiras indicadoras de pH. As contagens globais de células são realizadas em câmaras de Neubauer. As amostras podem ser conservadas a diferentes temperaturas (25°C, 4°C e -4°C) e por diferentes períodos de tempo (logo após a colheita, 24 horas, 48 horas, uma semana e um mês)^[49].

O exame do LCR é muito importante para o isolamento de microrganismos quando colhido assepticamente também no espaço lombossacral com agulha de 6 a 8cm. O local da colheita deve ser previamente lavado com água e sabão e deve ser feita a assepsia com álcool 70%. Um volume de 5ml deve ser colhido. Pela ausência de nutrientes, os microrganismos permanecem viáveis por pouco tempo no liquor. Por esse motivo, a amostra deve ser enviada ao laboratório com urgência. Citologia pode também ser realizada com liquor^[13].

3.7 Colheita de fezes

Os cães domésticos representam os animais de estimação que mais convivem com o homem, prestando valioso auxílio como companhia e guarda. Todavia, quando portadores de parasitos, esses animais representam risco de contaminação, principalmente para crianças^[89,105].

O estudo epidemiológico das afecções parasitárias em animais é importante em saúde pública e na clínica veterinária^[78]. Os parasitas dos gêneros *Toxocara* e *Ancylostoma*, responsáveis pela transmissão da larva migrans visceral (LMV) e da larva migrans cutânea (LMC), infectam pessoas, causando lesões em seus diferentes órgãos. Larvas migrans viscerais de *Trichuris vulpis*, outro parasita de cães, foram reportadas também em seres humanos. O homem pode contaminar-se pelo contato direto com o cão, a água ou alimentos contendo ovos ou cistos de parasitas, por penetração ativa das larvas de *Ancylostoma* sp. pela pele^[9,68], afecções entéricas provocadas por formas adultas de *Ancylostoma caninum*^[70] e, ainda, pela ingestão accidental de ovos larvados desses parasitas presentes no solo (geofagia), em fômites ou nas mãos^[10].

Para avaliar a presença de endoparasitas em cães, colhem-se fezes (em torno de 20g) e encaminha-se ao laboratório para análises. As fezes devem ser colhidas diretamente do reto ou imediatamente após defecação^[9]. As amostras de fezes colhidas após a defecação devem ser provenientes da porção central do bolo fecal e devem ser colhidas com o auxílio de uma espátula. Para exame bacteriológico devem ser colhidos no mínimo 2g^[4]. As amostras, com exceção de algumas examinadas no mesmo dia da colheita, devem ser mantidas sob refrigeração e examinadas 24 horas após, ou armazenadas em recipiente contendo formol a 10% até o momento da análise e do processamento da técnica de flutuação em solução saturada de cloreto de sódio^[8].

As amostras colhidas por proprietários dos cães devem ser colocadas em recipientes plásticos com tampa, etiquetadas, identificadas individualmente e armazenadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável e transportado em seguida para o laboratório. Podem também ser refrigeradas a 4°C até o momento do exame^[89].

4. COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM EQUINOS

4.1 Paracentese abdominal

A obtenção do líquido peritoneal por meio da paracentese abdominal é considerada uma prática fácil, segura para o animal e de baixo custo. É uma técnica importante para auxiliar no

diagnóstico de doenças abdominais de equinos (enfermidade do intestino grosso). A análise de líquido peritoneal é uma ferramenta importante e útil não apenas para o diagnóstico, mas também para auxiliar no prognóstico e direcionamento da conduta clínica em equinos^[92,97].

As complicações mais comuns dessa técnica são celulites na parede abdominal e perfurações das alças intestinais; neste caso, quando em condições normais, a lesão é rapidamente ocluída sem maiores consequências. As complicações mais severas ocorrem quando as alças se encontram distendidas e desvitalizadas^[101].

A quantidade normal de líquido peritoneal presente na cavidade abdominal em um equino adulto varia de 100 a 300ml. Em condições normais o líquido peritoneal é pálido, claro, contém baixo teor de proteína, inferior a 2,5g/dl, contagem de células nucleares menor que 5.000/ml. Outros parâmetros físico-químicos do líquido peritoneal estão descritos na Tabela 5. Alguns fatores podem influenciar nos resultados da análise bioquímica do líquido peritoneal, como alimentação, posição, repleção das alças e desidratação^[85,115].

Duas técnicas são descritas na literatura, e em ambas o ponto de colheita é sobre a linha branca, em direção à apófise xifoide, no ponto mais ventral do abdome. É necessária a realização de tricotomia e assepsia local, pois o procedimento deve ser o mais estéril possível para diminuir o risco de contaminação. Na primeira técnica realiza-se uma pequena incisão na pele e na musculatura. Posteriormente, perfura-se o peritônio com uma cânula mamária de bovino ou um cateter urinário de canino e colhe-se o líquido peritoneal em um tubo contendo EDTA e em outro sem. Na segunda técnica utiliza-se uma agulha 40 x 12mm para perfurar a linha branca, a musculatura e o peritônio e introduzem-se rapidamente 2cm da agulha e posteriormente o movimento deve ser delicado até começar a fluir o líquido, com cuidado para não ocorrer perfuração de alças intestinais. Os exames do líquido peritoneal incluem citologia e exames microbiológico e bioquímico^[92,101].

Tabela 5. Parâmetros normais do líquido peritoneal de equinos

Parâmetro	Valor
Cor	Amarelado, incolor
Odor	Inodoro
Aspecto	Límpido
Células totais	< 10.000 μ l
Proteína total	< 2,5g/dl
Globulinas	0,7 a 1,4g/dl
Albumina	0,3 a 1 g/dl
Fibrinogênio	< 100mg/dl
pH	7,25 a 7,4
Glicose	74 a 203mg/dl
Lactato	3,6 a 10,8 mg/dl
Ureia	10,9 a 23,2 mg/dl
Creatinina	1,8 a 2,7 mg/dl
Fosfatase alcalina	0 a 161 UI/L
Desidrogenase láctica	0 a 355UI/L
Bilirrubina total	0 a 1,2mg/dl

4.2 Colheita de sangue

A colheita de sangue é de suma importância tanto para o diagnóstico como para o monitoramento de doenças. A veia jugular é o acesso mais fácil e eficiente no caso de equinos; localiza-se facilmente a goteira da veia jugular ao longo do pescoço. A veia é punctionada com segurança na metade cranial do pescoço, onde o tecido muscular se interpõe entre a veia e a bainha contendo a artéria carótida. Quando se realiza pressão (garrote) na veia jugular, próximo a sua entrada no tórax, a veia rapidamente se dilata e é facilmente notada^[92,115].

A colheita pode ser realizada com agulhas 20 x 25mm e tubos contendo vácuo ou *Vacutainer*, com anticoagulante (por exemplo: EDTA) para obtenção de sangue total, e tubos sem anticoagulante quando se deseja realizar provas bioquímicas ou ensaios sorológicos.

4.3 Toracocentese

A toracocentese consiste na aspiração de líquidos presentes na cavidade torácica, sendo esse procedimento utilizado tanto para a colheita de material quanto para terapêutica do quadro. Em um equino saudável o líquido pleural é claro, transparente, inodoro e de coloração amarelada. A contagem de células nucleadas em equinos pode estar no intervalo de 800 a 12.100/mm³, e a proteína de 0,2 a 4,7g/dl^[22,23].

A efusão pleural caracteriza-se pelo acúmulo de líquido viscoso, purulento ou sanguinolento na cavidade pleural. O aumento na quantidade de líquido está associado a causas primárias, como pneumonias, pleurites, abscessos torácicos, insuficiência cardíaca, doença hepática crônica, hipoalbuminemia, ruptura do diafragma, neoplasia torácica e lesão traumática^[92]. Nos casos de septicemia o líquido adquire um aspecto turvo, amarelo, com coágulos de fibrina, com alta concentração de células nucleadas e proteína^[101].

A técnica de toracocentese consiste na introdução de um dreno no tórax, na maioria dos casos com realização de anestesia local. Normalmente, quando realizada pelo lado direto, a introdução deve ser no sexto ou sétimo espaço intercostal, até 10cm dorsais ao nível do olécrano ou da junção costocondral. No lado esquerdo, geralmente é feito no oitavo ou nono espaço intercostal, 4 a 6cm dorsais ao nível do olécrano ou apenas dorsal da junção costocondral. A auscultação torácica, percussão, radiografia, e ultrassonografia podem ser úteis para determinar a localização da efusão. Primeiramente, realizar assepsia no local escolhido, evitando, assim, maiores complicações^[92,101]. O líquido pleural deve ser colhido em tubo com EDTA para análise citológica e proteica, e tubo sem EDTA para realização de exames bioquímicos e microbiológicos.

Complicações decorrentes da técnica de toracocentese podem resultar, com frequência, em pneumotórax, devido à entrada de ar, e hemotórax, quando ocorre lesão de grandes vasos. Hipovolemia é uma complicação mais rara e, normalmente, está relacionada à perda de grande quantidade de líquido e sua rápida drenagem. A punção accidental do coração pode causar desde a arritmia cardíaca até a parada cardíaca, dependendo da estrutura lesionada^[54].

4.4 Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar é um método não invasivo no qual se obtêm amostras das porções mais distais do trato respiratório por meio da infusão de fluido isotônico e com sua imediata aspiração. Dessa forma, são obtidas amostras para realização de análise citológica e bioquímica^[29]. É considerado um método sensível para o diagnóstico de enfermidades inflamatórias não infeciosas pulmonares, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a doença inflamatória

das vias aéreas (DIVA). Também pode ser utilizado no diagnóstico de hemorragia pulmonar por esforço^[101,115].

Para a realização da técnica é necessária a higienização das narinas, a contenção física com cachimbo, tronco e a contenção química. Após a contenção e sedação do animal, introduz-se na narina um cateter com 3m de comprimento, 10mm de diâmetro e com um balão inflável em uma das extremidades. Utiliza-se anestésico local (xilocaína, por exemplo), na glote e na traqueia, para diminuir o reflexo de tosse. A cabeça do equino deve estar posicionada o mais horizontal possível, permitindo inserir a sonda através da traqueia. Uma vez nesse local, inserem-se 20 a 30ml da solução de lidocaína na passagem pela narina. Normalmente, se desencadeia reflexo de tosse, avança-se com a sonda lentamente até encontrar resistência. Nesse ponto, infla-se o balão e fixa-se a extremidade posterior da sonda à narina. Posteriormente, influem-se aproximadamente 250ml de solução salina estéril, que é imediatamente aspirada com uma seringa^[92]. O material pode ser acondicionado em frascos contendo EDTA e sem EDTA, conservados sob refrigeração.

A análise do material deve incluir o volume recuperado, a coloração, o aspecto, a presença de surfactante (espuma) e de partículas mucoides em suspensão. O material deve ser incolor, com presença de surfactante e com partículas em suspensão ou em pequenas quantidades. O surfactante significa que o material foi colhido da porção distal do trato respiratório. Já a ausência de surfactante pode ser por falha no procedimento ou por doenças que cursam com prejuízo na produção do surfactante^[41,128].

4.5 Colheita de líquido sinovial por artrocentese

A análise do líquido sinovial é realizada como auxílio no diagnóstico de enfermidades articulares, bem como auxiliar no prognóstico da doença. O líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma e tem como função nutrir a cartilagem e lubrificar as superfícies articulares, minimizando o atrito entre elas^[103].

A colheita deve ser realizada de forma estéril para evitar infecções iatrogênicas ou contaminação da amostra. O animal deve estar bem contido e deve-se realizar anestesia local e intra-articular. A colheita é feita com agulha hipodérmica (25 x 8) e seringa de 5ml. As amostras devem ser colhidas em tubos contendo EDTA para análise citológica e tubos sem EDTA para exame microbiológico. Algumas características devem ser observadas, como aspecto, volume, viscosidade, coloração, proteína, precipitação de mucina, formação de coágulo, enzimas.

O líquido sinovial se caracteriza por ser viscoso, claro, de cor amarelada, o pH varia de 7 a 7,8 e a concentração de proteínas é de 2 a 2,5g/dl. A viscosidade está diretamente relacionada à quantidade e à qualidade do ácido hialurônico secretado pela membrana sinovial. A diluição do ácido hialurônico como resultado da inflamação provoca uma diminuição da viscosidade. Para verificação da viscosidade coloca-se uma gota entre as pontas dos dedos e quando o líquido está normal deve esticar de 2 a 5cm antes de romper-se. A quantidade de células nucleadas varia entre 250 e 3.000, com 94% a 100% de mononucleares e 0 a 6% de neutrófilos^[92,101].

4.6 Colheita de urina para urinanálise

Quando se suspeita de doenças no trato urinário, é indicada a realização de urinanálise, sendo útil para indicar alterações nas vias urinárias superiores e inferiores. A urina pode ser colhida durante a micção, desprezando o primeiro jato e colhendo o jato médio. Pode-se utilizar cateterismo uretral, e em potros pode-se utilizar a cistocentese. A compressão manual da bexiga durante a palpação retal estimula a micção. Normalmente, a urina possui cor amarelo-pálida a castanho-escuro ou turva devido à grande quantidade de cristais de carbonato de cálcio e muco (Tabela 6)^[103,128].

Tabela 6. Relação dos parâmetros do líquido sinovial com lesões articulares.

Lesão	Aspecto	Visco-sidade	Volume	Proteína (g/dl)	Glóbulos brancos	Citologia
Normal	Amarelo-claro, transparente	Alta	Baixo	< 2,0	< 0,4x 10 ⁹ /L	< 20% neutrófilos
Sinovite asséptica	Amarelo translúcido	Baixa	Levemente aumentado	< 3,0	2 a 10 x 10 ⁹ /L	> 75% neutrófilos (maduros)
Artrite séptica	Amarelo-esverdeado	Baixa	Aumentado	3 a 6	30 a 100 x 10 ⁹ /L	> 90% neutrófilos (imaturados)
Degeneração articular	Amarelo transparente	Variável	Baixo	< 2,5	0,2 x 10 ⁹ /L	10% a 30% neutrófilos (maduros)

Fonte: Adaptado de ORSINI, et al. (2000)^[92].

Durante a colheita deve ser avaliada a coloração, a transparência, o odor, a viscosidade e a densidade. A mensuração do pH também é importante. O valor normal do pH da urina do equino é alcalino, e alteração como acidez pode ser indicativo de bacteriúria ou exercícios vigorosos (Tabela 7). No caso de bacteriúria, há presença de odor amoníaco. A avaliação da densidade auxilia no diferencial de azotemia renal de pré-renal^[115].

Tabela 7. Parâmetros normais encontrados na urina de equino

Parâmetro	Valor/ Característica
Cor	Amarelo
Aspecto	Turvo
Densidade	1.020 a 1.050
pH	7 a 8
Glicose	Negativo
Cetonas	Ausente
Proteína	Ausente, traços
Muco	Presente
Cristais	Presente

4.7 Colheita de conteúdo nasofaríngeo com o uso de suabe

O suabe nasofaríngeo é um método de colheita de material para diagnosticar doenças respiratórias como influenza equina rinopneumonia e adenite infecciosa. No caso de equinos, o suabe consiste em uma esponja absorvente (gazes, algodão) enrolada em uma haste de arame estéreis, longa o suficiente para atingir o meato ventral da nasofaringe.

Os suabes são acondicionados de acordo com a finalidade ou o agente etiológico suspeito. Para isolamento bacteriano o suabe deve ser acondicionado sob refrigeração, e para suspeita viral conservado em meio específico, como PBS, contendo antibiótico, mantido sob refrigeração ou a -70°C, dependendo da distância ao laboratório^[115,131].

4.8 Colheita de líquido cefalorraquidiano (LCR)

Exames do líquido cefalorraquidiano (LCR) estão indicados sempre que se suspeita de enfermidades neurológicas; eles auxiliam para descartar infecções no sistema nervoso central (SNC). O LCR é um ultrafiltrado de plasma transportado ativamente que banha o SNC e localiza-se nos ventrículos cerebrais e no espaço subaracnóideo da medula espinhal^[115]. O LCR possui a função de manter o cérebro e a medula espinhal em suspensão, além de proteger e regular a pressão intracraniana e manter o equilíbrio iônico e o ácido básico^[101].

O LCR pode ser colhido em duas localizações: no espaço lombossacral e atlantoccipital. Quando se opta por colher no espaço atlantoccipital, o animal deve estar anestesiado. Já para a colheita no espaço lombossacral o animal deve estar em estação e sedado. O LCR deve ser colhido em tubos com e sem anticoagulante. Caso contenha sangue, devido à perfuração da pele, deve ser descartado.

Macroscopicamente se avalia cor, transparência e presença de partículas^[92]. Os exames laboratoriais devem incluir concentração de proteína total, albumina, atividade enzimática, como CK, AST, LDH, e concentração de ácido láctico^[124].

4.9 Colheita de amostras de pele

As análises cutâneas são essenciais quando há evidências de doenças na pele, pois permitem o diagnóstico de ectoparasitas, infecções bacterianas (estafilocócicas) e infecções fúngicas. Em algumas afecções o exame microscópico de raspados de pele é imprescindível para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo (sarna sarcóptica).

- **Raspado de pele**

O raspado cutâneo deve ser realizado nas zonas limite das lesões, iniciando em uma porção aparentemente saudável em direção à área lesada, utilizando uma lâmina de bisturi ou cureta obstétrica. Antes, porém, realiza-se a tricotomia da região. O material raspado deve ser colocado sobre uma lâmina de microscópio previamente pincelada com óleo ou glicerina para garantir uma melhor aderência e fixação do material; em seguida, recobrir com uma lamínula. O raspado deve ser profundo, considerando-se a amostra como pronta quando o local apresentar coloração avermelhada ou sangramento e realizado em áreas diferentes da pele, cuidando com a presença de grande quantidade de pelo ou crostas. Em equinos faz-se necessário atenção quando se deseja fazer um raspado de pelo; o raspado deve ser mínimo, de forma que não venha a comprometer as características de pelagem do animal^[44,115]. Quando se suspeita de afecções cutâneas por fungos, os locais lesionados devem ser higienizados com álcool 70% para diminuir a população contaminante^[131].

- **Biopsias**

A biopsia de pele é o método de escolha quando se suspeita de alergias, neoplasias e enfermidades inflamatórias idiopáticas nodulares. Após a escolha do local, realiza-se a tricotomia, evitando lesionar a pele. Posteriormente, faz-se a anestesia ao redor do local da biopsia e, para a retirada dos fragmentos, é melhor usar *punch*. Faz-se um corte de toda a espessura da lesão de modo parcialmente atraumático, colocando o *punch* sobre a pele e girando ao mesmo tempo em que se exerce a pressão para baixo. Ao fim, realizar, se necessário, uma sutura nos locais e fixar as amostras em formalina a 10%.

4.10 Colheita de fezes

O exame fecal pode ser direcionado para exames microbiológicos, parasitários e citológicos, podendo fornecer informações sobre digestão, colonização e presença de parasitos. No exame macroscópico das fezes observa-se presença de fibras, muco, parasitos, aspecto, coloração, consistência e presença de corpos estranhos^[38].

A citologia fecal e o teste de sangue oculto são utilizados para detectar inflamação, erosão e ulceração da mucosa. O exame microbiológico das fezes é usado para identificar o agente patogênico em casos de diarreia, possibilitando o tratamento correto quando aliado ao antibiograma. Em infecção clostridiálea no intestino grosso, a quantificação de espécie pode ser útil, assim como testes para detectar toxinas clostridiáreas^[101].

Exames parasitológicos são aplicados para detectar ovos de nematódeos e cestódios, oocistos de protozoários. Técnicas de sedimentação possibilitam quantificar o numero de ovos por grama de fezes, sendo recomendado para monitoramente parasitológico^[44].

As fezes a serem colhidas devem ser recentes, livres de impurezas e urina, sendo ideal a retirada das fezes diretamente da ampola retal. O material deve ser acondicionado em frascos estéreis de boca larga ou em sacos plásticos. A quantidade de fezes a ser colhida depende de quais exames serão destinados e o material deve ser acondicionado sob refrigeração.

5. COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM FELINOS

Dado o fato de os gatos apresentarem menor tamanho, em comparação a outros animais domésticos, a manipulação cuidadosa e a organização são fundamentais para a realização da necropsia, uma vez que a perda ou inutilização da amostra frequentemente impedem o diagnóstico.

5.1 Colheita de sangue

Os locais mais comumente usados para colheita de sangue de gatos são as veias jugular, safena medial e cefálica. A veia sublingual e a auricular também podem ser usadas, apesar de serem de difícil acesso^[33].

Os aspectos mais importantes na técnica de *venopunção* são a contenção apropriada e uma boa distensão e imobilização do vaso^[33]. Caso não se obtenha uma boa visualização do vaso, a maneira de realizar o garrote e a imobilização deverão ser modificadas. A contenção física assegura o bem-estar dos animais procurando minimizar o estresse do manejo e a segurança da equipe. Algumas vezes, é necessário que o gato seja tranquilizado para posterior colheita, e a opção entre a contenção física ou química depende muito do temperamento do paciente, ficando a critério do médico-veterinário^[106].

Primeiramente, deve-se tentar colher o sangue com a mínima contenção, pois em felinos a contenção excessiva deve ser evitada, uma vez que eles poderão ficar muito agressivos e mais resistentes à punção, podendo ocasionar um hemograma de estresse. A veia jugular é a escolha apropriada para colher amostras sanguíneas dos gatos devido à necessidade de volume adequado para a avaliação hematológica^[87] e de se obter um grande volume de sangue por um período relativamente curto^[62]. Outro local em que é possível conseguir um bom volume de sangue é a veia safena média. Além de ser de fácil acesso, os felinos toleram mais a contenção para a colheita de sangue nesse local quando se compara ao acesso pela jugular.

Para colheita, são necessários um local calmo, contenção adequada, tricotomia do local e assepsia com álcool iodado tópico^[95,106]. A tricotomia, além de diminuir o risco de contaminação do paciente, facilita a visualização e a identificação da veia^[43]. Caso seja realizada a colheita na jugular, o garrote deverá ser na altura do manúbrio, e em casos de pouco ingurgitamento venoso devem-se garrotear as duas jugulares. O animal deverá ser posicionado em decúbito lateral ou esternal; alguns felinos permitem mais facilmente a contenção quando posicionados em decúbito esternal.

Para a colheita de sangue da veia safena média, o gato deverá ser posicionado em decúbito lateral^[33]. Um auxiliar realiza o garrote e flexiona o membro pélvico oposto àquele em que será realizada a *venopunção*. Outro ajudante, ou o proprietário, pode ficar conversando e acariciando o gato na região ventral mandibular e, ao mesmo tempo, colocar uma das mãos sobre o tórax do animal, para realizar uma melhor contenção do felino. Dessa forma, ele ficará mais calmo e, na maioria das vezes, permitirá a colheita sem relutar. A pessoa que realizará a colheita estenderá o membro pélvico do felino para que a veia fique alinhada e mais fácil de ser acessada. Após a colheita, deverá ser realizada a compressão manual por no mínimo 2 minutos no local para evitar que se forme um hematoma.

Para que ocorra uma colheita de sangue bem-sucedida, devem-se evitar lacerações iatrogênicas do vaso e o animal deverá sentir-se confortável^[43]. É importante pressionar firmemente a pele sobre a veia, sem causar oclusão vascular, facilitando a manutenção dela no local durante a punção. Deve-se segurar firmemente a seringa entre o polegar e o dedo indicador. Posicione o dedo indicador próximo à extremidade da seringa, facilitando a introdução da agulha. Na maioria das vezes é melhor perfurar a pele lateralmente ao vaso, evitando a transposição. Avance um pouco mais para puncionar a veia; geralmente o sangue flui naturalmente na seringa ao tracionar o êmbolo da seringa. Algumas vezes, deve-se reposicionar a agulha, pois ela poderá estar tocando a parede oposta da veia, sem atingir o lúmen. O diâmetro da agulha deve ser observado para colheita da quantidade de sangue desejada. Para gatos, o diâmetro ideal da agulha é de 25 x 7 ou 25 x 8mm^[4]. A agulha deve estar bem aderida ao canhão da seringa e deixar o sangue fluir com mínimo vácuo, evitando-se o bombeamento de sangue e o excesso de pressão na seringa, pois pode causar o *colabamento* da parede da veia. Caso o sangue deixe de fluir, posicionar novamente a agulha e a seringa, movendo-as conforme necessário.

Depois de colher o sangue venoso periférico, o garrote deve ser retirado antes que a agulha seja removida, comprimindo-se manualmente o local da punção com algodão embebido em álcool ou álcool iodado. A agulha deve ser retirada para transferir o sangue da seringa para um vidro ou frasco estéril contendo anticoagulante (EDTA – 2mg/ml de sangue). Essa amostra de sangue poderá ser utilizada para hemograma, fibrinogênio e contagem de plaquetas^[66].

Ao colher sangue para diversos procedimentos diagnósticos, devem-se preencher os tubos que contenham anticoagulante (EDTA, por exemplo) e por último os sem anticoagulante, evitando que o sangue coagule dentro da seringa. Os tubos devem ser preenchidos sem forçar a passagem do sangue na agulha, pois pode-se provocar hemólise, ocasionando alterações bioquímicas na amostra. Quando não for possível encaminhar o tubo ao laboratório para análise, deve-se colocá-lo sob refrigeração e realizar o esfregaço sanguíneo^[119]. Após a transferência do sangue lentamente para o frasco com anticoagulante, deve-se fazer a homogeneização gentil pela inversão do tubo pelo menos 10 vezes^[66].

• Esfregaço sanguíneo

Para a obtenção de um esfregaço sanguíneo, preparam-se duas lâminas novas e desengorduradas. Deve-se homogeneizar o sangue no frasco de colheita, especificar qual frasco possui

EDTA, retirar com o capilar de micro-hematócrito uma amostra de sangue e colocar na lâmina. Com um movimento uniforme para a frente, fazer uma lâmina deslizar sobre a outra. O sangue vai se estender sobre a lâmina formando um esfregaço^[66]. A heparina deve ser evitada quando se faz esfregaço sanguíneo, pois o contato desse coagulante com sangue total provoca alterações na morfologia das células^[43].

Os esfregaços sanguíneos secos não fixados podem ser corados com a maioria dos corantes convencionais 24 a 48 horas depois de serem preparados^[43]. Nunca refrigere um esfregaço sanguíneo não fixado, pois a condensação que ocorre após a retirada da geladeira danifica o esfregaço, tornando-o inutilizável para citologia^[43]. Os resultados do exame de sangue devem ser interpretados sempre usando as variações de referência fornecidas por cada laboratório^[62].

- **Sangue total**

A remessa de sangue ao laboratório de diagnóstico deve possuir uma identificação na embalagem que resista ao manuseio, como tinta resistente à água, fitas com cola e adesivos apropriados. As amostras devem ser enviadas logo após a colheita e, de preferência, refrigeradas^[112].

Tanto os conservantes químicos quanto os físicos devem ser utilizados com cautela, pois o uso inadequado poderá inviabilizar a amostra^[112]. Para realizar o hemograma, o EDTA é o anticoagulante de eleição^[99]. Os tubos com as amostras devem ser armazenados em temperatura entre 4 e 25°C, a menos que exista uma indicação na etiqueta da embalagem^[108]. Os eritrócitos apresentam um aumento crescente de susceptibilidade à lise após 24 horas em contato com o EDTA. O sangue pode ser processado em até 24 horas após a colheita, desde que seja mantido sob refrigeração e que respeite um prazo de pelo menos 15 minutos sob temperatura ambiente para submetê-lo à refrigeração, evitando hemólise^[43,129]. Quando o sangue colhido permanecer à temperatura ambiente, deverá ser processado o mais rápido possível após a colheita, pois em contato com o EDTA poderá produzir alterações nos leucócitos e artefatos morfológicos nas lâminas de esfregaço^[129]. Uma amostra de sangue de 2 a 5ml é o suficiente para as análises hematológicas e bioquímicas de rotina^[43].

Para a manipulação das amostras de sangue devem-se utilizar seringas e agulhas limpas e secas. Um fator importante está relacionado ao jejum do animal, pois caso ele tenha se alimentado, poderá aparecer em seu exame lipemia pós-prandial, podendo influenciar o resultado dos exames.

- **Plasma e soro sanguíneo**

O plasma é a parte líquida do sangue que será obtida após a centrifugação quando o sangue for colhido com anticoagulante^[66,108]. Nesse caso, pode-se centrifugar a amostra de sangue a 2.600rpm por 10 minutos e em seguida passar para outro tubo o sobrenadante (plasma).

Para a maioria dos testes bioquímicos de rotina utilizam-se amostras de soro. O soro é obtido por meio da colheita de sangue em tubo limpo e seco sem anticoagulante. Para obter o soro sanguíneo é necessário que ocorra a completa coagulação da amostra. O soro poderá ser separado das células dentro de 45 minutos após a colheita do sangue ou em aproximadamente cinco minutos quando se realizar sua centrifugação^[43,108].

5.2 Lavado endotraqueal

Existem várias enfermidades que acometem o sistema respiratório e, muitas vezes, o diagnóstico é inconclusivo. E quando é possível, nem sempre é idôneo^[132]. Nos animais de pequeno porte está indicada a anestesia geral para a aspiração endotraqueal (ou lavado traqueal), tendo co-

mo vantagem evitar complicações associadas ao desconforto e movimento do paciente durante o procedimento^[34]. A aspiração endotraqueal é um procedimento de fácil execução e pode fornecer excelentes amostras para diagnóstico citológico e para cultura microbiológica. O estudo citológico está sendo utilizado largamente para estabelecer o diagnóstico definitivo em problemas respiratórios, pois nele constam informações de grande apreço quando coletadas de forma adequada e interpretadas corretamente^[132].

Esta técnica avalia uma pequena parte do pulmão, porque a infusão salina chegará somente até os alvéolos e ao parênquima local, ou seja, as áreas mais craniais. Faz-se a introdução de um tubo endotraqueal, que servirá como guia para introdução de solução fisiológica estéril, que depois é aspirada para posterior análise^[132].

As duas principais técnicas utilizadas para se obter as amostras são baseadas no uso de um broncoscópio ou de um tubo endotraqueal. Essas técnicas são qualitativas e dificilmente o resultado será fidedigno. Para que o número de células seja mais real, a quantidade de solução salina injetada e a removida deverão ser conhecidas, ou seja, o ideal é retirar a mesma quantidade que foi injetada^[7]. Alguns autores discordam e relatam que o aspirado do lavado traqueal não apenas determina o tipo de célula que predomina, mas também é possível verificar a sensibilidade antibiótica através de testes microbiológicos, além da espécie responsável pela infecção instalada quando em cultivos positivos^[132].

A técnica para o lavado traqueal consiste em conseguir uma amostra citológica da traqueia e dos brônquios principais sem lesionar a região e sem contaminar a amostra por bactérias e células da cavidade oral e da orofaringe, porém não se consegue amostra do sistema respiratório, como os bronquíolos e os alvéolos^[6]. Esta técnica está indicada principalmente para alterações de traqueia e brônquios principais, mas também pode ser usada em casos de tosses crônicas com pacientes com enfermidades em parênquima pulmonar^[132].

A lavagem broncoalveolar também é uma técnica relativamente simples. O que a difere da lavagem traqueal é que a sonda será introduzida além do quarto ou sexto espaço intercostal, e a técnica da lavagem broncoalveolar deverá ir além da carina, sendo efetuada uma entubação seletiva, indo além dos brônquios principais. Quando a sonda é introduzida mais em direção caudal, permite colher líquido e células das vias aéreas inferiores para exame microbiológico e citológico. Porém, é preciso lembrar que devem ser preconizadas sempre etapas como anestesiar e pré-ventilar o paciente. É indicada para suspeitas de broncopneumopatia nos casos em que o tratamento foi insatisfatório ou naqueles em que a duração da doença seja prolongada^[61]. Dentre as indicações para fazer lavado broncoalveolar estão as doenças do trato respiratório, doenças brônquicas em felinos, doenças cardíacas, doenças neoplásicas e multissistêmicas, e ainda naqueles casos em que o diagnóstico está sendo inconclusivo^[47]. Também se indica esse procedimento quando tiverem sido confirmadas, pelo exame radiológico, doenças difusas dos alvéolos ou de interstício alveolar^[7].

A técnica de lavagem broncoalveolar e a traqueal consistem em anestesiar o paciente e entubá-lo com uma sonda endotraqueal esterilizada, sem estar em plano anestésico, pois o fato de o paciente ficar com reflexo da tosse mantido é uma vantagem. Deve-se posicionar o gato em decúbito lateral, deixando o pulmão afetado para baixo. Colocar uma sonda urinária esterilizada nº 4 pela sonda traqueal, avançando até sair. É importante medir a distância do focinho até o 7º espaço intercostal antes de introduzir a sonda; esse ponto é o que difere uma técnica da outra: na lavagem traqueal a sonda é menos introduzida se comparada à da broncoalveolar. Aplicar um jato de 5 a 10ml de solução salina tamponada com fosfato estéril pré-aquecida ou solução fisiológica estéril pela sonda. Usa-se uma seringa, que pode estar acoplada a uma torneira de três vias, também estéril, aplica-se sucção diretamente na seringa e colhe-se a metade do fluido instalado. Caso necessá-

rio, repetir o procedimento e as amostras devem ser guardadas em frascos estéreis com ácido etilenodiaminotetracético para que a citologia e a cultura sejam realizadas^[47,61,132]. Fazer movimentos de compressão no tórax facilita a colheita do aspirado, tornando a amostra mais significativa. A primeira colheita deverá ser reservada para o cultivo bacteriano^[132].

Nos lavados traqueobrônquicos obtém-se uma pequena quantidade de muco com células típicas do epitélio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, que é encontrado na mucosa normal da traqueia e dos grandes brônquios. Em casos nos quais existam patologias podem ser encontrados três tipos de amostras: 1- alto tipo de neutrófilos degenerados, bactérias e um número elevado de macrófagos; 2- um grande número de macrófagos, eosinófilos e mastócitos, 3- células neoplásicas.

As complicações que podem ocorrer são hipoxia e hemorragias. Para evitar a hipoxia é importante ventilar bem o paciente por cerca de 5 a 20 minutos antes da lavagem broncoalveolar ou traqueal^[55,132]. A amostra deve ser dividida em duas partes: uma em um tubo de EDTA, para preservar a morfologia celular, e outra em um tubo estéril sem anticoagulante, que deve ser mantida para potencial uso em cultura microbiológica^[7].

5.3 Colheita de medula óssea

A colheita, a análise e a interpretação da medula óssea constituem etapas fundamentais da avaliação da série eritrocitária, leucocitária e plaquetária^[66]. A vantagem nesse processo é a correta avaliação nos casos de suspeita de hipoplasia ou aplasia medular.

Os aspirados de medula óssea são feitos por meio da colheita de células utilizando uma agulha na cavidade da medula óssea para a obtenção do material^[31]. A medula óssea deve ser analisada em conjunto com a avaliação hematológica, devendo ser enviada uma amostra sanguínea junto com o sangue de medula óssea^[66]. O material colhido deverá ser disseminado sobre as lâminas de microscopia para posterior avaliação^[31].

As indicações para as amostras de medula óssea são^[51,62]:

- a) citopenias inexplicadas, tais como anemias não regenerativas, neutropenias, trombocitopenias, pancitopenias;
- b) quando são evidenciados linfócitos ou granulócitos anormais/imatuuros no sangue periférico;
- c) casos de elevação inexplicável de qualquer linhagem celular, por exemplo: linfoma, hiperproteinemia, hipercalemia de origem desconhecida;
- d) pirexia de origem desconhecida;
- e) detecção de FeLV em gatos discordantes;
- f) presença de neoplasias com potencial envolvimento da medula óssea, por exemplo: mastocitoma e o linfoma.

A colheita de medula óssea tem complicações^[51] que incluem: o risco anestésico^[73], de infecção e hemorragia; trauma ao músculo adjacente, ao nervo e à articulação; e quebra da agulha. Para reduzir os riscos dessas complicações, deve-se realizar essa colheita com método asséptico e realizar a compressão manual sempre que necessário para controlar o sangramento no local da punção^[51]. Deve-se, também, monitorar o animal durante todo o procedimento anestésico, conhecer a anatomia e manipular com cuidado a seringa e a agulha. Animais com distúrbios de coagulação ou trombocitopenia são predispostos à hemorragia, no entanto não são frequentes. O ideal é ter sempre uma bolsa ou seringas com heparina com sangue fresco para a realização de transfusão, caso seja necessário^[51].

- **Colheita de medula óssea por punção aspirativa**

Em gatos, os locais de mais fácil acesso são a fossa trocantérica do fêmur e a região proximal ou a face craniolateral do úmero proximal, imediatamente distal ao tubérculo maior^[2,51]. A crista ilíaca não é adequada para amostragem em gatos devido ao espaço medular estreito^[62]. No entanto, ao se acessar a asa do ílio lateralmente, é possível se obter uma boa quantidade de amostra^[51]. Esse local é contraindicado em gatos obesos pela maior dificuldade de se localizar o espaço. O fêmur é o local de eleição para colheita de amostras^[62]. A costela e o esterno têm sido usados frequentemente para grandes animais e cães de raça gigante, porém não são recomendados para a colheita em gatos^[51].

Para realizar a técnica o animal deve estar anestesiado, com tricotomia ampla no local. Os materiais necessários para esse procedimento são os de anestesia: para o preparo de campo com tricotomia do local; para a realização de antisepsia: luvas estéreis, panos de campo estéreis, seringas, agulhas estéreis; para aspirado de medula: anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético - EDTA) a 2% ou 3% (2ml), placa Petri, tubo de microematócrito e lâminas novas de microscopia limpas com uma das extremidades fosca, para identificação^[31,73].

Para realizar esse procedimento é necessária uma agulha especial para biopsia aspirativa de medula óssea^[2]. As agulhas de Klima ou de Jamshidi especializada são específicas para esses procedimentos^[62]. Pode-se utilizar ainda a agulha do tipo Rosenthal^[52].

Deve-se ter cautela com a contenção vigorosa de um gato anêmico, pois a contenção poderá induzir a apneia, cianose grave e parada cardíaca. Por esse motivo, fica indicada sedação com administração de oxigênio suplementar e anestesia local^[43]. É importante que o gato esteja sedado quando dócil, ou mesmo anestesiado quando com temperamento difícil, e ainda deve ser aplicada anestesia local^[52]. O anestésico local deverá ser infiltrado na pele, no tecido subcutâneo e no periôsteo^[52,66]. A sedação e a anestesia local são adequadas para aspiração a partir do úmero^[52,62], mas é necessário anestesia geral para colheita no fêmur e também para a realização de biopsias^[62].

Em seguida, deve-se realizar a tricotomia ampla da região^[62,66] e posicionar o animal em decúbito lateral para acessar o fêmur, úmero ou asa do íleo, podendo ainda, para esse último local de acesso, utilizar o decúbito esternal^[73]. Depois disso, realiza-se a antisepsia e a colocação dos campos na área a ser puncionada^[73].

Para se acessar o úmero, um assistente deverá fazer uma rotação externa (abdução) do membro anterior para que a face cranial do membro seja mantida nessa posição até completar toda a colheita. Depois, palpa-se a pequena saliência na face cranial proximal à cabeça do úmero, 1cm distal à articulação escapulouminal^[62,66]. Posicionar a agulha medular (com o estilete no local) sobre a saliência em um ângulo de 90° com o úmero. Avançar lentamente a agulha em torno de 0,5 a 1cm com movimentos nos sentidos horário e anti-horário, alternadamente, exercendo uma pressão moderada contra o osso. Depois de confirmar se a agulha está na cabeça do úmero, remove-se o estilete e deve-se mantê-lo estéril, caso haja a necessidade de reposicionamento da agulha.

Acoplar na agulha uma seringa de 20ml com EDTA a 3% e aplicar sucção suave, aspirando várias vezes. Quando for verificado material sanguinolento na seringa, liberar a pressão negativa lentamente. Para evitar hemodiluição, a pressão negativa deverá ser liberada assim que se começar a ter o resultado esperado^[52]. No momento da colheita poderá ser realizado um esfregaço com 0,5 a 1ml de sangue de medula óssea^[52].

Quando não for evidenciado sangue na seringa, é indicado reposicionar o estilete e a agulha, fazendo movimentos avançando e recuando. Em seguida, tenta-se aspirar novamente. O passo seguinte é colher o sangue medular; para isso agulha e seringa devem ser removidas da cabeça do úmero e realiza-se uma pequena compressão manual^[52,66,73].

Direcionar o conteúdo para placa de Petri. As espículas ósseas são observadas como partículas cinzentas e opacas e são notadas quando movimentamos a placa de Petri. Aplica-se uma gota de sangue em cada lâmina. Espículas medulares permanecerão fixadas na parte superior da lâmina quando o sangue escorrer. Posicionar verticalmente várias lâminas de vidro limpas e de preferência ter lâminas adicionais disponíveis para coloração^[31,62,66].

Fazer esfregaços colocando uma segunda lâmina sobre a primeira em ângulo reto, esmagando levemente as espículas medulares. Devem-se confeccionar imediatamente cinco esfregaços. Após a colheita, realiza-se a dermorrafia com uma sutura interrompida simples.

• Biopsia medular

A biopsia medular é indicada nos casos em que não foi possível colher o sangue de medula óssea e em casos de avaliação de metástases e lesão óssea lítica, como nos casos de neoplasia, inflamação ou infecção, além de possibilitar informar o grau de *celularidade* medular e o diagnóstico de mielofibrose e mieloesclerose^[73]. O procedimento é bem semelhante ao aspirado de medula óssea; o que difere é a agulha a ser utilizada, que deverá ser a de Jamshidi ou a de Steis e não será realizada a aspiração. A agulha com o estilete será introduzida da pele até o tecido subcutâneo. Em seguida, retira-se o estilete e a agulha é introduzida com movimentos giratórios 0,5 a 1,0cm no osso de acordo com o tamanho do felino. Retira-se cuidadosamente a agulha e se introduz o estilete, depositando a amostra em uma placa de Petri. O espécime de biopsia pode ser colocado em formol 10% tamponado, e as lâminas citológicas preparadas não devem ser enviadas junto, no mesmo recipiente, pois os vapores de formalina poderão interferir na qualidade da amostra citológica^[73].

5.4 Toracocentese

Toracocentese é a punção cirúrgica da parede torácica para a remoção de ar (pneumotórax) ou fluido (derrame pleural) do espaço pleural^[45], sendo suas indicações pneumotórax, hemotórax, hemopneumotórax, derrame pleural, drenagem pleural, que podem ocorrer após toracotomia^[76]. A toracocentese é uma técnica que serve tanto para diagnóstico como para técnica terapêutica^[16].

Os gatos com doença no espaço pleural possuem respiração limitada. Por esse motivo, é muito importante que se tenham certos cuidados para evitar o estresse do felino, como manipulação excessiva. Antes do procedimento é necessário fornecer oxigênio, o que poderá ser feito através de máscaras faciais ou em tenda de oxigênio, ou ainda pode ser utilizado colar elisabetano fechado na parte da frente com filme plástico; e na parte posterior, onde fica presa a coleira, colocar a mangueira de oxigênio. Com essa técnica o felino não se estressa tanto^[61].

Ao remover o acúmulo anormal de fluidos e ar, ocorre melhora da ventilação e redução do desconforto respiratório. Com isso, o veterinário terá condições de manusear o gato^[61]. Para esse procedimento não é necessária a realização de anestesia geral^[61], porém é necessário utilizar mínima sedação^[86], principalmente quando for manipular um gato com temperamento agressivo.

O mediastino separa os dois lados do tórax. Em gatos e cães ele é fino e permeável a fluidos^[45]. É recomendado toracocentese bilateral na maioria dos casos^[16,86], pois um dos lados do tórax pode ter líquido no espaço pleural diferente do líquido do outro lado, mostrando a importância da drenagem bilateral.

O procedimento deverá ser realizado entre o 7º e o 8º espaço intercostal, na junção costocondral^[46]. É necessário fazer a tricotomia ampla, podendo abranger do terceiro ao nono espaço intercostal. A agulha deverá ser inserida na margem caudal da costela, evitando os vasos e os nervos intercostais. Deve-se direcioná-la primeiro perpendicularmente à costela, e no momento em

que entrar na cavidade torácica, ela deverá ser reposicionada no sentido ventral com o intuito de se evitar uma laceração pulmonar^[27].

Para a drenagem torácica, o paciente deverá permanecer em decúbito esternal para minimizar o estresse^[46]. Também é possível elevar o paciente pelos membros torácicos, realizando a punção no sétimo espaço intercostal, abaixo da junção costocondral.

Outra maneira de drenar o tórax é por meio da colocação de tubos ou sonda torácica^[61]. É feita uma incisão, com bisturi, de aproximadamente meio centímetro no décimo espaço intercostal. Uma pinça hemostática curva de tamanho médio, com a sonda presa entre os seus ramos, é direcionada através do subcutâneo em direção ventral do crânio até o oitavo espaço intercostal. Poderá ser utilizada sonda uretral de número 4 ou 6. Empurra-se a sonda sob a musculatura, a qual deverá ser introduzida para o interior do tórax. O dreno deverá avançar de 10 a 15cm na cavidade torácica. Fixa-se a sonda com sutura chinesa e prende-se no flanco do gato usando uma malha corporal.

É importante que na extremidade externa da sonda fique acoplada uma torneira de três vias e uma seringa de 20ml com a porção externa fechada para evitar entrada de ar para a cavidade. O líquido colhido poderá ser armazenado em frascos estéreis, tampados, identificados e enviados ao laboratório para análise citológica.

5.5 Abdominocentes

A abdominocentesse é um exame clínico complementar que tem grande valia para o estabelecimento do diagnóstico. Algumas vezes não se consegue colher material por essa via e nesse caso é importante realizar exames complementares^[15].

A paracentese abdominal é a punção cirúrgica da cavidade abdominal que tem como objetivo remover fluido dela. Cuidados como pesar o animal antes e após a retirada do fluido abdominal são importantes, pois o ganho de peso subsequente ao procedimento é indício de um maior acúmulo de fluido abdominal^[43]. Por meio deste exame é possível diagnosticar a origem das alterações, podendo ser traumática (sangue, conteúdo digestivo, urina), infeciosa (conteúdo purulento), inflamatória (fibrina), entre outras. É bastante utilizado para confirmar o diagnóstico de peritonite, contribuindo também para o prognóstico^[66].

O local indicado para a punção é na linha média do abdome, acima ou abaixo da cicatriz umbilical ao redor de 1cm cranial ou caudal, posicionado em pé ou em decúbito lateral, com o abdome voltado para a pessoa que fará a colheita^[15]. O paciente deverá estar bem contido, pois geralmente não é necessário anestesia ou sedação para a realização desse procedimento^[116]. A contenção é muito importante, pois sem ela, no momento da colheita, podem ocorrer lacerações ou ruptura de órgão^[15].

Deve-se fazer tricotomia da região e antisepsia. A punção abdominal poderá ser feita com uma agulha de calibre 18 a 20^[43]. O cateter ou agulha deverá ser introduzido na linha média, na direção caudal, e acoplado a uma seringa^[66]. Algumas vezes, massagens no abdome facilitam a drenagem do líquido contido na cavidade^[116]. Aplicar Ringer-lactato aquecido no abdome facilitará a colheita, tornando-a mais eficaz. Verifique o volume de líquido obtido e examine-o para avaliar se é um exsudato ou transudato. O transudato tem como característica *celularidade* baixa (proteína), por isso a coloração é clara (translúcido); já o exsudato tem muita *celularidade* e sua coloração varia, podendo ser, por exemplo, avermelhada ou amarelada. Exame citológico e de cultura também podem ser realizados com essas amostras. Por isso, é importante que se tenha cuidado para não contaminá-las^[43]. O material obtido deverá ser colocado em dois frascos, um com EDTA para evitar coagulação, caso o fluido seja exsudato, e outro frasco estéril para a realização de cultura^[15].

5.6 Colheita de líquido cefalorraquidiano (LCR)

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido corporal estéril e de aparência clara que ocupa o espaço subaracnóideo no cérebro. É uma solução salina muito pura, pobre em proteínas e células, e age como um amortecedor para o córtex cerebral e para a medula espinhal. O LCR tem como função cobrir todo o SNC mantendo o cérebro e a medula espinhal suspensos, protegendo-os de traumas^[15].

Os dois locais indicados para a punção de liquor em felinos são as cisternas magna e lombar^[66]. Indica-se que sejam colhidos liquor dos dois locais. Caso não seja possível, deve-se colher da cisterna magna quando se suspeita de alteração encefálica, ou na região cervical e da cisterna lombar quando se suspeita de lesão na região cervicotorácica ou toracolumbar.

A indicação para realizar o exame do LCR é a evidência clínica que sugira enfermidade no SNC^[43], e para pacientes com suspeita de infecção (bacteriana, fúngica, viral ou por riquetsias, protozoários e parasitas)^[43]. O exame do LCR possui valor diagnóstico no auxílio à clínica, no prognóstico de determinadas enfermidades e ainda como terapia nos casos de aumento da pressão intracraniana^[66].

Quanto aos riscos e às contraindicações, a razão mais forte para não realizar a colheita é a falta de experiência^[43]. Outra contraindicação está em não poder anestesiar o paciente, por se tratar de uma colheita delicada. Ao suspeitar de aumento da pressão intracraniana, como nos casos de edemas, traumas, hemorragias, neoplasias, deve-se ter muito cuidado com a descompressão repentina^[66], podendo causar herniações do cerebelo.

Contraindica-se a colheita de liquor em casos de anomalias congênitas, tais como malformação do forâmen magno ou suspeita de malformação neural na região da cisterna magna^[43], além de infecção cutânea localizada na região da punção (contaminação), desidratação severa (baixa pressão líquorica), ou ainda distúrbios de coagulação (riscos de hemorragia)^[66]. Caso haja suspeita de aumento da pressão intracraniana, deve-se ventilar muito bem o paciente previamente à punção^[6].

Os equipamentos necessários são luvas estéreis, agulha espinhal nº 22G, material para tricotomia, álcool iodado e pelo menos dois tubos para colheita para acondicionar o liquor^[15,43], sendo indicado que um deles seja estéril, caso necessite realizar cultivo fúngico ou bacteriano. Os gatos devem estar anestesiados, entubados e monitorados^[15].

Recomenda-se cuidadosa antisepsia, pois é um espaço fechado e estéril. Assim, evita-se encefalite^[6,15]. Para a punção da cisterna magna, a técnica consiste em posicionar o paciente em decúbito lateral, com o focinho paralelo à mesa e a cabeça em ventroflexão para abrir o espaço atlantoccipital, formando um ângulo de 90° com a coluna cervical. Nunca inclinar demais a cabeça, para evitar colapso da traqueia. Deve-se delinear o espaço entre a protuberância occipital e a ponta do crânio, dorsal à vértebra C2. O espaço mediano é onde a agulha deverá ser inserida.

Para puncionar a cisterna lombar, o gato deve ficar em decúbito lateral, com os membros tracionados na direção do crânio. Palpa-se a asa do íleo e o processo espinhoso de L7 e introduz-se a agulha perpendicularmente à coluna espinhal, ligeiramente cranial ao processo espinhoso de L5 ou de L6, no ponto mediano entre as asas do íleo. A agulha é então direcionada cranoventralmente, em um ângulo de 45° à coluna.

Em ambos os posicionamentos a agulha deve ter um estilete (mandril), evitando seu entupimento ao transpor a pele. Após passar a pele e o tecido subcutâneo, retira-se o mandril. Deve-se esperar o gotejamento espontâneo, evitando a aspiração, pois poderá contaminar a amostra com sangue^[6]. Em casos de fluxo lento, poderá ser realizado o garroteamento bilateral das jugu-

lares. A quantidade colhida é de 1ml, que deve ser armazenada em frascos separados para cultura e exames de rotina. O exame deverá ser realizado imediatamente para evitar deterioração celular, devendo ser analisado em, no máximo, trinta minutos após a colheita^[15,32,66]. Caso a amostra não possa ser realizada em seguida, pode-se adicionar soro autólogo à amostra, na proporção de um de soro para oito de liquor, podendo-se armazenar sob refrigeração por até 48 horas^[6]. Em casos de grande quantidade de sangue, deve-se armazenar o liquor em tubos com EDTA, para evitar a coagulação^[6].

5.7 Colheita de urina

Para a correta interpretação do exame de urina é importante uma boa colheita^[15], para evitar resultados errôneos, e esta poderá ser feita de quatro maneiras: micção espontânea, compressão manual da bexiga, cateterização, ou cistocentese^[46,66]. Pode-se colher uma amostra fresca de urina de uma bandeja limpa e sem areia ou com areia não absorvente. No entanto, nessa amostra só poderá ser feita uma mensuração de pH, níveis de proteína e densidade, não podendo ser utilizada para avaliar o sedimento ou para análise bacteriológica^[50].

A micção natural ou espontânea tem como vantagem o fato de o proprietário poder realizar a colheita. Deve-se desprezar o primeiro jato da urina, pois poderá conter detritos celulares, leucócitos e exsudatos provenientes da uretra. A urina obtida por micção espontânea não é recomendada quando existe suspeita de cistite bacteriana^[1].

A compressão mecânica constante da bexiga pode ser utilizada para colheita de urina, porém não é recomendado utilizar excessiva compressão digital da bexiga através da parede abdominal. Quando uma pressão digital moderada não estimula a micção, é recomendado utilizar outra técnica^[15,50].

Para a realização da cateterização uretral de gatos é necessária a realização de sedação ou de anestesia do animal, sempre após uma avaliação clínica cuidadosa do estado do paciente. Gatos com obstrução uretral, tanto parcial como completa, podem apresentar lesão renal ou hepática concomitante, tornando o procedimento anestésico mais cauteloso. Posiciona-se o gato em decúbito dorsal. Em macho, segura-se gentilmente a parte ventral do prepúcio, que deverá ser movimentando na direção da cauda de maneira que exponha o pênis. Após a exposição, ele também deverá ser tracionado na direção da cauda^[46]. Introduzir o cateter gentilmente no pênis do gato, lembrando que nunca se deve forçar a passagem da sonda através do canal uretral. Após estar sondado, desprezar os primeiros mililitros e colher em frasco estéril para urinanálise^[46]. Deve-se evitar o uso de substâncias lubrificantes que possam contaminar a amostra, interferindo na urinanálise^[66].

A cistocentese é a coleta de urina diretamente da bexiga. É um procedimento clínico comum e indicado quando é necessário obter urina para cultura microbiana^[46]. É a técnica mais adequada para pequenos animais, de baixo custo e é confiável no tocante ao resultado do exame^[66]. São necessárias seringa (20ml) e agulhas (25 x 8), e é imprescindível que o médico-veterinário tenha certa prática para o procedimento. A bexiga cheia facilita a colheita, e deve-se retirar a maior quantidade possível de urina para evitar extravasamento na cavidade abdominal^[15].

Para a realização dessa técnica o gato deve ser contido em decúbito lateral e devem ser feitas a tricotomia e a antisepsia do abdome. A técnica consiste em introduzir uma agulha acoplada a uma seringa de 5 ou 10ml através da parede abdominal e vesical, na linha média ventral, imediatamente cranial ao púbis^[50]. Uma mão poderá ser utilizada para segurar firmemente a bexiga e a outra guia a agulha. A agulha deverá ser introduzida em um ângulo de 45° em direção caudal^[46]. Caso o paciente não coopere, poderá ser utilizada uma sedação^[15,46].

A urina deve ser armazenada em recipiente limpo, de vidro ou plástico. Para isolamento bacteriano e antibiograma é necessário que o frasco seja estéril^[4]. Independentemente da forma de colheita, a amostra deverá ser refrigerada após 30 minutos da colheita e poderá permanecer na geladeira por até seis horas sem que haja alteração^[15]. Quando não for possível enviar a amostra ao laboratório, deve-se acondicionar a urina em frascos escuros protegidos da luz ambiente, principalmente nos casos em que se deseja mensurar a bilirrubinúria.

5.8 Colheita de fezes

O exame de fezes fornece dados para serem observados tanto macroscópica quanto microscopicamente. Ele poderá trazer informações do trato digestório, tais como presença de parasitas, corpos estranhos, dietas, hemorragias ocultas e presença de bactérias^[15].

É importante identificar a amostra com nome, espécie, raça, sexo e idade do animal^[69,98], informando a data e a hora da colheita^[3]. Para realizar exame coproparasitológico é importante que as fezes sejam recentes e que não tenham entrado em contato com o solo, pois podem existir nematódeos de vida livre, assim como água, urina ou terra que contaminam a amostra. As fezes podem ser colhidas pelo proprietário na bandeja sanitária de seu gato, preferencialmente de superfícies limpas, como jornal ou azulejo, ou ainda coletar da parte superior que não tenha entrando em contato com a areia ou o chão. As fezes formadas devem ser colhidas em um recipiente limpo ou até mesmo em um papel, com espátulas, sacos plásticos ou um frasco limpo apropriado^[69], para depois ser transferida para um frasco com tampa. Deve-se coletar cerca de 5 a 10g de fezes, e para as fezes líquidas, devido à diarreia ou à realização de um enema, a quantidade coletada deverá ser maior, cerca de 20ml^[81].

Caso o felino seja de temperamento linfático, pode-se colher uma amostra diretamente da ampola retal com o auxílio de um termômetro, cotonete ou um *swab*. Essa forma é a mais correta, pois se evita a contaminação das fezes com o solo. Outra forma de colheita de fezes é por meio de aspiração do conteúdo intestinal. Devido à pequena quantidade de fezes utilizada, esses métodos detectam apenas infestações maciças^[81].

As fezes devem ser armazenadas sob refrigeração, pois quando mantidas em baixa temperatura se reduz o risco de eclosão dos ovos, o que poderia levar a um resultado falso negativo dependendo do exame realizado. Esse método de conservação não impede a realização de culturas, pois não altera a capacidade evolutiva dos ovos^[15]. Dessa forma, podem permanecer de 24 a 48 horas^[69]. No entanto, o ideal é que as fezes sejam avaliadas no mesmo dia da colheita pela técnica de centrífugo-flutuação em solutos de sacarose para diagnóstico de parasitos gastrintestinais^[98]. Enquanto em fezes com formato ou pastosas encontram-se facilmente ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários, a pesquisa por trofozoítos necessita de fezes liquefeitas.

A amostra contendo bismuto, bário e óleo mineral não é satisfatória, bem como após o uso de antidiarreicos e antiácidos. Nesses casos, a amostra deverá ser colhida após uma semana. O uso de antibióticos poderá baixar o número de protozoários detectáveis, devendo-se realizar um novo exame. Para alguns parasitos, que são eliminados intermitentemente, são necessários pelo menos três exames, colhidos em intervalos de dois a três dias. As amostras devem ser enviadas ao laboratório logo após a colheita ou, preferencialmente, em menos de duas horas, à temperatura ambiente ou sob refrigeração. Para fezes pastosas ou líquidas esse tempo é crítico, pois caso contenha trofozoítos, estes vão degenerar-se rapidamente. Nunca devemos conservar a amostra de fezes em estufa, pois a temperatura acelera a degeneração de muitos parasitos^[81].

Quando a temperatura for elevada, ou se houver uma previsão maior de demora, as fezes deverão ser conservadas em solução de MIF (0,8ml de mercurocromo a 2%; 50ml de formaldeí-

do a 40%; 10ml de glicerina e 900ml de água destilada), ou em solução de formol a 5%^[81]. O uso dessas soluções conservantes permitirá que o exame seja realizado até semanas após a colheita. Colocam-se 5 a 10g de fezes em um frasco de 20ml, adicionam-se 5 a 10ml da solução conservante e deixa-se à temperatura ambiente. A desvantagem de se utilizar o formol como meio conservante é que em alguns casos ocasiona a distorção de alguns trofozoítos e cistos de protozoários e ainda pode matar larvas móveis de parasitas^[15]. Havendo vermes adultos, o ideal é que estes sejam enviados ao laboratório sem fixação, mergulhados em solução fisiológica ou até mesmo em água, mas nunca dessecados^[81].

Pode-se, ainda, em alguns casos, realizar citologia retal quando não se chega ao diagnóstico através de exames rotineiros, sendo uma alternativa antes de se realizar a biopsia intestinal. O material deve ser colhido por meio de um *swab* retal, se possível, para aumentar as chances de encontrar leucócitos. Um *swab* de algodão é suavemente introduzido de 3 a 4cm pelo ânus na porção terminal do reto, direcionado contra a parede, fazendo movimentos rotacionais várias vezes. Adicionar uma gota de solução salina facilitará a introdução do *swab* sem afetar a morfologia celular. O *swab* de algodão é levemente rolado sobre uma lâmina de microscópio diversas vezes para gerar áreas com espessura variada. Geralmente são feitas três lâminas.

O exame para a contagem de ovos (OPG) deve ser realizado com fezes frescas ou colhidas até 4 horas antes, pois os ovos embrionados, principalmente os *Strongyloides* liberam rapidamente suas larvas em condições favoráveis de temperatura e umidade.

5.9 Raspado de pele

O raspado de pele é um dos testes mais frequentemente realizados em dermatologia veterinária e é recomendado em praticamente todos os felinos com doença dermatológica^[88,107]. É usado primariamente para diagnosticar ou descartar infestações parasitárias. Os melhores locais para se realizar o raspado são a cabeça, a face e as orelhas, nas áreas com crostas ou caspas. O ácaro sarcóptico felino, *Notoedres cati*, é muito mais fácil de encontrar quando comparado ao canino. Os materiais necessários para se realizar um raspado de pele inclui óleo mineral, lâmina de bisturi (com ou sem cabo) ou uma cureta, lâminas de microscopia, lamínulas e um microscópio. Quando há suspeita do ácaro *Notoedres cati*, *Cheyletiella* sp. ou *Otodectes cynotis*, deve-se realizar um raspado superficial, e quando se suspeita de *Demodex*, o raspado deverá ser profundo^[14].

A área a ser raspada deverá estar *tricotomizada* ou livre de pelos (alopecica), uma vez que os pelos interferem no acesso da lâmina na pele, dificultando a remoção do ácaro. Somente em casos em que a infestação é por *Cheyletiella* sp. o raspado deverá ser realizando previamente à tricotomia por ser mais fácil de realizar o diagnóstico. Em casos de suspeita de infestação por esse ácaro, o ideal é realizar um raspado antes e outro após a tricotomia^[107].

Antes de realizar o raspado, a pele poderá ser gentilmente apertada por alguns segundos. Esse procedimento é realizado como tentativa de diminuir o risco de um resultado falso-negativo, pois facilita a saída do ácaro *Demodex cati* do folículo^[88,107]. Em seguida, uma gota de óleo mineral é colocada sobre uma lâmina microscópica e sobre a pele a ser raspada. O óleo na pele facilita a adesão do material, evitando sua dispersão e aumentando as chances de um resultado positivo^[14]. A lâmina de bisturi deverá ser utilizada sempre perpendicularmente à lesão^[88], na direção do crescimento dos pelos^[14]. Uma área de 2 x 2cm de pele deverá ser raspada em cada exame. Após, o conteúdo raspado é colocado sobre a lâmina e uma lamínula é depositada sobre o material extraído; a avaliação é então realizada através de microscopia^[107]. Pelo menos dois a três raspados devem ser realizados antes de se descartar infestação por ácaros^[88].

5.10 Citologia

A avaliação citológica ou histológica das lesões é componente fundamental para o plano diagnóstico dos animais. Apesar de a avaliação histológica ser considerada fundamental, a citologia apresenta algumas importantes vantagens em relação à biopsia, como o fato de ser um procedimento menos invasivo, em que não é necessário submeter o animal à anestesia, apresentar menor taxa de complicações, menor custo e resultado mais rápido^[30,111]. As desvantagens incluem resultados inconclusivos, atribuídos à baixa *celularidade* ou a artefatos e ao erro na interpretação em função de ausência de arquitetura tecidual. O ideal é que os clínicos decidam qual o melhor método de acordo com o paciente e com a característica do tecido e da lesão^[111].

Entre os dois métodos citados, há concordância no diagnóstico de presença ou ausência de neoplasia em 91% dos casos. Em geral, o diagnóstico de linfoma em gatos apresenta um grau maior de dificuldade quando comparado ao dos cães por conta da menor distribuição tecidual e da maior frequência de tipos celulares maduros^[5]. Em geral, a concordância entre o diagnóstico citológico e o histológico foi de 86% para as amostras colhidas guiadas por ultrassonografia contra 67% para as amostras colhidas sem o auxílio do equipamento, sugerindo que a forma de colheita das amostras pode contribuir para a discrepância dos resultados.

A inabilidade de obter uma amostra representativa é um dos principais motivos da diminuição da precisão do diagnóstico por meio de citologia^[111]. Apesar de a citologia ter uma alta especificidade para o diagnóstico de neoplasias, a inflamação concomitante ou a baixa *celularidade* podem levar a erro de interpretação por parte do patologista^[17,111]. Uma amostra com pouca *celularidade* aumenta a chance de um resultado falso-negativo em casos de neoplasia^[17]. A sensibilidade e a especificidade para a detecção de neoplasia em efusões pleurais e peritoneais por meio de exame citológico em gatos é de 61% e 100% respectivamente^[56].

Mais do que a experiência do citopatologista em avaliar a amostra, a qualidade da amostra submetida é o principal fator determinante para se obter o diagnóstico correto^[17,74]. Na avaliação citológica, o clínico tem a responsabilidade não só de colher uma quantidade representativa da amostra, mas também de preparar os slides a serem avaliados e, muitas vezes, de corar as lâminas. Se o material a ser avaliado for colhido por meio de um *swab* ou cotonete estéril, pode-se rolá-lo na lâmina para microscopia. Locais em que se colhe material dessa forma são o conduto auditivo, a vagina, a conjuntiva ocular, entre outros^[74].

- **Colheita de amostra para citologia com agulha fina**

A citologia com agulha fina (CAF) pode ser realizada utilizando-se uma seringa padrão e uma agulha, com ou sem aspiração. A CAF é um método de avaliação bem aceitável para avaliação de órgãos internos e massas pelo fato de ser minimamente invasiva. Este método tem a vantagem de obter as células profundas, do centro da lesão, evitando a contaminação superficial com outras células e organismos que frequentemente aderem aos *imprints*, *swabs* e raspados. A citologia é uma das técnicas de patologia clínica mais indicadas para a identificação de doença fúngica. A realização de exame citológico de fluidos de cavidades do corpo, pele, tecidos moles e massas de um órgão interno aspirado, lavado broncoalveolar, urina e fezes podem fornecer um diagnóstico definitivo da doença fúngica caso o organismo esteja presente em número suficiente dentro dos tecidos. A urina e as fezes muitas vezes são negligenciadas como amostra citológica^[34].

O ideal é utilizar uma seringa de 3 a 20ml e agulhas de 21 a 25 *gauge* para fazer a CAF. Quanto mais macio for o tecido, menor deverá ser o tamanho da agulha e da seringa utilizadas. As agulhas maiores tendem a causar contaminação da amostra com sangue.

Tecidos macios, tais como os linfonodos, podem ser aspirados com uma agulha de 3ml. Tecidos firmes, como os fibromas e os carcinomas de células escamosas, requerem o uso de seringas maiores para manter uma boa pressão negativa para colher um número suficiente de células. A seringa de 10ml é uma ótima opção quando a textura do tecido é desconhecida.

Caso sejam realizados testes microbiológicos, ou a região a ser punctionada for uma cavidade (tórax, articulação, abdome), a área deverá ser preparada de forma cirúrgica. Em outros casos, a preparação da pele é a mesma dos procedimentos de *venopunção*. Se a pele do animal não estiver com grandes sujidades, a limpeza com álcool ou clorexidine é suficiente.

Para a realização da CAF aspirativa, a massa é estabilizada com uma das mãos, enquanto a agulha (acoplada na seringa) é inserida no centro da massa. Uma forte pressão negativa é aplicada aspirando-se 3/4 do volume total da seringa. Se a massa é suficientemente grande e o paciente estiver contido, a pressão negativa pode ser mantida enquanto se movimenta a agulha para trás e para a frente, passando por aproximadamente 2/3 do diâmetro da massa. Em massas bem extensas, múltiplas amostras devem ser colhidas.

A pressão negativa não deve ser aplicada por muitos segundos em uma mesma área. Frequentemente, o material não é visível na seringa ou no canhão da agulha; mesmo assim, uma amostra adequada já foi obtida. Com excessiva força ou aplicação prolongada de pressão negativa ocorre o rompimento de vasos sanguíneos e, eventualmente, ocorre contaminação com sangue periférico, diluindo as células teciduais e impossibilitando o diagnóstico da amostra.

Após aspirar a massa em várias áreas, a pressão negativa é liberada, retira-se a agulha da massa e desconecta-se da seringa. Após isso, deve-se encher a mesma seringa de ar, reconectar a agulha na seringa e expelir o conteúdo em uma lâmina microscópica pelo rápido esvaziamento da seringa. Esse procedimento pode ser realizado várias vezes, utilizando várias lâminas até ter certeza de que todo o conteúdo foi expelido.

Recentemente, muitos autores têm relatado a CAF sem a aplicação de pressão negativa, obtendo-se uma amostra de igual ou melhor qualidade do que a técnica aspirativa. A técnica não aspirativa funciona muito bem para muitas massas, principalmente aquelas que são muito vasculares. A técnica é similar à técnica aspirativa, exceto que não se aplica a pressão negativa. Utiliza-se uma agulha de 21 ou 22 gauge e seringas de 5 e 10ml. A amostra deverá ser expelida o quanto antes para evitar seu ressecamento e sua coagulação. O ideal é que sejam feitas várias lâminas para evitar que seja necessário repetir o procedimento^[74].

Existem várias razões para que apenas um slide não seja diagnóstico. O slide pode não ter quantidade suficiente ou a amostra não representa uma área da lesão e sim uma área adjacente ou uma área de inflamação e necrose dentro do neoplasma. Além disso, algumas lesões podem não descamar muito bem. Por isso, quanto mais lâminas puderem ser enviadas, mais fácil será chegar ao diagnóstico. Se múltiplas massas forem avaliadas, sempre mude a agulha e a seringa para cada massa, para evitar contaminação.

Quando um vaso sanguíneo romper dentro da lesão, haverá grande contaminação com sangue periférico; por isso, também se recomenda a troca da seringa e da agulha nesses casos^[74]. As duas maiores causas de contaminação com sangue são o uso de agulhas muito grandes e o tempo de aspiração prolongado. Algumas lesões são altamente vascularizadas, sendo difícil evitar a contaminação com sangue periférico. Nesses casos, recomenda-se utilizar a CAF não aspirativa^[17,74].

• **Esfregaço ou *imprints***

Esfregaços de impressão, ou *imprints*, podem ser realizados em lesões superficiais ulceradas e exsudativas ou de tecido colhido cirurgicamente ou através de necropsia. Frequentemente são observadas células inflamatórias, bactérias e fungos nesses esfregaços, sempre lembrando que

bactérias podem ser em decorrência de uma contaminação secundária. Células neoplásicas não esfoliam em exsudatos ou em *imprint* de massas ulceradas. Se possível, uma CAF do tecido adjacente à área ulcerada deve ser realizado em adição ao *imprint*.

Antes de se realizar o *imprint*, a lesão deve ser limpa com gaze embebida em solução salina estéril. Em casos de tecidos colhidos durante a cirurgia ou necropsia, primeiramente o tecido deverá ser cortado para que se faça o esfregaço de uma porção mais fresca e limpa. Sangue ou líquidos excessivos deverão ser removidos, pois inibem a adesão celular no vidro da lâmina, levando a uma amostra pobre em células. Além disso, os líquidos impedem que as células se espalhem e assumam o tamanho e o formato que usualmente teriam em esfregaços secos. Depois disso, a superfície da lesão é pressionada levemente na lâmina e removida, sem esfregar a amostra na lâmina. Assim que tiver realizado um número suficiente de lâminas, o tecido poderá ser armazenado em formalina para posterior realização de histopatologia, caso necessário^[74].

O uso de plástico rígido ou isopor é adequado para que as lâminas possam ser remetidas sem que haja ruptura. Caso não se tenha esses materiais disponíveis, podem-se envolver as lâminas em papel toalha e posteriormente acondicioná-las em uma caixa de papelão. É preciso lembrar que todo o material enviado a um laboratório externo deverá ser etiquetado com o nome do paciente e do proprietário e a localização de onde a amostra foi colhida.

Como citado anteriormente, as lâminas utilizadas para citologia (ou hematologia) deverão ter uma das bordas fosca ou colorida, permitindo que se identifique a lâmina com um lápis, evitando a troca das amostras. A tinta de canetas de marcação (mesmo os chamados marcadores permanentes) é solúvel em corantes e fixadores citológicos e é removida durante o preparo da lâmina^[74]. As lâminas de citologia ainda não coradas nunca devem ser enviadas próximas às amostras com formalina, pois esta poderá estragar a amostra, tornando-a impossível de ser avaliada posteriormente^[74]. O êxito da utilização da citologia depende da natureza da lesão, da qualidade da amostra e do grau de comunicação entre o veterinário e os citopatologista.

6. COLHEITA DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM SUÍNOS

6.1 Colheita de sangue

Pelo fato de o sangue se difundir por todo o corpo do animal (exceto cerdas, dentes e córneas), qualquer enfermidade que acometer o animal causará alterações diretas ou indiretas nos diferentes padrões sanguíneos, que são relativamente constantes e podem facilmente ser mensurados. Além disso, o estudo sorológico permite, em muitas ocasiões, não só a identificação da presença de determinados抗ígenos, mas também possibilita estudar histórico de contato com eles. Dependendo do ensaio e dos objetivos, pode ser enviado ao laboratório de diagnóstico sangue total, plasma ou soro. A colheita de sangue pode ser realizada com ou sem a presença de anticoagulante.

Durante a colheita, deve-se ter o cuidado de retirar a agulha da seringa antes de depositar o sangue no tubo, deixando escorrer lentamente pelas paredes do tubo de coleta para evitar a hemólise. Em se tratando de amostras de sangue com anticoagulante, deve-se ter o cuidado de homogeneizar a amostra de sangue com movimentos circulares ou inversão do tubo de forma a misturar o sangue com o anticoagulante e evitar a formação do coágulo. A recomendação de usos dos principais anticoagulantes utilizados na colheita de sangue estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Principais anticoagulantes, recomendações e contra indicações de uso.

Anticoagulante	Dosagem (ml de sangue)	Recomendações	Contra indicação de uso
EDTA	1mg/ml	Culturas bacteriológicas	Culturas de células linfoides. É importante considerar que o EDTA é quelante de cálcio, limitando seu uso dependendo dos parâmetros objetivados
Heparina de sódio e lítio	75UI/ml	Culturas bacteriológicas e de células linfoides	Exames de sedimentação
Citrato de sódio	38mg/ml	Coleta de sangue para exames de coagulação e sedimentação	Interfere em alguns parâmetros químicos

- **Obtenção de sangue total**

O sangue deve ser colhido em condições de esterilidade com anticoagulante. O sangue total pode ser empregado na cultura microbiológica; no hemograma completo (contagem global de hemácias, leucócitos, plaquetas, determinação do hematocrito; VCM; HCM; CHCM, e dosagem de hemoglobina), na dosagem de metabólitos (glicose, corpos cetônicos, ácido láctico, amônia), na presença de metais (chumbo, zinco, manganês, molibdênio e cádmio) ou em substâncias tóxicas e em pesquisa de hemoparasitos. A amostra deve ser processada em um prazo máximo de 24 horas. Os valores hematológicos de referência para suínos estão descritos na Tabela 9.

- **Obtenção de plasma sanguíneo**

O plasma é o sobrenadante do sangue total, com anticoagulante, após centrifugação. O sangue com anticoagulante pode ser centrifugado a 2.600rpm durante 8 minutos. Em seguida, o plasma (fração líquida acelular ou sobrenadante) deve ser colocado em outro reservatório. O plasma pode ser utilizado para determinação de fatores da coagulação (fibrinogênio, tromboplastina), metabólitos e em determinados ensaios sorológicos.

- **Obtenção de soro sanguíneo**

O soro é a porção líquida do sangue obtida após a completa coagulação, ou seja, sem proteínas ativas da coagulação^[84]. Para a obtenção do soro o sangue deve ser colhido sem anticoagulante. Todos os materiais utilizados na coleta (seringas e agulhas) devem estar secos e limpos, pois a presença de água implica a diluição do sangue, lise das células e liberação de hemoglobina no plasma.

Após a colheita, inclinar o tubo e deixá-lo à temperatura ambiente até o sangue coagular e retrair o coágulo (30 a 60 minutos), exsudando o soro (fração líquida, limpida), que deve ser colocado em outro reservatório. Quando em ambiente laboratorial, recomenda-se colocar a amostra de sangue na estufa a 37°C durante 30min (expansão do coágulo). Em seguida, 30min na geladeira (retração do coágulo), e realizar centrifugação a 1.500rpm durante 5min. Finalmente, transferir o sobrenadante para reservatório destinado ao armazenamento.

O soro pode ser armazenado sob refrigeração de 2 a 8°C. Caso seja necessário conservar o soro por longo período, ele pode ser congelado a -20°C. Jamais congelar o soro juntamente com o coágulo, pois à medida que ocorre o descongelamento, ocorre também à hemólise. O rendimento de soro é de aproximadamente 10% a 30% da quantidade total de sangue colhido^[20,28,83]. As amostras de soro devem possuir aspecto límpido, sem hemólise, sem coágulo.

Tabela 9. Valores hematológicos de referência, tipo de amostra e volume recomendado para realização do exame.

Variável analisada	Unidade de medida*	Fase de produção				Tipo de amostra a coletar	Volume da amostra a coletar
		Leitões desmamados	Animais de engorda	Marrãs	Porca		
Hemoglobina	g/L	90 a 140	100 a 150	120 a 170	100 a 170	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Hematócrito	L/L	0,26 a 0,41	0,19 a 0,42	0,33 a 0,45	0,29 a 0,46	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Eritrócitos	$\times 10^{12}/L$	5,3 a 8	5,7 a 8,3	5,9 a 8,7	5,1 a 8	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
VCM ⁽¹⁾	fL	42 a 62	44 a 56	48 a 62	52 a 63	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
HCM ⁽²⁾	pg	14 a 21	15 a 20	17 a 22	18 a 22	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
CHCM ⁽³⁾	g/L	320 a 360	320 a 330	340 a 380	340 a 380	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Leucócitos	$\times 10^9/L$	8,7 a 37,7	11,6 a 32,9	11,2 a 28,8	10,6 a 24,0	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Bastonetes	$\times 10^9/L$ %	0 a 3,1 0 a 13	0 a 1,9 0 a 8	0 a 0,7 0 a 2,8	0 a 0,6 0 a 3,3	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Neutrófilos segmentados	$\times 10^9/L$ %	2,5 a 23 16,6 a 73,1	0,3 a 15,2 4,4 a 62,1	1,4 a 11,6 11,1 a 53,6	1,9 a 10,9 15,1 a 59,5	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Linfócitos	$\times 10^9/L$ %	2,2 a 16 12,5 a 70,1	3,6 a 18,5 22,1 a 78,0	3,9 a 16,8 30,4 a 74,5	3,7 a 14,7 25,5 a 71,1	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Monócitos	$\times 10^9/L$ %	0,001 a 5 0 a 17	0 a 4,9 0,1 a 20,1	0 a 4 0,2 a 20,8	0 a 2,4 1 a 14	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Eosinófilos	$\times 10^9/L$ %	0 a 1,8 0 a 6	0 a 2,5 0 a 11,1	0 a 3,3 0 a 16,9	0 a 2,4 1 a 13	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Rubrócitos	$\times 10^9/L$ %	0 a 0,2 0 a 1	0 a 0,3 0 a 1	0 a 0,3 0 a 1,8	0 a 0,2 0 a 1	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)
Desintegrados	$\times 10^9/L$ %	0 a 1,7 0 a 7,4	0 a 3,3 0 a 14,2	0 a 1,7 0 a 5,9	0 a 1,5 0 a 9,3	Sangue total c/ anticoagulante (EDTA)	5ml (vacutainer)

* Valores obtidos no sangue: fL = fentolitro; g = grama; L = litro; pg = picograma.

(1) Volume corporcular médio; (2) Concentração média de hemoglobina; (3) Concentração corporcular média de hemoglobina.

Fonte: Adaptado de Moreno, et al. (1997)^[6]; Muirhead (1981)^[7]; National Veterinary Services Laboratories (2006)^[8]; Sims e Glastonbury (1996)^[12]; Sobestiansky, et al. (2005)^[13]; Straw, et al. (2006)^[14]

O soro pode ser utilizado em ensaios para a pesquisa de proteína séricas (proteína total, albumina e globulina), eletrólitos (concentração de sódio, cálcio, potássio, magnésio, fosfato inorgânico e cloro), microelementos (concentração de ferro, cobre e zinco), metabólitos (glicose, nitrogênio residual, ureia, creatina, bilirrubina e outros), lipidograma (lipídios totais, triglicerídeos, ácidos graxos saturados, colesterol), atividade enzimática sorológica (colinesterases, fosfatases, desidrogenases e outras) e sorodiagnóstico (pesquisa de anticorpos)^[28,110,114]. Os valores bioquímicos de referência para suínos estão descrito na Tabela 10.

É importante considerar que, para muitas doenças, é necessária a coleta de amostras de soro de forma pareada (coletar dos mesmos animais com intervalos de 21 dias) para ser observada a evolução do título de anticorpos ou soro conversão.

- **Esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitos**

Para a pesquisa de hemoparasitos deve-se dar preferência a sangue coletado de vasos periféricos, como as veias auriculares. Fazer um esfregaço fino sobre uma lâmina de vidro usando uma gota de sangue e deixar secar à temperatura ambiente. Em seguida, fixar e corar com Giemsa. Caso necessário, o sangue pode ser coletado em tubo com anticoagulante e enviado para processamento laboratorial^[84,130].

6.1.1 Procedimentos para a colheita de sangue

Para a realização da coleta de sangue, independentemente da técnica utilizada, o animal deve estar adequadamente contido como forma de garantir o mínimo de estresse para ele e o máximo de segurança para o operador. Esses procedimentos exigem do operador um mínimo de prática e experiência.

Dependendo da quantidade de sangue desejada, do tamanho do animal e da prática do operador, deve-se definir a via de acesso de eleição para a coleta de sangue (Tabela 11). Os principais pontos de acesso à circulação sanguínea para a coleta de sangue são:

a) **Veia cava cranial:** acessar o vaso pelo lado direto do animal devido à menor inervação vagal e menor vulnerabilidade do nervo frênico. O acesso pode ser realizado com o animal em pé ou em decúbito dorsal. O ponto de punção está localizado na base cervical, no ponto intermediário entre a espinha da escápula e o manúbrio, 2 a 3cm à frente e lateral (lado direito) do manúbrio (ponta do esterno), onde é possível visualizar um sulco (sulco da veia jugular). A agulha deve ser introduzida em uma posição caudo-dorsal, perpendicular à pele, dirigida ao espaço cuneiforme. Essa via fornece sangue em grande quantidade e com baixa possibilidade de contaminação^[28,113,114].

b) **Veia jugular:** acessar o vaso pelo lado direto do animal. Puncionar o vaso a aproximadamente 5cm da entrada do tórax no sulco jugular^[79,82,126].

c) **Seio venoso oftálmico:** puncionar no canto mediano do olho, perfurando a membrana nictitante, até acessar o seio venoso orbital^[79,82].

d) **Veias auriculares:** aplicar um garrote na base da orelha; à medida que a veia se torna ingurgitada, puncionar (manter a agulha com o bisel do canhão voltado para cima).

e) **Outros pontos de acesso utilizados para a coleta de sangue:** apesar de pouco utilizado, devido a suas limitações, ainda podem ser citados a veia cefálica, os vasos da cauda e a punção cardíaca^[79,82,113].

Tabela 10. Valores bioquímicos de referência, tipo de amostra e volume recomendado para realização do exame

Variável analisada	Unidade de medida*	Fase de produção			Tipo de amostra	Volume da amostra
		Leitões desmamados	Animais de engorda	Marras		
Albumina	g/L	19 a 39	19 a 42	32 a 44	31 a 43	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
AST ⁽¹⁾	U/L	8 a 46	15 a 46	17 a 56	19 a 76	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
ALT ⁽²⁾	U/L	21 a 94	16 a 67	12 a 65	36 a 272	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Amilase	U/L	528 a 2616	813 a 4626	643 a 4668	432 a 2170	Soro ⁽⁴⁾ 5ml (vacuttainer)
Bilirrubina conjugada	mmol / L	0,9 a 3,4	0 a 1,7	0,1 a 1,7	0 a 1,7	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Bilirrubina livre	mmol / L	0 a 3,4	0 a 3,4	0 a 3,4	0 a 3,4	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Bilirrubina total	mmol / L	0,9 a 3,4	0 a 3,4	0 a 3,4	0 a 3,4	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
C.K ⁽³⁾	U/L	81 a 1586	61 a 1251	89 a 886	120 a 10990	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Cálcio	mmol/L	2,02 a 3,21	2,16 a 2,92	2,22 a 2,91	1,98 a 2,82	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Colesterol	mmol/L	1,06 a 3,32	1,37 a 3,18	1,37 a 2,70	1,23 a 2,74	Soro ⁽⁴⁾ 5ml (vacuttainer)
Creatinina	mmol/L	67 a 172	77 a 165	106 a 225	110 a 260	plasma/urina com heparina 5ml (vacuttainer)
Ferro	mmol/L	3 a 38	39 a 43	11 a 35	9 a 34	Soro / sangue c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Fosfatase alcalina	U/L	142 a 891	180 a 813	115 a 434	36 a 272	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Fósforo	mmol/L	1,46 a 3,45	2,25 a 3,44	8,88 a 2,78	1,49 a 2,76	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Glicose	mmol/L	3,5 a 7,4	4 a 8,1	3 a 6,3	2,9 a 5,9	Sangue total c/ anticoagulante (fluoreto de sódio) 5ml (vacuttainer)
Proteína total	g/L	44 a 74	52 a 83	65 a 81	65 a 90	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Sg. GSHPx	U/gHb**	30 a 137	40 a 141	57 a 106	54 a 99	Sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)
Ureia	mmol / L	2,9 a 8,89	2,47 a 8,57	7,7 a 9,6	2,1 a 8,5	Soro ⁽⁴⁾ / sangue total c/ anticoagulante (heparina) 5ml (vacuttainer)

* Valores séricos, com exceção da Glutatona peroxidase (GSHPx).

** U = Unidade internacional; gHb = grama de hemoglobina.

⁽¹⁾ Aspartato aminotransferase; ⁽²⁾ Alanino aminotransferase; ⁽³⁾ Creatininaquinase. ⁽⁴⁾ coleta de soro: Rendimento de aproximadamente 10% a 30% da quantidade total de sangue colhida.

Fonte: Adaptado de Canadian Food Inspection Agency (2002)^[11]; Moreno, et al. (1997)^[6]; Muirhead (1981)^[7]; National Veterinary Services Laboratories (2006)^[8]; Sims e Glastonbury (1996)^[12]; Straw, et al. (2006)^[14].

Tabela 11. Principais vias de acesso à coleta de sangue, recomendações de faixa etária, metodologia, vantagens e limitações das técnicas.

Via de acesso	Fase de produção (peso vivo)	Tamanho da agulha (mm) / método	Vantagens da via	Limitações da via
Veia cava cranial	Maternidade (2 a 8kg)	Punção com agulha 25/8	Pode ser eleita para qualquer idade; de fácil acesso; permite a coleta de grande volume de sangue e com qualidade	Riscos de hemorragias; risco de lesão vagal ou frênic;a; necessita prática
	Creche (8 a 24kg)	Punção com agulha 40/10		
	Recria e terminação (24 a 120 kg)	Punção com agulha 50/15		
	Reprodutores	Punção com agulha 100/20		
Veia jugular	Maternidade (2 a 8kg)	Punção com agulha 25/8	Pode ser eleita para qualquer idade; de fácil acesso; permite a coleta de grande volume de sangue e com qualidade	Requer prática
	Creche (8 a 24kg)	Punção com agulha 40/10		
	Recria e terminação (24 a 120 kg)	Punção com agulha 50/15		
	Reprodutores	Punção com agulha 50/15		
Veias da orelha	Reprodutores	Incisão da veia auricular com lâmina de bisturi	Fácil acesso; mais de 10ml	Processo lento; contaminação da amostra; hematomas
		Punção com agulha 25/8		
Veias da cauda	Maternidade (2 a 8kg)	Amputação com Lâmina de bisturi	Exige pouca prática; possibilita a obtenção de aproximadamente 2ml	Processo lento; obstrução da agulha, pequeno volume
	Recria e terminação (24 a 120 kg) e reprodutores	Punção com agulha 25/8	Fácil acesso, obtenção de 5 a 10 ml	Processo lento; obstrução da agulha; pequeno volume; requer prática
		Perfuração do seio orbital com agulha 25/8	Volume de 5 a 10ml	
Seio orbital	Maternidade (2 a 8kg) e creche (8 a 24kg)	Perfuração do seio orbital com agulha 40/8	Volume de 5 a 10ml	Processo lento; possível hemorragia após a coleta; pouco estético
	Recria e terminação (24 a 120 kg) e reprodutores	Perfuração do seio orbital com agulha 40/8		
Veia cefálica	Maternidade (2 a 8kg) e creche (8 a 24kg)	Punção com agulha 40/10	Pode ser repetido sem riscos; volume de 5 a 10ml	Contenção difícil

Fonte: Adaptado de Canadian Food Inspection Agency (2002)^[11]; Moreno, et al. (1997)^[6]; Muirhead (1981)^[7]; National Veterinary Services Laboratories (2006)^[8]; Sims e Glastonbury (1996)^[12]; Sobestiansky, et al. (2005)^[13]; Straw, et al. (2006)^[14].

6.1.2 Quantidade de sangue a ser coletada e conservação

O sangue representa cerca de 8% a 10% do peso corporal de um animal. Para ser representativas, as amostras de sangue devem ter sua composição e integridade mantidas durante as fases pré-analíticas de colheita, manuseio, transporte e eventual armazenagem.

O volume de sangue necessário é variável de acordo com o tipo de exame solicitado. De maneira geral, recomenda-se um volume de 5 a 10 ml de sangue total e 2 a 4ml de soro ou plasma. O sangue total deve ser enviado ao laboratório no prazo máximo de 24 horas conservado sob refrigeração de 4 a 8°C. No caso do soro ou plasma, se a amostra não for enviada imediatamente para o laboratório de diagnóstico, ela pode ser congelada por tempo indeterminado.

6.2 Colheita de líquido cefalorraquidiano (LCR)

De modo geral, a coleta de líquido cefalorraquidiano destina-se à cultura bacteriana nos casos de meningite ou septicemia. Deve-se coletar com agulhas e seringas estéreis em animais vivos anestesiados. Os parâmetros bioquímicos de referência para o líquido cefalorraquidiano estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Valores normais da composição do líquido cefalorraquidiano.

Componente	Valor
Linfócitos	1 a 20 / ml
Glicose	45 a 87mg / 100ml
Proteínas totais	24 a 29 mg / 100ml
Albumina	17 a 24 mg / 100ml
Globulina	5 a 10 mg / 100ml
Eritrócitos	Ausentes

Fonte: Adaptado de Canadian Food Inspection Agency (2002)^[11]; Moreno, et al. (1997)^[6]; Muirhead (1981)^[7]; National Veterinary Services Laboratories (2006)^[8]; Sims e Glastonbury (1996)^[12]; Sobestiansky, et al. (2005)^[13]; Straw, et al. (2006)^[14].

A punção deve ser realizada no espaço lombossacral utilizando agulhas com calibre e tamanho proporcionais à idade do animal. O local da punção deve ser inicialmente lavado e, em seguida, submetido a assepsia com álcool 70% ou álcool iodado. Em geral, pode ser colhido um volume de até 5ml de um animal de 100kg. Após a aspiração, deve ser transferido para um frasco estéril com heparina. É conveniente que agulha e seringa sejam tratadas previamente com solução de heparina^[28,127,131].

6.3 Colheita de leite

A coleta de amostras de leite em suíños é bastante difícil em decorrência das características anatômicas do aparelho mamário da fêmea. Normalmente, a colheita é realizada com fins de pesquisa científica. Para realizar a coleta, deve-se proceder à higienização e à assepsia dos tetos, desprezando o primeiro jato. A colheita deve ser realizada, de preferência, em tubos estéreis de boca estreita para evitar contaminações^[110,131].

6.4 Colheita de urina

O exame de urina tem importância semiológica considerável, pois além de informar com precisão o estado dos diversos órgãos componentes do aparelho urinário, pode fornecer valiosos dados sobre as funções de outros órgãos, particularmente do fígado e dos intestinos. A urina pode ser analisada sob diversos aspectos: físico, químico, microscópico e bacteriológico. A coleta de urina pode ser realizada para fins experimentais, com avaliação individual ou de uma granja, com ou sem sinais clínicos^[42,83,110,114].

Deve-se colher uma amostra da segunda metade da primeira micção da manhã, antes do primeiro arraçoamento das fêmeas. À noite, as fêmeas se movimentam, urinam e bebem água com menor frequência, tornando a primeira urina da manhã a mais concentrada e representativa. A urina deve ser colhida com a máxima assepsia. As amostras de urina destinadas aos exames bacteriológico/micológico e físico-químico devem ser colhidas em recipiente limpo e estéril, que somente deve ser aberto após a fêmea iniciar a micção, tendo o cuidado para não contaminar a amostra com sujidades do corpo do animal ou presente nas instalações.

Colher aproximadamente 15 a 20ml de urina. Não adicionar nenhum tipo de produto conservador à amostra de urina e remetê-la no prazo máximo de 24 horas, sob refrigeração. Os parâmetros de referência para urina de suínos estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Valores bioquímicos normais de urinas de suínos sadios

Dados de referência	Valores de referência (mmol/L)
Creatina	1,56 a 40,29
Ureia	0 a 589,12
Sódio	6,5 a 121,51
Potássio	2,52 a 300,16
Cálcio	0,03 a 49,24
Fósforo	0 a 55,37
Glicose	0,04 a 8,9
Lactato	0,03 a 8,2

Fonte: Adaptado de Sobestiansky, et al. (2005)^[13]; Straw, et al. (2006)^[14].

6.5 Colheita de amostras clínicas utilizando suabes

As amostras clínicas colhidas com auxílio de suabes podem ser utilizadas para diversos ensaios diagnósticos, como exames microbiológicos, parasitológicos e moleculares. As principais aplicações da colheita de amostras clínicas ou ambientais utilizando suabes são:

- **Suabe de sistema nervoso central:** antes de separar a cabeça para a retirada do cérebro e das meninges, posicionar o animal em decúbito dorsal. Desarticular os ossos atlas e occipital e expor a medula espinhal. Introduzir o suabe na posição dorsal à medula até o interior da caixa craneana, acessando (líquido cefalorraquidiano) a superfície cérebro-meningeal (pia aracnoide, ventrículo, plexo coroide). O procedimento pode ser realizado nos casos de meningite estreptocócica para isolamento de *Streptococcus suis*.

- **Suabe de conteúdo retal, canal vaginal, cavidades nasais:** introduzir o suabe profundamente em movimentos de rotação.
- **Suabe de superfícies serosas e mucosas:** atritar o suabe sobre a superfície, rotacionando a haste a fim de estabelecer contato íntimo com toda a superfície do bulbo do suabe.
- **Suabe de fluidos cavitários:** colocar o suabe em contato com o fluido até embeber completamente o bulbo, em movimentos de rotação.
- **Suabe de fezes no ambiente:** coletar o material fecal, evitando o contato do suabe com superfícies adjacentes.
- **Suabe de instalações:** para tal procedimento, podem preferencialmente ser utilizados suabes de arrasto. Podem ser usados: suabe de arrasto estéril próprio (composto por duas gazes de 10 x 12cm amarradas a um cordão em Y); nesse caso, segurar o suabe pelo cordão e arrastar em contato direto com a superfície da instalação (baia ou pavilhão) que se quer amostrar. Outra possibilidade é usar como suabe de arrasto um “pro-pé” (protetor de calçados de uso hospitalar) ume-decido em água peptonada, fazendo uma caminhada pela instalação que se quer amostrar (baia ou pavilhão). Ao finalizar a coleta, imergir o suabe imediatamente em água peptonada tamponada.

6.6 Colheita de fezes

A colheita de fezes pode ser destinada à realização de exame parasitológico, microbiológico (bacteriológico, virológico) ou químico (intoxicações).

- **Colheita de fezes para exame coprológico**

As amostras de fezes devem ser coletadas, preferencialmente, diretamente da ampola retal do animal, usando luva ou saco plástico. Para facilitar a obtenção da amostra fecal, fazer uma massagem na parede dorsal da ampola retal com o dedo da mão enluvada ou com saco plástico. Não é aconselhada a coleta de fezes do chão, pois é desconhecido o tempo decorrido desde a defecação e a proliferação acidental de larvas de vida livre ou dessecação podem mascarar os resultados do exame. Colher aproximadamente 10g de material fecal e acondicionar em frascos ou sacos plásticos. Conservar sob refrigeração 2 a 8°C. Não congelar as amostras.

- **Colheita de fezes para exames microbiológicos**

Neste caso, as fezes devem, obrigatoriamente, ser colhidas direto da ampola retal do animal, procurando extrema assepsia no procedimento. Para o procedimento, pode ser utilizado suabe ou mão enluvada. Quando a amostra é destinada a ensaios baseados na PCR, não devem ser utilizados suabes com meio de transporte. O material deve ser mantido sob refrigeração. Por se tratar de material com uma microbiota extremamente rica, e neste caso a proliferação pós-coleta pode comprometer o resultado do exame, o processamento laboratorial deve ocorrer em, no máximo, 24 horas após a colheita.

6.7 Raspados cutâneos

Os raspados cutâneos permitem o diagnóstico de ectoparasitas (sarnas), infecções bacterianas (estafilocócicas) e infecções fúngicas (tinha) em animais vivos e também em animais necropsiados. Em algumas afecções de pele, o exame microscópico de raspados de pele é imprescindível para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo, como nos casos de sarna sarcóptica.

O raspado deve ser realizado nas zonas limítrofes das lesões, iniciando em uma região aparentemente saudável em direção à área lesada, utilizando bisturi ou cureta obstétrica. Colocar o

material raspado sobre uma lâmina de microscópio previamente pincelada com óleo ou glicerina para garantir uma melhor aderência e fixação do material. Em seguida, recobrir com outra lâmina. O raspado deve ser profundo, considerando-se a amostra como pronta quando o local apresentar coloração avermelhada ou sangramento. Realizar o raspado em áreas diferentes da pele, evitando a presença de grande quantidade de pelo ou crostas^[20,28]. A área mínima a ser coletada para uma amostra é de 2,5cm².

6.8 Colheita de amostras por ocasião da necropsia

Dependendo tanto do processo que se deseja diagnosticar (suspeita clínica) quanto das informações obtidas por resultado da necropsia (lesões macroscópicas), o material colhido pode ser submetido a diferentes ensaios laboratoriais, como exame histopatológico, bacteriológico, virológico, toxicológico, imuno-histoquímico, parasitológico e ensaios moleculares.

• Colheita de amostras clínicas para exames microbiológicos

É importante, antes de iniciar o procedimento de necropsia, estabelecer e planejar a rotina de colheita de material para exames microbiológicos, sempre tendo em vista condições de máxima assepsia possível. Pressupondo o isolamento e a identificação de agentes infecciosos (vírus, bactérias e fungos) seguir orientações como:

a) Planejar a coleta de material para exame microbiológico (bacteriológico, virológico e micológico) tendo em vista a preparação dos materiais necessários (sacos plásticos, frascos, tubos, pinças, bico de Bunsen, barbante, seringas, etc.), sem perder de vista extremas condições de assepsia.

b) Todos os órgãos e tecidos devem, obrigatoriamente, ser individualizados, em recipiente estéril (em sacos plásticos ou frascos), hermeticamente fechado, resistente, não quebrável e adequadamente protegido contra vazamentos, principalmente amostras dos sistemas orgânicos com microbiota bem estabelecida, como dos sistemas gastrintestinal e respiratório. Jamais colocar o intestino na mesma embalagem com outros órgãos. Quando são usadas seringas estéreis para coleta de fluidos (líquido sinovial, pericárdico, etc.), eles podem ser enviados na própria seringa usada para colheita desde que se tenha o cuidado de, após aspirar o material, expelir o ar e ocluir o orifício^[35,109].

c) Para obter de forma correta os diferentes segmentos intestinais, seja para realização do esfregaço de mucosa, seja para exame microbiológico, é recomendado fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou bolsa) e realizar a incisão entre elas, evitando o extravasamento do conteúdo a consequente contaminação de outros órgãos com conteúdo intestinal. Se durante a necropsia for desejado apenas colher uma amostra do conteúdo intestinal, deve-se abrir um pequeno orifício no segmento intestinal alvo, introduzir a cabeça do suave e girar suavemente, a fim de recolher uma quantidade satisfatória de conteúdo intestinal. É importante certificar-se de que os segmentos intestinais amostrados estejam relacionados com a suspeita clínica.

d) A amostra clínica deve ser colhida na fase aguda da doença em animais vivos, fazendo-se a eutanásia ou a necropsia logo após a morte.

e) Para isolamento bacteriológico é imprescindível que o animal não esteja sendo submetido a tratamentos com antimicrobianos, pois aumenta a possibilidade de resultados falsonegativos.

As amostras destinadas a exames microbiológicos devem ser protegidas contra deterioração após a colheita. Devem-se prevenir ou minimizar danos por dessecação, oxidação, aquecimento e atividade enzimática das próprias células teciduais e microbiota, além dos fluidos com os quais está em contato. O procedimento mais importante para minimizar esses danos é o rápido processamento das amostras. Quando isso não for possível, deve-se proceder à refrigeração em 2 a 8°C em trânsito, o que permite a conservação satisfatória das amostras por até 24 horas. A colocação de gelo reciclável supre essa necessidade.

A remessa de suabes deve ser feita preferencialmente em meio de transporte que não permita o crescimento, mas proporcione umidade, pH fisiológico estável e baixo potencial de óxido-redução, prolongando a viabilidade dos microrganismos em trânsito. Jamais congelar ou colocar as amostras em formol ou conservante químico quando destinadas ao exame bacteriológico.

- **Colheita de amostras clínicas para exame histopatológico**

O exame histopatológico visa à identificação e à caracterização de lesões microscópicas em tecidos através de métodos de coloração específicos. Os procedimentos rotineiros de coleta de material para exame histopatológico devem incluir os seguintes cuidados^[35,109]:

- a) planejar a coleta de material para exame histopatológico, tendo em vista a preparação dos materiais necessários (frascos de boca larga com fixador);
- b) certificar-se de que as amostras coletadas contemplam todos os órgãos e tecidos possivelmente relacionados com a suspeita clínica ou analítica (alterações macroscópicas);
- c) as amostras de tecido devem contemplar regiões de transição entre áreas normais e lesadas e ser cortadas em fragmentos de aproximadamente 1cm de espessura, e de superfície ampla, que não deve ultrapassar 2 a 3cm;
- d) usar instrumentos com lâmina de corte (facas/bisturis) bem afiado para garantir um corte preciso e tomar o cuidado de não comprimir ou esmagar os tecidos;
- e) após a colheita, o fragmento de tecido deve ser imergido imediatamente em solução de formalina (formol comercial) a 10% (900ml de água com 100ml de formaldeído a 40%), cobrindo totalmente o material com a solução. A proporção correta de tecido na formalina deve ser 1:10;
- f) No caso de fragmentos de tecido com estrutura esponjosa (pulmão, baço e medula óssea), que podem flutuar, cobrir as amostras ao final da coleta com uma camada de gaze para manter o tecido imerso.

- **Colheita de amostras para exames toxicológicos**

Para exame toxicológico, os tecidos e líquidos precisam ser o mais recentes possível, devendo ser enviadas amostras de no mínimo 100g de cada órgão a ser amostrado, acondicionados isoladamente em recipientes de material químico inerte, plásticos ou vidros estéreis, pois o metal pode modificar a amostra. A conservação pode ser realizada a partir da refrigeração ou do congelamento. Na impossibilidade de resfriar ou congelar, utilizar impregnação com etanol a 95% (1ml/g de tecido)^[20,64]. Não utilizar formol ou outro tipo de álcool. O material para exame não deve ser estocado por mais de 48 horas. Dependendo da suspeita da fonte de intoxicação, enviar 50ml de sangue com anticoagulante, (heparina 78UI/ml de sangue) e 5ml de urina, ambos sob refrigeração^[20,131].

As amostras não devem ser lavadas para evitar a possibilidade de arrastarem resíduos de agentes químicos ou de se contaminarem pela água. Quando houver envolvimento legal (Justiça), ou possível envolvimento, informar o laboratório e tomar precaução quanto à troca ou contaminação durante o envio ao laboratório. Sempre que se tratar de casos de suspeita, além do material para exame toxicológico, deve ser coletado material para exame histopatológico, bacteriológico e pesquisa de vírus (inoculação) para realização de provas diferenciais.

No caso de coleta de amostras de ração ou de algum componente da matéria-prima (milho, soja, trigo, etc.) com suspeita de contaminação, deve ser enviada ao laboratório uma amostra de 500g de cada componente que se deseja amostrar. Para a coleta, usar recipientes e equipamentos de amostragem bem limpos. A amostragem de produtos embalados (sacas) deve abranger no mínimo 20% do material a ser analisado, contemplando diversos pontos do lote amostrado. Para materiais a granel devem-se colher amostras em diversos pontos representativos do montante a ser analisado. Após a amostragem do material em diferentes pontos do carregamento ou sacas e a análise visual, deve-se homogeneizar o material e separar a porção de até 500g para envio ao laboratório que fará as análises e reservar sempre uma parte da amostra para arquivo ou contraprova. É importante que a amostra seja acondicionada em sacos plásticos limpos e secos, mantendo as condições em que ela foi colhida.

6.9 Colheita de água

A colheita e a análise da água utilizada na unidade de produção devem ser realizadas regularmente, no mínimo duas vezes ao ano, para monitoramento da água que está sendo consumida pelos animais e utilizada nos programas de limpeza. A presença de cloro na água deve, obrigatoriamente, ser comunicada ao laboratório.

Procedimento de coleta e remessa de água

Os frascos para coleta e remessa de água devem ser estéreis e com capacidade de 50 a 200ml. Recomenda-se que os coletores mantenham as mãos limpas ou usem luvas plásticas (cirúrgicas e não coloridas) e não fumem durante a coleta das amostras.

a) **Colheita a partir de torneiras e bebedouros:** o ponto de coleta não deve ter vazamentos. No caso de torneira, esta não deverá ter aeradores ou filtros. Limpar a parte externa do bebedouro e das torneiras (usar uma solução de hipoclorito para eliminar a contaminação externa, tendo o cuidado de remover completamente o hipoclorito antes da coleta). Deixar escoar a água durante 5 minutos. Deixar escoar meia secção (fluxo pequeno e sem respingos). Retirar a tampa do frasco, flambar e segurar verticalmente próximo à base e efetuar a coleta com 2/3 de sua capacidade, possibilitando a homogeneização. Flambar novamente e tapar o frasco.

b) **Colheita a partir de reservatórios ou cisternas:** procurar evitar a coleta de amostras em áreas estagnadas ou em locais próximos às margens. Com o próprio frasco da coleta, tendo os cuidados de higiene com as mãos e braços, retirar a tampa do frasco, flambar e, com uma das mãos, segurar o frasco pela base, mergulhar rapidamente o frasco com a boca para baixo, de 15 a 30cm abaixo da superfície da água para evitar a introdução de contaminantes superficiais. Diricionar o frasco de modo que a boca fique em sentido contrário à correnteza. Retirar o frasco do corpo de água, desprezar uma porção da amostra, 2/3 de sua capacidade, possibilitando a homogeneização.

Imediatamente após a colheita, as amostras devem ser colocadas sob refrigeração acondicionadas em caixa de isopor com gelo ao abrigo da luz solar. É imprescindível registrar todas as informações do campo de coleta: identificação do ponto de amostragem e sua localização (profundidade); data e hora de coleta; tipo de amostragem (efluente industrial, água de rio, potável, poço, etc.); condições meteorológicas nas últimas 24 horas, como chuvas; endereço, telefone e nome do responsável pela coleta.

Referências bibliográficas

1. ABATE, O. et al. Cytological, immunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system disorders of dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 45, p. 73-85, 1998.
2. ABREU, F.S., ALENCAR, N.X., SCHUBACH, T.M.P., et al. Alterações do mielograma de gatos (*Felis catus*) da região metropolitana do Rio de Janeiro - RJ, naturalmente infectado por *Sporothrix schenckii*. Disponível em: <<http://www.spmv.org.br/conbravet2007>>. Acesso em: maio 2008.
3. ACKERMAN, A.B. **Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases**. 2. ed. Baltimore: Williams; Wilkins, 1997, 944p.
4. ALDERETE, J.M.S. et al. Prevalence of Toxocara infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 593-597, 2003.
5. ALLEMAN, A.R.; TWOMEY, L.N. Cytodiagnosis of feline lymphoma. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 17-32, 2005.
6. ANDERSON, Cerebrospinal fluid collection, myelography and epidurals. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6. ed. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2005. cap. 82, p. 295-297.
7. ANDREASEN, C. B., Bronchoalveolar lavage. **The Veterinary Clinics. Small Animal Practice**. n. 33, p. 69-88, 2003.
8. ANTONIASSI, N.A.B., et al. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. Biológico, v. 69, n. 2, p. 69-72, 2007. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v69_2/p69-72.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2009.
9. ARAUJO, F.R. et al. Larva migrans cutânea em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 84-85, 2000.
10. BÄCHLI, H. et al. Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. **Child's Nervous System**, v. 20, n. 7, p. 468-472, 2004.
11. BARROS C.S.L. **Guia da técnica de necropsia dos mamíferos domésticos**. Santa Maria: UFSM, 1988. 47p.
12. BARROS, C.S.L. e MERQUES, G.H.F. **Procedimentos para o Diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50p.
13. BEHR, S. et al. Assessment of pyrogallol red technique for total protein measurement in the cerebrospinal fluid of dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, n. 12, p. 530-533, 2003.
14. BETTENAY, S.V.; MULLER, R.S. Skin scrapings and skin biopsies. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Elsevier Saunders: Missouri. 2005, cap. 107, p. 388-390.
15. BICALHO, A.P.C.V., CARNEIRO, R.A. **Apostila de Patologia clínica**. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Departamento de Clínica, Faculdade Medicina Veterinária. 2008, 85p. Disponível em: <www.vet.ufmg.br/departamentos/clinica/clinica/documentos/Apostila>. Acesso em: 16 nov. 2008.
16. BIRCHARD, S.J., Derrame pleural não-cardiogênico. In: BOJRAB, M.J., **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed., São Paulo: Manole, cap. 69, 1996, 1446p.
17. BORJESSON, D.L. Renal cytology. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 119-134, 2003.
18. BRION, A. e FONTAINE, M. **Vademecum del Veterinario**. 3. ed. Barcelona: Ediciones Gea, 1976. 1.013p.

19. BRITO, J.R.F. **Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16p.
20. CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY: ANIMAL HEALTH. **Manual of common procedures. Section: specimen collection and submission; specimen packaging; specimen transportation**. Canadian food inspection agency, Ottawa, Canada, 2002, 61p.
21. CASPE, S.G. **Toma y remisión de muestras - Laboratorios de sanidad animal y química**. Disponível em: <<http://www.inta.gov.ar/mercedes/info/Pubdiversas/laboratorio/TomayRemisi%C3%B3n%20lab%20sanidad%20y%20quimica.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2009.
22. CHAFFIN, M.K. **Diagnostic assessment of pleural effusion in horses**. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v. 16, n. 8, p. 1035-1039, 1994.
23. CHAFFIN, M.K. Thoracocentesis and pleural drainage in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 10, n. 2, p. 106-108, 1998.
24. CHAIRMAN, S.B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J.E. **Isolation and identification of avian pathogens**, 2 ed., 1980. 155 p.
25. COATES, J.R. Cerebrospinal proteins. In: FELDMAN, B.F. et al. **Shalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincot, p. 917-927, 2000.
26. COLES, E.H. **Veterinary Pathology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. 486p.
27. COLLERAN, E.J., Piotórax. In: LAPPIN, M.R. **Segredos em medicina interna de felinos**. São Paulo: Artmed, cap. 13, 2004, 560p.
28. COOK, R. et al. **Management manual: laboratory preparedness**. Animal Health Australia, Canberra, 1996, 56p.
29. COSTA, N.S.; MACORIS, D.G. Citologia do lavado broncoalveolar de equinos da Polícia Militar do Distrito Federal. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 268-274, 2007.
30. COWELL, R.L.; DORSEY K.E.; MEINKOTH, J.H. Lymph node cytology. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 47-67, 2003.
31. CRYSTAL, M.A. Aspirado de medula óssea. In: NORWORTHY, G.D. et. Al, **O paciente felino**. 2. ed., Manole: São Paulo, 2004, cap. 143, 815p.
32. CRYSTAL, M.A. Colheita de líquido cerebroespinhal via espaço atlantoccipital. In: NORWORTHY, G.D. et al. **O paciente felino**. 2. ed., Manole: São Paulo, 2004, cap. 145, p. 607-612.
33. DAVIS, H. Venous and arterial puncture. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Elsevier Saunders: Missouri. 2005, cap. 106, p. 386-388.
34. DIAL S.M. Fungal Diagnostics: Current Techniques and Future Trends. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 373-392, 2007.
35. DOMINGO, M. et al. **Casos de patología porcina**. v. 1-2. Temis Pharma. Barcelona, 2000, 34p.
36. DÜRR, J.W. **Normas de recebimento e processamento de amostras de leite para a determinação da composição e contagem de células somáticas**. Passo Fundo: UPF, 1998. 28p.
37. DUNCAN, JR., PRASSE, K.W., MAHAFFEY, E. **Veterinary Laboratory Medicine**. 3. ed. Iowa: Ames, 1994. 300p.
38. FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do Diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, 735 p.
39. FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, C.N. **Shalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
40. FEPAGRO. **Manual de coleta e remessa de materiais para Diagnóstico de doenças em animais**. 2. ed. Porto Alegre: 1998. 21p.

41. FERNANDES, W.R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 604-609, 2000.
42. FIGUEIREDO, H.C.P.; LEITE, R.C. Colheita e remessa de material para exame bacteriológico. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**. n. 16, p. 59-76, 1996.
43. FORD, R.B., MAZZAFERRO, E.M., Procedimentos Diagnósticos e Terapêuticos. In: _____. **Manual de procedimentos veterinários e tratamento emergencial**. 8. ed., Roca: São Paulo, 2007, 747p.
44. FOREYT, W.J. **Parasitologia veterinária: manual de referência**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2005. 240p.
45. FOSSUM, T.W. Cirurgia do Sistema Respiratório Inferior: Cavidade Pleural e Diafragma. In: _____. **Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed., São Paulo: Roca, cap. 32, 2005, 1390p.
46. FOSSUM, T.W., Lactescent pleural fluids in cats: diagnosis and treatment. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 1, n. 3, p. 191-196, 1999.
47. FOSTER, S.F., MARTIN, P., BRADDOCK, J.A., et al. A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology (1995-2000). **Journal of Feline Medicine and Surgery**. n. 6, p. 189-198, 2004.
48. FURLONG, J. Boophilus microplus, o carrapato dos bovinos. In: BRESSAN, M. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 65p.
49. GAMA, F.G.V. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, 2005.
50. GASKELL, C.J. Trato Urinário Inferior. In: GASKELL, C.J., GASKELL, R.M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3. ed. 2006, cap. 11, 590p.
51. GRINDEM, C.B. Bone marrow biopsy and evaluation. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 19, n. 4, p. 669-96, 1989.
52. GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 1313-1374, 2002.
53. GROSS, T.L. et al. **Veterinary dermatopathology: A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**. St. Louis: Mosby-Year Book. 1992, 520p.
54. HAFFIN, M.K. **Thoracocentesis and pleural drainage in horses**. Equine Veterinary Education, v. 10, n. 2, p. 106-108, 1998.
55. HAWKINS, E.C., DeNICOLA, D.B., PLIER, M.L. Cytological analysis of bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of spontaneous respiratory tract disease in dogs: a retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. n. 9, p. 386-392, 1995.
56. HIRSCHBERGER J. et al. Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats. **Veterinary Clinics Pathology**, v. 28, n. 4, p. 1142-6, 1999.
57. HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 156p.
58. ISON, A.J.; SPIEGLE, S.J.; MORISHITA, T.Y. **Poultry Blood Collection**. Veterinary Preventive Medicine, Ohio. 2001.
59. JAIN, C.N. **Essential of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
60. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5 ed., London: WB Saunders. 2001.
61. KERINS, A.M.; BREATHNACH, R. Sistema respiratório. In: CHANDLER, E.A.; GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3. ed., São Paulo: Roca, cap. 12, 2006, 590p.

62. KNOTTENBELT, C.M., BLACKWOOD, L. Sangue In: CHANDLER, E.A., GASKELL, C.J., **Clínica e terapêutica em felinos**. Roca: São Paulo. 2006, cap. 9, 590p.
63. KOERICH, P.K. et al. **Aves: guia de coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. News Print, 2007. 168p.
64. LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Coleta e remessa de material para exame virológico. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**. n. 16, p. 77-86, 1996.
65. LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; SALVARANI, F.M. Principais clostridioses na bovinocultura leiteira. **Revista técnica de bovinocultura de leite**, v. 1 n. 3, p. 38-44, 2006.
66. LOPES, S.T.A., BIONDO, A.W., SANTOS, A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. 3. ed., Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007, 107p.
67. LOPES, S.T.A.; CUNHA, R. **Patologia Clínica Veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2002, 125p.
68. MACHADO, A.B.; EL ACHKAR, M.E. Larva migrans visceral: relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 215-219, 2003.
69. MADEIRA, A.M.B.N., GRUBER, A. **Aula Prática 10. Exames copro-parasitológicos**. Disponível em: <www.coccidia.icb.usp.br/disciplinas/BMPP222/aulas>. Acesso em: 06 dez. 2008.
70. MAIA, M.A. et al. Dipylidium caninum (Cestoda – Dilepididae): relato de um caso humano em Goiânia, Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 20, n. 1, p. 7-12, 1991.
71. MAPA, Controle da raiva dos herbívoros. **Manual técnico**. 2005. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2005. 103p.
72. MARTINS, E.N.E.C.D.M.P.L. Necrópsia e coleta de material para laboratório. In: SEMANA DE ATUALIZACAO EM BOVINOCULTURA: MÓDULO SAÚDE ANIMAL, 1989, Lages, SC. **Anais...** Lages, SC: Empasc/Estação Experimental de Lages, p. 175-179.
73. MCSHERRY, L.J.T. Techniques for bone marrow aspiration and biopsy. In: ETTINGER, S. J; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6. ed. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2005. cap. 77, p. 285-288.
74. MEINKOTH, J.H.; COWELL, R.L. Vet sample collection and preparation in cytology: increasing diagnostic yield. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 1187-1207, 2002.
75. MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 41-45, 2004.
76. MENEZES, F.C.; ROSA, A.S.; DE CONTI, D.O. et al., Sistema de drenagem torácica e uso de antimicrobianos, avaliação bacteriológica após troca de frasco coletor com seu conteúdo com 12 e 24 horas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 30, n. 6, 429-435p., 2003.
77. MEYER, D.J., HARVEY, J.W. **Veterinary Laboratory Medicine**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. 372p.
78. MOLINA, C.P. et al. Infection by Dipylidium caninum in an Infant. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Northbrook, v. 127, n. 3, p. 157-159, 2004.
79. MORENO, A.M.; SOBESTIANSKY, J.; LOPEZ, A.C.; SOBESTIANSKY, A. **Coleta e processamento de amostras de sangue em suínos para fins de Diagnóstico**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA. 1997. 30p. (EMBRAPA-CNPSA. Documentos, 41).
80. MORIELLO, K.; GALBREATH, E. Dermatopathology for the Pathophobe. In: MORIELLO, K.A.; MASON, I.S. **Handbook of Small Animal Dermatology**. 5. ed. Oxford: Pergamon Veterinary Handbook Series. Elsevier Science, 1995, 300p.
81. MOURA, R.A. Métodos para detecção de parasitos. In: _____. **Técnica de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 37, p. 419-430.

82. MUIRHEAD, M.R. Blood sampling in pigs. **In Practice**, v. 3, p. 16-20, 1981.
83. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES. **Procedures for collection and submission of specimens**. National veterinary services laboratories, Ames, Iowa, 2006, 47p.
84. NAVARRO, C.E.K.G.; PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varella, 1994. 169p.
85. NEVES, M.M.; MARQUES, A.P.; ALVES, G.E.S.; FARIA, E.P. Valores referenciais da análise do líquido peritoneal de equinos sadios. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, 2000.
86. NORSWORTHY, G.D. Piotórax. In: NORSWORTHY, G.D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S. F. et al. **O paciente felino**. 2. ed., São Paulo: Manole, cap. 117, 2004, 815p.
87. NORSWORTHY, G.D., Colheita de sangue jugular – método alternativo. In: NORSWORTHY, G.D. et. al, **O paciente felino**. 2. ed., Manole: São Paulo, 2004, 815p.
88. NOXON, J.O. Diagnostic procedures in feline dermatology. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 25, n. 4, p. 779-799, 1995.
89. NUNES, C.M. et al. Presence of larva migrans in sand boxers of public elementary schools, Araçatuba, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 656-658, 2000.
90. OLSSON, D.C. et al. Aspiração e quantificação da medula óssea em diferentes ossos para transplante de células-tronco mononucleares em cães. In: XII CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, 2006, Lages, SC. **Anais...** Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2006, v. 12, p. 109.
91. OLSSON, D.C. et al. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, v. 39, p. 141-147, 2009.
92. ORSINI, J.A. et al. **Manual de urgencias en la clínica equina: tratamientos y técnicas**. Madrid: Harcourt, 2000, 764p.
93. OSBORNE, C.A., FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Williams; Wilkins, 1995. 960p.
94. PEIXOTO, P.V. e BARROS, C.S.L. A importância da necropsia em medicina veterinária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, n. 3. p. 132-134. 1998.
95. PEREIRA, P. M.; REICHMANN, P. Transfusão de Sangue e seus derivados. In: Silvia F. Andrade. (Org.). **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002, p. 491-501.
96. PEREIRA, S.A. et al. Demodicose associada à esporotricose e pediculose em gato co-infetado por FIV/FeLV. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 75-78, 2005.
97. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
98. RAGOZO, A.M.L., MURADIAN, V., RAMOS E SILVA, J.C., et al. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 39, n. 5, p. 244-246, 2002.
99. REBAR, A.H., MACWILLIANS, P.S., FELDMAN, B.F., **Guia de hematologia para cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.
100. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
101. REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna de equino**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 938p.
102. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varella, 2001. 425p.
103. ROBISON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. Philadelphia: Saunders, 1992, 897p.
104. ROSATO, P.N. et al. Physical-chemical analysis of the cerebrospinal fluid of healthy dogs submitted to different storage periods and temperatures. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1806-1810, 2006.

105. SCAINI, C. J. et al. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 617-619, 2003.
106. SCHUBACH, T.M.P., SCHUBACH, A.O., OKAMOTO, T. et al. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix Schenckii* de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 404-408, 2004.
107. SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Métodos diagnósticos. In: **Muller e Kirk, Dermatologia de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, cap. 2, p. 83-86.
108. SECRETARIA DA SAÚDE DE SÃO PAULO, Coleta de material biológico. Disponível em: <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/assist_laboratorial/0001/Coleta_Laboratorial_Cap2.pdf>. Acesso em: 05nov. 2008.
109. SEGALÉS, J; DOMINGO, M. **La necropsia en el ganado porcino: Diagnóstico anatomo-patológico y toma de muestras**. 2003, 125p.
110. SERAKIDES, R. Colheita e remessa de material para exames laboratoriais. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**. n. 16, p. 39-57, 1996.
111. SHARKEY, L.C.; DIAL S.M.; MATZ, M.E. Maximizing the Diagnostic Value of Cytology in Small Animal Practice. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 351-372, 2007.
112. SIMON, C.F., FISCHER, C.B.D., SILVEIRA, F. Patologia Clínica: colheita, conservação e remessa de amostras. **Veterinária em Foco**. v. 4, n. 2, 2007.
113. SIMS, L.D.; GLASTONSBURY, J.R.W. **Pathology of the pig: a diagnostic guide**. The pig research and development corporation, 1996, 86p.
114. SOBESTIANSKY, J. et al. **Suínos: coleta e remessa de material para laboratórios para fins de Diagnóstico**. Goiânia, 2005. 122p.
115. SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Equinos**. Porto Alegre: Artmed. 1999. 366p.
116. STAINK, D.R. **Clínica Cirúrgica Veterinária. Cirurgia Abdominal**. Disponível em: <www.pucrs.campus2.br/%7Estainki/>. Acesso em: 15 dez. 2008.
117. STRAW, B.E., et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 1153p.
118. SZABÓ, M.P.J. **Colheita e remessa de material na necrópsia**. 2007. Disponível em: <<http://www.famev.ufu.br/estrutura/laboratorios/Patologia.html>>. Acesso em: 14 mai. 2009.
119. THALL, M.A. BAKER, D.C., CAMPBELL, T.W., et al., Coleta e processamento de amostras e análise das opções de serviços laboratoriais. In: _____. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, cap. 2, 582p.
120. THOMSON, R.G. **Patologia Geral Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 412p.
121. TIPOLD, A. Cerebrospinal fluid. In: VITE, C.H., BRAUND, K.G. **Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment**, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY, 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org/advances/Vite/toc.asp>>. Acesso em: 23 jan. 2008.
122. TOGNOLI, G.K. et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera experimental em cães. **Ciência Rural**, v. 39, p. 148-155, 2009.
123. URQUHART, G.M., **Veterinary Parasitology**. 2. ed., Publisher: Blackwell Publishing Professional, 1996, p. 46-49.
124. VASCONCELLOS, L.A.S. **Problemas neurológicos na clínica equina**. Editora Varella, p. 34, 1995.

125. VASCONCELOS, A.C. Necropsia e conservação de espécimes para laboratório. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 16. p. 1-86, julho, 1996.
126. VETERINARY LABORATORIES AGENCY. **Submission of samples to the veterinary laboratories agency**. Veterinary laboratories agency. United Kingdom, 2003, 27p.
127. VETERINARY SERVICES OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Regulations for classifying infectious substances and diagnostic specimens**. Veterinary Services. n. 6, 2005, 59p.
128. VIEL, L. Endoscopic scores, bronchoalveolar lavage and tracheobronquial cytology. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 5-19, 2001.
129. WEISS, D., TVEDTEN, H. Erythrocyte Disorders. In: WILLARD, M.D., TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis**. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2004.
130. WHITTEMORE, C.T. **The Science and Practice of Pig Production**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999, 201p.
131. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.
132. YNARAJA, E., **Lavado traqueal o traqueo-bronquial en animales de compañía: técnica diagnóstica**. Alteraciones respiratorias. AVEPA. Disponível em: <http://www.avepa.org/grupos/gecar/cursos/2000madrid/lavado_traqueal-2000.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2010.

CAPÍTULO 6

DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM AVES

Carolina Reck

Álvaro Menin

Celso Pilati

Vagner Miranda Portes

INTRODUÇÃO

A importância econômica e social da avicultura coloca o setor em evidência tanto no âmbito nacional como no internacional. A avicultura brasileira é uma atividade de grande sucesso, visto que o Brasil se encontra entre os três maiores produtores do mundo. A avicultura brasileira segue os altos padrões internacionais de higiene e biosseguridade, oferecendo produtos seguros e bem aceitos pelo mercado internacional, reforçando ainda mais a necessidade de fortalecimento das atividades de vigilância sanitária, principalmente para as doenças de maior impacto econômico. As doenças na avicultura moderna, de caráter infeccioso ou não, sempre ocuparam um lugar de destaque pela relação negativa com os índices produtivos e prejuízos econômicos.

O desenvolvimento e a intensificação da Avicultura Industrial aumentaram o desafio sanitário, pois as aves estão submetidas a altas densidades populacionais, o que favorece de forma rápida a disseminação de doenças entre os animais e, em determinadas regiões, entre unidades de produção. Visando manter o rigoroso controle sanitário, exigido pela moderna avicultura, fez-se necessário o desenvolvimento de técnicas aprimoradas de diagnóstico, permitindo que eles sejam mais consistentes e rápidos, agilizando as decisões de controle das enfermidades e minimizando os prejuízos.

Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), vem sancionando leis para manter a sanidade e o monitoramento dos plantéis avícolas, normatizando as ações de acompanhamento sanitário. Os procedimentos sanitários adotados pelo Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal executam ações permanen-

tes de vigilância epidemiológica e sanitária de acordo com as normas e legislações específicas do PNSA. Com relação à ocorrência das principais doenças de notificação, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e o PNSA desenvolveram programas sanitários para controle da doença de Newcastle, salmonelas e micoplasmas. A influenza aviária, mesmo constante no programa, é considerada exótica no Brasil.

Grande parte do sucesso de um diagnóstico laboratorial ou de um bom programa de monitoria sanitária envolvendo exames laboratoriais depende principalmente da qualidade e representatividade da amostra analisada, pois amostras pouco representativas ou obtidas de forma inadequada podem interferir diretamente e comprometer a representatividade e interpretação dos resultados obtidos. Os conhecimentos acerca das doenças aviárias e dos corretos procedimentos de colheita de material para exames laboratoriais são pilares básicos para dar início ao processo de diagnóstico de uma enfermidade e procedimento de monitoria sanitária.

Muitas vezes, médicos-veterinários, por excesso de carga de trabalho, excesso de confiança, ou por motivos econômicos, ou mesmo por falta de hábito, não realizam um procedimento de necropsia de forma adequada e tampouco uma colheita de material para exames laboratoriais cuidadosa, comprometendo a representatividade e a confiabilidade do diagnóstico obtido. Esse tipo de falha pode ter como consequências a implantação de programas sanitários errôneos, dados epidemiológicos subestimados ou superestimados, estratégias de controle e tratamento de doenças pouco eficientes, desgaste de mão de obra, todos resultando em severas perdas econômicas.

Neste capítulo serão abordadas as enfermidades aviárias de maior relevância, bem como orientações para a realização de eutanásia, necropsia, métodos de colheita de material para análise e diagnóstico laboratorial, além de parâmetros clínicos para a espécie.

1. DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS

1.1 Doenças bacterianas

1.1.1 Botulismo

Conceito

O botulismo é uma intoxicação específica resultante da ingestão da toxina botulínica pré-formada pelo *Clostridium botulinum*, que se caracteriza por levar o animal a um quadro de paralisia motora progressiva e morte. Acomete todos os tipos de aves, com exceção dos urubus, que são resistência à ação da toxina^[1,7].

Etiologia e Patogênese

O *Clostridium botulinum* é um bacilo anaeróbio, Gram-positivo, formador de esporos, encontrado no solo, na água, no trato gastrointestinal das aves, na matéria orgânica de origem animal e vegetal, principalmente em fase de decomposição^[10]. Existem oito tipos distintos de toxinas botulínicas (A, B, C alfa, C beta, D, E, F e G), classificadas em função de suas diferenças抗igenicas, mas todas possuem ação patogênica semelhante. Os tipos A e C estão normalmente relacionados com surtos de botulismo, sendo o tipo C mais frequente em aves^[3]. As toxinas produzidas pelo *C. botulinum* são as mais potentes toxinas biológicas conhecidas. São sintetizadas como uma única cadeia polipeptídica inativa, com peso de 150kDa liberada no processo de lise bacteriana. As toxinas produzidas pelo *C. botulinum* são classificadas como neurotoxinas, pois atuam nas junções neurais colinérgicas periféricas impedindo a liberação de acetilcolina^[6,14].

O quadro clínico é determinado pela ingestão da toxina botulínica pré-formada, que, por ser resistente aos fatores da digestão, como a ação de ácidos, da pepsina e da tripsina, após ser absorvida, alcança a circulação sanguínea, liga-se às terminações nervosas e bloqueia a liberação de acetilcolina. Em consequência, ocorre bloqueio da passagem dos impulsos nervosos, iniciando um quadro de paralisia flácida^[8,10]. Não há efeito da toxina no sistema nervoso central. A paralisia é ascendente e a morte é decorrente da paralisia respiratória, resultantes da ação da toxina nas terminações neuromotoras. Os esporos do *C. botulinum* são muito resistentes, permanecendo viáveis durante a permanência na autoclave a 120°C por 20 minutos. As toxinas são inativadas por hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,1 % durante 30 minutos.

Diagnóstico

O diagnóstico deve ser baseado no histórico e no quadro clínico apresentado pelo animal. A confirmação é realizada pela detecção da toxina no sangue do animal^[1,5].

a) Epidemiologia

As aves contaminam-se através da ingestão de material em decomposição, como carcaças de animais, vegetais, peixes e larvas de mosca contaminadas. O *C. botulinum* pode ser encontrado normalmente no trato gastrointestinal de aves; nesse caso, quando a ave morre, o *C. botulinum* presente no intestino pode multiplicar-se e sintetizar a toxina botulínica que fica depositada na carcaça^[15]. Em frangos de corte, devido à alta densidade nos plantéis, quando não são recolhidas carcaças ou quando ocorrem vazamentos nos bebedouros que acarretam no umedecimento da cama do aviário (serragem), a cama úmida entra em processo de decomposição, criando condições adequadas para que ocorra a proliferação da bactéria e a produção da toxina, que passa a se depositar nesses material e é facilmente ingerida, principalmente por aves jovens^[7].

O *C. botulinum*, por ser esporulado, produz esporos resistentes, o que permite sua fácil disseminação, podendo permanecer no meio ambiente durante anos. Larvas de moscas e cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*), que se alimentam de carcaças nas quais houve proliferação e esporulação do *C. botulinum*, podem conter a toxina. Nesse caso, as aves que ingerirem as larvas ou os cascudinhos podem infectar-se com o *C. botulinum* ou desenvolver a doença pela ingestão da toxina botulínica, respectivamente^[17]. As aves aquáticas podem contaminar-se pela ingestão de invertebrados que se alimentam de vegetais em putrefação ou mesmo pela ingestão de material submerso em estado de putrefação^[9,11].

Há uma situação importante que deve ser considerada com relação à produção avícola, que se refere à utilização da cama de aviário na alimentação de ruminantes. A publicação, da Instrução Normativa Nº 08 em 25 de março de 2004, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) proibiu o uso da cama de aviário na alimentação de ruminantes, bem como produtos que contenham em sua composição proteínas e gorduras de origem animal^[4]. Atualmente, ainda são relatados com frequência surtos de botulismo em ruminantes que receberam cama de aviário como fonte de suplementação. Esse manejo inadequado representa um risco para a introdução tanto do botulismo no rebanho como de outras enfermidades, como a BSE (Encefalopatia Espongiforme Bovina)^[3,12].

b) Sinais clínicos

O período de incubação e a severidade do quadro clínico variam de acordo com a quantidade de toxina ingerida, podendo a morte ocorrer em dias ou até em poucas horas. Os sinais clínicos mais comumente observados são: paralisia flácida das pernas, das asas e da terceira pálpebra, e o pescoço encontra-se distendido para a frente e apoiado no chão (“limberneck”)^[17]. Os frangos

também podem apresentar sinais de fraqueza, incoordenação motora, penas eriçadas que se desprendem facilmente pela paralisia dos músculos eretores das penas. A dificuldade respiratória é consequência do progresso do quadro clínico devido à paralisia dos músculos respiratórios, que no estágio mais avançado da doença determina a morte do animal^[1,2,16]. As taxas de mortalidade e morbidade também estão diretamente relacionadas com a quantidade de toxina ingerida.

c) Patologia

O botulismo não apresenta lesões macroscópicas ou microscópicas características. O que pode ser observado na necropsia é a presença de material em decomposição (cama de aviário), larvas de mosca ou ossos no proventrículo e na moela. Em alguns surtos de botulismo em frangos de corte o quadro clínico pode ficar restrito a uma parte do aviário, principalmente quando no manejo são utilizadas divisórias no galpão^[17,18].

d) Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela detecção ou demonstração da toxina botulínica nos testes laboratoriais. Para a detecção da toxina, procede-se à inoculação do material suspeito em camundongos, que são bastante sensíveis à toxina, e observam-se os sintomas compatíveis com o botulismo ou morte dos animais. O isolamento do *C. botulinum* tem baixo valor diagnóstico, pois a bactéria é normalmente encontrada no intestino das aves e no meio ambiente^[2,5]. Testes imunoenzimáticos (ELISA “Sandwich”) capazes de detectar a toxina botulínica no sangue dos animais já estão disponíveis. Entretanto, assim como no teste biológico, esses têm como maior limitação a baixa quantidade de toxina circulante.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir intoxicações por ionóforos, doença de Marek e, no caso de alta mortalidade em um curto espaço de tempo, diferenciar da doença de Newcastle e da influenza aviária.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para a pesquisa da toxina botulínica, o melhor material a ser remetido ao laboratório de diagnóstico é: o soro sanguíneo, conteúdo do proventrículo, moela e fígado dos animais afetados. Em alguns casos pode não haver mais toxinas circulantes no sangue, o que dificulta o diagnóstico laboratorial. Para isolamento bacteriano, deve-se coletar fígado, proventrículo e moela, devendo estes ser acondicionados sob refrigeração^[13,17].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. BIENVENU, J.G. et al. Poultry litter associated botulism (type C) in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 111, 1990.5.
4. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 8, de 25 de março de 2004. Proibir em todo o território nacional a produção, a comercialização e a utilização de produtos destinados à alimentação de ruminantes que contenham em sua composição proteínas e gorduras de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 5, 26, mar. 2004.

5. CHAIRMAN, S.B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J. E. **Isolation and identification of avian pathogens**. 2. ed., 1980. 155p.
6. DWIGHT C.H.; YUAN, C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 446p.
7. EKLUND, M.W. and Dowell, V.R., eds., **Avian Botulism: An International Perspective**: Springfield, Ill., Charles C. Thomas, 1987, 405p.
8. GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
9. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
10. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
11. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
12. LOBATO, F.C.F. et al. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama-de-frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1176-1178, 2008.
13. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
14. QUIN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, 2002. 512 p.
15. REED, T.M.; ROCKE, T.E., 1992, The role of avian carcasses in botulism epizootics: **The Wildlife Society Bulletin**, v. 20, p. 175-182.
16. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
17. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p
18. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.

1.1.2 Cólera aviária

Conceito

É uma enfermidade infectocontagiosa amplamente disseminada, que acomete aves domésticas, silvestres e aquáticas. Tipicamente se apresenta como uma infecção septicêmica grave provocando alta morbidade e mortalidade. Pode ocorrer na forma aguda e também na forma crônica^[1].

Etiologia e Patogênese

O agente da cólera aviária é a *Pasteurella multocida*, cocobacilo Gram-negativo, imóvel, não formador de esporos, aeróbio e anaeróbio facultativo. Sensível à maioria dos desinfetantes comuns, à luz solar e à dessecação. A estrutura antigênica da *P. multocida* refere-se a抗ígenos capsulares e somáticos, que podem ser detectados sorologicamente (Tabela 1). Os抗ígenos capsulares são classificados em grupos A, B, C, D, E e F, estando estes diretamente relacionados com a patogenicidade^[2,7,11]. Os sorotipos prevalentes em aves são A e D, sendo o A predominante. Os抗ígenos somáticos são classificados em 16 sorotipos, e todos já foram isolados de aves^[1,7,9,11].

A porta de entrada da *P. multocida* é através da mucosa da orofaringe e, posteriormente, se dissemina através da corrente sanguínea ou linfática para todo o organismo. As aves também podem infectar-se pela conjuntiva ou pelos tecidos lesados^[4,12].

Os fatores de virulência da *P. multocida* estão associados com a presença de cápsula e seus componentes, como no caso do sorotipo A, que contém ácido hialurônico na cápsula, associado à resistência sérica. A cápsula com alta concentração de ácido hialurônico funciona como uma ade-sina para as células epiteliais do trato respiratório. *Pasteurella multocida*, que expressam cápsula do tipo D, também produzem toxina dermonecrótica (TD), que tem papel lesivo para a muco-sa^[13,16]. O aparecimento das lesões e a gravidade da doença nas aves estão associados à liberação de endotoxina (lipossacarídeo – LPS) na circulação. O LPS induz resposta inflamatória e ação tó-xica direta sobre as células epiteliais do trato respiratório^[1,9,12].

Tabela 1. Estrutura antigênica das *Pasteurella multocida*

<i>Pasteurella multocida</i>	
Antígeno	Sorotipo
Capsular	A, B, C, D, E, F
Somático	16 sorotipos (enumerados de 1 a 16)

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser realizado com base nos sinais clínicos, nas lesões obser-vadas pelo macroscópico e no histórico clínico dos animais ou do lote. O diagnóstico definitivo é obtido pelo isolamento bacteriano em amostras contaminadas e posterior identificação e tipifica-ção do agente quanto a seu potencial patogênico^[4,5].

a) Epidemiologia

Aves adultas são mais sensíveis, e raramente a doença se manifesta em aves com menos de 6 semanas. Perus são mais susceptíveis do que galinhas à infecção por *P. multocida*. A transmis-são do agente ocorre por via horizontal, através da água, da ração, de equipamentos contamina-dos, de pessoas e de outros animais que possam carrear a bactéria^[1,2]. As aves que se recuperam podem tornar-se portadoras assintomáticas, representando um importante reservatório da bacté-ria. A frequência da doença é maior nas épocas mais quentes do ano pela associação a fatores es-tressantes ligados à sazonalidade^[5,8]. As taxas de mortalidade e de morbidade são elevadas, e a mortalidade está relacionada com o nível de virulência do agente.

Nas áreas endêmicas, onde a cólera aviária ocorre com frequência e traz muitos prejuízos, utiliza-se a vacinação com bacterinas contendo principalmente os sorotipos 1, 3 e 4 (prevalen-tes) como ferramenta para diminuir a expressão clínica da doença e reduzir as perdas associadas à morbidade e à mortalidade. Normalmente, são vacinadas matrizes pesadas e poedeiras comer-ciais. Vacinas autógenas também podem ser usadas em regiões onde as bacterinas comerciais não são eficazes ou não contemplam os sorotipos prevalentes^[12].

O período de incubação da doença em surtos agudos varia de poucas horas até 3 dias, ou levar a óbito os animais sem a manifestação de sinais clínicos. De modo geral, considera-se que o período de incubação varia de 3 a 9 dias^[8].

b) Sinais clínicos

A cólera aviária, clinicamente, pode manifestar-se de forma aguda ou crônica. Na forma aguda as aves apresentam prostração, penas arrepiadas, corrimento nasal, dificuldade respirató-ria, cristas e barbelas cianóticas e edemaciadas^[1,3,4]. Nos casos mais graves os animais podem

apresentar diarreia verde mucoide e aumento da frequência respiratória. A mortalidade nesses casos pode chegar a 80 ou 90%. Algumas aves podem apresentar torcicolo devida à infecção da meninge^[2,5,14].

Na forma crônica os sinais clínicos presentes são: debilidade progressiva, diminuição na produção, palidez da crista e da barbela. Nesse caso, os sinais clínicos vão depender de quais órgãos estão sendo comprometidos pela infecção da bactéria. Quando a infecção se localiza nos pulmões, as aves apresentam dispneia, cansaço e secreção nasal. Nos casos de artrite associados à infecção pela *P. multocida* ocorre perda dos movimentos, aumento das articulações, claudicação e fístulas ou artrites abertas. Quando ocorre infecção no canal auditivo, com frequência os animais acometidos apresentam opistotônico e torcicolo. O curso da forma crônica pode ser de 2 a 3 semanas até meses. Nesses casos, as aves podem morrer ou permanecer doentes por longos períodos e vindo a recuperar-se. Entretanto, esses animais tornam-se portadores sadios^[2,11,12].

c) Patologia

Lesões nos casos agudos podem ou não estar presentes. Quando presentes, estão relacionadas com alterações vasculares, como hiperemia dos órgãos abdominais, congestão generalizada, petequias nas serosas e mucosas, na gordura abdominal, no coração, nos pulmões e na mucosa intestinal. Há hipertrofia e congestão do fígado, podendo este apresentar áreas de necrose focal. Em matrizes e poedeiras pode ocorrer postura abdominal, ooforite, atresia dos folículos ovarianos e peritonite^[2,9,15]. Nos casos crônicos, macroscopicamente se observam lesões localizadas, como: atrite, peritonite, salpingite, edema facial devido à presença de material caseoso, cristas e barbelas inflamadas e endurecidas, podendo haver acúmulo de material caseoso nessas estruturas. Em perus é possível encontrar fibrose pulmonar. No exame histopatológico observa-se infiltrado heterófilico em vários órgãos, principalmente nos pulmões e no fígado^[4,6,12].

d) Diagnóstico Laboratorial

Raramente são usadas para diagnóstico provas sorológicas, como soroaglutinação rápida em placa (SAR), imunodifusão e ELISA, pois podem apresentar resultados confusos e de pouco valor para o diagnóstico. Para diagnóstico sugestivo, pode-se utilizar *imprint* do fígado, corados com azul de metileno ou coloração de Wright para visualização de bactérias com formação típica e coloração bipolar característica^[12].

Como diagnóstico definitivo deve-se proceder ao isolamento (a partir do sangue, exsudato e tecidos) e à caracterização bioquímica do agente através de provas de fermentação de glicose, sacarose, manitol, maltose e lactose. O diagnóstico também pode ser realizado por provas biológicas pela inoculação do material contaminado (exsudato ou sangue de aves recém-mortas ou macerado de tecidos infectados) em camundongos e coelhos, que, por serem altamente sensíveis, morrem em 24 a 48 horas após a inoculação. Posteriormente, a *P. multocida* poderá ser isolada a partir do fígado, sangue ou coração desses animais mortos^[17]. Esse método já está em desuso, devendo-se dar preferência a métodos que não envolvam a inoculação de animais. Métodos moleculares baseados na PCR são uma importante ferramenta de diagnóstico e permitem a distinção entre os diferentes sorogrupos capsulares e somáticos^[7,13].

e) Diagnóstico diferencial

A cólera aviária pode ser confundida com outras doenças septicêmicas que cursam com mortalidade elevada. O diagnóstico diferencial deve incluir influenza aviária, tifo, pneumovirose, coriza infecciosa e doença de Newcastle^[2].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para exame microbiológico a partir da necropsia, coletar medula óssea, pulmões, fígado, sangue cardíaco, baço e meninges. Em aves vivas pode ser realizada a colheita de secreção nasal ou traqueal utilizando um suave. Todo o material destinado a exame bacteriológico deve ser acondicionado sob refrigeração. Quando se desejam exames baseados na PCR, podem ser remetidos ao laboratório fragmentos de traqueia, pulmão, fígado e ossos longos, podendo ser conservados sob refrigeração ou mesmo congelados^[10,17]. Para exame histopatológico, coletar fragmentos de fígado, baço, pulmão, coração e outros órgãos que apresentam lesões, devendo estes ser fixados em solução tamponada de formalina 10%.

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CHAIRMAN, S.B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J.E. **Isolation and identification of avian pathogens**. 2. ed., 1980. 155p.
4. CHRISTENSEN, J.P.; BISGAARD, M. Cólera aviar. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, n. 19 v. 2, p. 626-637, 2000.
5. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1999, 446p.
6. GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
7. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
9. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5th, London: WB Saunders. 2001.
10. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
11. QUIN., P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, 2002. 512p.
12. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
13. RIMLER R.B. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D, and F by capsule polymerisation with mucopolysaccharidases. **Vet. Rec.**, 134, p. 191-192, 1994.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
15. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.
16. WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroups B and E *Pasteurella multocida* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 30, p. 1518-1524.
17. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.1.3 Colibacilose

Conceito

A colibacilose aviária é uma doença infecciosa amplamente difundida que causa expressivos prejuízos econômicos para a avicultura, principalmente aqueles associados a perdas no abate. A infecção pode ser localizada, septicêmica ou secundária a outras infecções^[1,14].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é *Escherichia coli*, bacilos Gram-negativos, aeróbios, anaeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, podem ser móveis, bons fermentadores de açúcares, com alta capacidade de reprodução ou multiplicação. A patogenicidade da *E. coli* é modulada por um mecanismo multifatorial e complexo que envolve vários fatores de virulência expressos de acordo com o sorotipo. A capacidade de crescimento e multiplicação da *E. coli* nos tecidos do hospedeiro está diretamente relacionada à síntese de sideróforos e hemolisinas. Os sideróforos removem o ferro das proteínas carreadoras, disponibilizando-o para a atividade de multiplicação bacteriana; já as hemolisinas são responsáveis por lesões na membrana das células alvo^[6,9,10,12]. As *E. coli* causadoras de doenças em aves são classificadas, de acordo com os sinais clínicos e com o mecanismo de patogenicidade, como EPEC (enteropatogênicos) e ETEC (enterotoxigênicos).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) causa diarreia aquosa e hipotermia e produz dois tipos de enterotoxinas: toxina termolábil (LT) e toxina termoestável (ST). A EPEC é semelhante às cepas invasivas de *E. coli* em mamíferos IEC (Enteroinvasive *E.coli*), coloniza as microvilosidades de todo o intestino para produzir lesão nas bordas daquelas e não produzem nenhuma enterotoxinas ou citotoxinas^[2,3]. A classificação das amostras de *E. coli* em sorotipos baseia-se na conjugação das diferenças antigênicas dos抗ígenos somático (O), capsular (K) e flagelar (H). No processo de patogênese da bactéria, o antígeno K (polissacarídeos capsulares) protege a membrana externa da bactéria do complexo de ataque, permitindo à bactéria evadir a ação do complemento, além de dificultar o reconhecimento da bactéria por células do sistema de defesa inato. Os sorotipos relacionados mais frequentemente com a colibacilose aviária são: O1:K1, O2:K1, O35, 078:K80, O2, O21, 036, O50, 078, 088, 0119 E 0152^[5,7,13].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser baseado no histórico clínico-epidemiológico do lote, em sinais clínicos e nos achados de necropsia. Entretanto, o diagnóstico definitivo é obtido pelo isolamento e pela identificação das amostras de *E.coli* associadas às lesões e aos sinais clínicos^[1,10].

a) Epidemiologia

A *E. coli* pertence à microbiota entérica das aves, onde aproximadamente 10% a 20% dos coliformes fecais são representados por *E. coli* potencialmente patogênicos. As condições ambientais como estresse, superlotação, ventilação deficiente, cama mal manejada, alta temperatura e presença de gases são consideradas fatores predisponentes^[14]. A *E. coli* pode permanecer no ambiente por longos períodos, podendo estar presente na água de bebida e ração. Roedores e aves silvestres atuam como reservatórios da bactéria e podem estar associados ao aumento de casos da doença. A transmissão ocorre tanto pela via horizontal como pela vertical, pela contaminação da casaca do ovo, sendo a ocorrência de quadros clínicos mais frequente em aves jovens, quando comparadas com aves adultas^[2,14].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a colibacilose pode ter manifestações que variam de acordo com a localização do agente, podendo estar associada a quadros de aerossaculite, celulite, onfalite, pericardite/periepatite, salpingite, septicemia e síndrome da “cabeça inchada”. Aves adultas são mais suscetíveis a quadros reprodutivos, enquanto aves jovens manifestam mais frequentemente quadros respiratórios^[1,2,8,12,13].

- **Aerossaculite:** afeta comumente aves jovens. A presença de alta concentração de amônia provoca irritação, favorecendo a colonização da bactéria na traqueia, posteriormente atingindo os sacos aéreos. Observa-se material espumoso nos sacos aéreos em casos graves e os animais podem apresentar exsudato caseoso no trato respiratório. Sinais respiratórios podem estar presentes. Quando a *E. coli* atinge a corrente sanguínea, ocorre septicemia (colissepticemia), levando a casos de pericardite e periepatite. Na superfície do fígado, pericárdio e saco pericárdico geralmente ocorre acúmulo de material serofibrinoso.

- **Celulite:** É um processo inflamatório agudo, difuso e purulento do tecido subcutâneo, frequentemente associado à formação de abscessos que podem atingir a musculatura. A celulite aviária têm sido uma das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte, visto que, em sua grande maioria, as lesões são observadas somente por ocasião do abate. A etiologia da enfermidade é multifatorial, principalmente ligada a fatores ambientais, como lesões decorrentes da compactação da cama, densidade e seleção genética. As aves desenvolvem placas caseosas subcutâneas principalmente na região abdominal, ocorre aumento na espessura da pele e percebem-se alterações na coloração, podendo variar de amarela até marrom-escura. Os principais sorogrupo de *E. coli* associados à celulite são O1, O2 e O78.

- **Onfalite:** A contaminação pode ocorrer pelo contato das fezes com o ovo ou pela falta de higiene no incubador. Nos embriões o saco da gema é absorvido dentro de 5 dias de incubação, quando ocorre contaminação pela *E. coli*. Essa absorção fica comprometida, levando a infecção generalizada e alta mortalidade embrionária. Nos pintinhos o quadro clínico aparece no 4º ou 5º dia de vida, quando a absorção da gema fica prejudicada, o abdômen apresenta-se dilatado e o umbigo apresenta-se edemaciado e inflamado. A enfermidade, além de causar alta mortalidade e comprometimento do desenvolvimento, é um indicativo de deficiência no manejo sanitário e na higienização dos ovos na granja ou no incubador.

- **Salpingite:** a infecção pode ocorrer pela contaminação dos sacos aéreos esquerdos devido à proximidade com o oviduto ou infecção ascendente através da cloaca. A salpingite caracteriza-se pela formação de massas caseosas no oviduto, que se apresenta com a parede delgada por conta da distensão causada pelo acúmulo de conteúdo purulento. As aves afetadas geralmente morrem e as que sobrevivem raramente voltam a produzir normalmente.

- **Colissepticemia:** caracteriza-se pela presença da bactéria na corrente sanguínea, principalmente em decorrência da evolução do quadro de aerossaculite. A doença afeta tanto aves jovens quanto adultas, ocasionando um quadro de esplenomegalia, hepatomegalia e congestão hepática com alta mortalidade.

- **Síndrome da cabeça inchada:** clinicamente, os animais apresentam quadro respiratório agudo, sinusite e edema periorbitário e infraorbitário. Eventualmente, podem ocorrer sinais nervosos. Além disso, observa-se a presença de material caseoso subcutâneo na região da cabeça. Outros agentes, como pneumovírus, coronavírus e fatores de estresse, também podem estar associados.

c) Diagnóstico laboratorial

O isolamento da *E.coli* não é suficiente para o diagnóstico definitivo. Quando possível, preconiza-se realizar a sorotipificação com antissoros específicos que contribuem para a determi-

nação da virulência. Técnicas moleculares como PCR, Multiplex-PCR e sondas de DNA também têm sido utilizadas para diagnóstico de *E. coli*^[4,5,11].

d) Diagnóstico diferencial

Muitas vezes, a *E.coli* pode ser apenas um agente oportunista, secundário a varias outros agentes etiológicos. Em caso de onfalite, diferenciar de bactérias como, *Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Slamonella* sp. e *Enterococcus* sp. No caso de aerossaculite, pericardite e periepatite, deve-se diferenciar de *Aspergillus* sp., *Mycoplasma* sp. e *Clamydia* sp.^[1,10,12].

Coleta e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para o isolamento bacteriano em aves adultas, devem-se coletar fragmentos do ovário, baço, fígado, coração ou sangue cardíaco. No caso de pintinhos, estes podem ser enviados ao laboratório inteiros, conservados sob refrigeração (2 a 8°C). Para exame histopatológico, coletar fragmentos de ovários, baço, fígado, coração, tecidos subcutâneos e fixar em solução tamponada de formol a 10%^[10,11].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERICHERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. BREE, A; DHO, M.; LAFONT, J.P. Comparative Infectivity for Axenic and Specific- Pathogen-Free chickens of O2 Escherichia coli strains with or without virulence factors. **Avian Diseases**, v. 33, n. 1, p. 134-139, 1989.
4. CHAIRMAN, S. B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J. E. **Isolation and identification of avian pathogens**. 2. ed., 1980. 155 p.
5. DELICATO, E.R.; DE BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in Escherichia coli isolates from poultry with colibacillose. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 97-103, 2003.
6. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1999, 446p.
7. GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
8. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337 p.
9. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
10. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
11. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
12. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
13. ROCHA, S.L.S. **Detecção de fatores de virulência de amostras de Escherichia coli isoladas de granjas avícolas do RS através do multiplex-PCR**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
14. SAIF, Y.M. et al. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.

1.1.4 Coriza infecciosa

Conceito

Doença respiratória aguda altamente contagiosa e de distribuição mundial que atinge o trato respiratório superior das aves. Caracteriza-se por descarga nasal e ocular, edema facial e inflamação nos seios infraorbitários. A doença acomete aves de todas as idades, entretanto as principais perdas econômicas estão associadas à queda de postura, que pode atingir 40%^[1,2,4].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é o *Avibacterium paragallinarum* (antes denominado *Haemophilus paragallinarum*), membro da família Pasteurellaceae, bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, imóvel^[3]. De acordo com a classificação antigênica, o *Avibacterium paragallinarum* pode ser classificado em 3 sorogrupos: A, B e C. A severidade e a duração do curso da doença variam de acordo com a patogenicidade do sorogrupo envolvido. Não existe imunidade cruzada entre os sorogrupos; por esse motivo, lotes vacinados para um sorogrupo podem apresentar a doença causada por outro sorogrupo. A bactéria se adere ao epitélio ciliado da mucosa do trato respiratório superior ocasionando hiperemia e edema da lámina própria, que evoluí para hiperplasia, e descamação dos epitélios das cavidades nasais, seios infraorbitais e periorbitais e traqueia. A virulência do *Avibacterium paragallinarum* está relacionada à expressão da cápsula, que possui propriedades antifagocíticas e de proteção para a membrana externa contra o sistema complemento^[4,5].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser realizado com base nas lesões, nos sinais clínicos e no histórico do lote. A confirmação do diagnóstico é realizada pelo isolamento bacteriano ou pela detecção do agente através de técnicas moleculares.

a) Epidemiologia

A transmissão ocorre de forma horizontal através de aerossóis, secreções nasais, contato com aves doentes, portadoras assintomáticas, equipamentos e ingestão de água e ração contaminadas. Não há evidências de transmissão vertical. O *A. paragallinarum* sobrevive por curto período no ambiente, porém em exsudato infectado a bactéria permanece viável por um período maior. É inativada à temperatura de 45 a 55°C por 2 a 10 minutos. Em temperatura de 4°C pode ser mantida por alguns dias. A morbidade é alta e a mortalidade geralmente é baixa, dependendo da virulência do agente, de fatores de manejo predisponentes e da presença de agentes secundários^[4, 6].

b) Sinais clínicos

O período de incubação é curto, de aproximadamente 24 a 72 horas, podendo em raros casos ser mais longo, sendo mais frequente em aves adultas ou com mais de 13 semanas de idade. A doença pode durar de duas a três semanas e pode ser complicada por fatores ambientais, deficiência no manejo e infecções secundárias^[1].

A coriza infecciosa pode manifestar-se de duas formas: uma forma mais branda ou descomplicada e uma mais severa ou complicada. No quadro brando observa-se depressão, descarga nasal com exsudato claro, inchaço dos seios infraorbitais e consequente edema facial leve, podendo ser unilateral ou bilateral. Pode ocorrer redução da produção em aves de postura. No caso crônico o exsudato fica mais denso e acinzentado, podendo causar obstrução das vias aéreas. Na forma severa, o quadro respiratório é mais intenso, e a infecção por agentes secundários tende a

agravar o quadro clínico. As manifestações clínicas são as mesmas do quadro leve, porém mais acentuadas e complicadas, como estertores e aerossaculite severa^[2,4,6,8]. A infecção primária por coriza infecciosa pode complicar-se e tornar-se um problema crônico, principalmente com o envolvimento de agentes secundários como *Mycoplasmas* sp., *Pasteurella* sp. e *E. coli*.

c) Patologia

As principais lesões macroscópicas encontradas são: inflamação catarral das vias nasais, seios infraorbitais e conjuntivas, podendo ocorrer acúmulo de exsudato caseoso no saco conjuntival e edema subcutâneo da face e das barbelas^[2,6]. Em frangos de corte tem-se observado, no abatedouro, aumento da condensação devido à presença de aerossaculite. Microscopicamente, observa-se degeneração celular, hiperplasia acinária no seio infraorbital e edema com infiltração de hidrófilos e macrófagos na lâmina própria da mucosa das vias respiratórias superiores^[1,8].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo é realizado por isolamento e identificação do *Avibacterium paragallinarum*. Esse deve ser obrigatoriamente diferenciado, através de provas bioquímicas (Tabela 2), do *Avibacterium avium*, agente não patogênico para as aves que também pode ser encontrado no trato respiratório delas. A sorotipificação é importante para avaliação epidemiológica e estabelecimento de programas de vacinação. Exames sorológicos como HI (teste de inibição da hemaglutinação), precipitação em ágar gel (AGP), soroaglutinação rápida em placa (SAR) e ensaios imunoenzimáticos (teste de ELISA) podem ser utilizados para detectar anticorpos contra o agente. Ensaios moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) também podem ser aplicados para diagnóstico da coriza infecciosa por conta de sua rapidez, especificidade e sensibilidade^[4,8].

Tabela 2. Diferença bioquímica entre *Avibacterium paragallinarum* e *Avibacterium avium*.

Prova bioquímica	<i>A. paragallinarum</i>	<i>A. avium</i>
Catalase	—	+
Crescimento em anaerobiose	—	+
Indol	—	+
Acidez para:		
Arabiose	—	Variável
Galactose	—	+
Maltose	+	Variável
Manitol	+	Variável
Sorbitol	Variável	Variável
Sacarose	Variável	+
Treloose	—	+

Fonte: Adaptado de BLACKALL (2007)^[3].

e) Diagnóstico diferencial

Proceder ao diagnóstico diferencial de bronquite infecciosa, doença de Newcastle, laringo-traqueíte, cólera aviária, influenza aviária, síndrome da cabeça inchada^[1,2].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento bacteriano, pode-se coletar cabeça, pulmão, traqueia, suabes dos seios infraorbitais e sacos aéreos, armazenados sob refrigeração de 2 a 8°C. Como a bactéria é sensível, o material coletado para isolamento deve ser encaminhando o mais rápido possível para o laboratório. As cabeças coletadas devem ser enviadas intactas. No caso de aves vivas, coletar suabes da traqueia. Para exame histopatológico coletar fragmentos de pulmão, traqueia, rins e fígado, que devem ser fixados em solução tamponada de formol a 10%. Para realizar ensaios moleculares (PCR), coletar traqueia, pulmão e suave dos seios infraorbitais e enviar ao laboratório sob refrigeração^[7,8].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves.** Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves.** Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. BLACKALL, P.J. et al. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 353-362, 2005.
4. BYARUGABA, D. K. et al. Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda. **Avian Pathology**, v. 36, n. 1, p. 35-42, 2007
5. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology.** 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
6. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases.** 5. ed., London: WB Saunders, 2001.
7. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial.** New Print, 2007. 165p.
8. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry.** Iowa: Iowa State University, 2003. 1231p.

1.1.5 Enterite necrótica

Conceito

A enterite necrótica é uma enterotoxemia causada pelo *Clostridium perfringens*, frequente e economicamente importante em vários países, que acomete aves domésticas, patos e aves silvestres. A doença pode se apresentar na forma clínica, com surgimento súbito, caracterizada por necrose confluente do intestino delgado, debilidade e alta taxa de mortalidade ou forma sub-clínica, em que as perdas são principalmente devidas à redução do crescimento e à piora na conversão alimentar^[2,4].

Etiologia e Patogênese

O *Clostridium perfringens* é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio, esporulado e toxigênico. O *C. perfringens* é capsulado e classificado de acordo com o tipo de toxina (enterotoxina) produzida em tipo A, B, C, D e E. As toxinas são classificadas em alfa, beta, epsilon, teta, iota, kappa, lambda e um (Tabela 3). Os tipos de *C. perfringens* que mais frequentemente acometem as aves são A e C.

Tabela 3. Classificação de *Clostridium perfringens* e as principais toxinas.

<i>C. perfringens</i>	Toxina	Atividade biológica	Doença
Tipo A ¹	Alfa	Lecitinase, citolítica, hemolítica e dermonecrótica	Enterite necrótica em frangos, enterocolite em suínos
	Enterotoxina	Citotóxica, letal	-
Tipo B	Alfa	Lecitinase, citolítica, hemolítica e dermonecrótica	Disenteria dos cordeiros, enterotoxemia dos bezerros, ovinos, caprinos e potros
	Beta	Citolítica, letal, dermonecrótica	-
Tipo C ¹	Épsilon	Aumenta a permeabilidade intestinal e capilar, necrosante e letal	-
	Alfa	Lecitinase citolítica, hemolítica e dermonecrótica	Enterotoxemia dos ovinos, enterite necrótica em frangos
	Beta	Letal, necrosante	-
Tipo D	Enterotoxina	Citotóxica, letal	-
	Alfa	Lecitinase, citolítica, hemolítica e dermonecrótica	Enterotoxemia em ovinos, cordeiros e caprinos
	Épsilon	Aumenta a permeabilidade intestinal e capilar, necrosante e letal	-
Tipo E	Alfa	Lecitinase citolítica, hemolítica e dermonecrótica	Enterite hemorrágica em bezerros, enterite em coelhos
	Iota	Aumenta a permeabilidade vascular, letal, dermonecrótica	-

¹ Principais em aves.

Fonte: Adaptado de QUIN, P.J. et al. (2002)^[15].

De modo geral, as enterotoxinas produzidas pelos *C. perfringens* ligam-se a receptores nos enterócitos e induzem a um aumento da permeabilidade celular^[6,7,15]. A toxina alfa destrói a membrana celular dos enterócitos devido à propriedade de fosfolipase C, que hidrolisa os fosfolipídios das membranas celulares separando as porções polar e apolar, formando di-acil-glicerol e ácido fosfatídico, o que consequentemente leva à lise celular^[18].

Devido à ação das toxinas, ocorre necrose da porção apical das criptas intestinais e, consequentemente, a mucosa intestinal desenvolve uma aparência escamosa e aveludada pela presença de material necrótico coagulado. As principais regiões intestinais afetadas são o jejuno e o íleo. A enterite necrótica ocorre em circunstâncias de alterações na flora intestinal (fatores estressantes, alimentação), que favorecem a proliferação rápida da bactéria no trato intestinal e a produção de enterotoxinas^[10,12,13]. Os esporos do *C. perfringens* são bastante resistentes no ambiente, resistem a radiação solar, calor e desidratação por anos. Sobrevivem à temperatura de 100°C por mais de uma hora^[3].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela observação do quadro clínico e das lesões intestinais encontradas na necropsia. O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento do *C. perfringens* associado com o histórico clínico do lote e com as lesões encontradas na necropsia ou histopatologia, pois o simples isolamento, quando não há manifestação clínica nem lesões, não é indicativo da doença, visto que a bactéria é frequentemente isolada no ambiente e no trato intestinal das aves^[1,5].

a) Epidemiologia

O *C. perfringens*, mesmo em pequena quantidade, faz parte da microbiota do trato intestinal das aves, sendo também encontrado no solo, nas fezes e na cama. As principais fontes de infecção são a cama e a ração contaminada^[3,12,17,18]. O cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) também pode ser um dos vetores desse patógeno. Em estudos recentes realizados no Brasil, *C. perfringens* foi um dos agentes isolados em amostras de cascudinhos coletados de granjas avícolas, o que ressalta a importância do controle deles para evitar a disseminação da enterite necrótica^[19].

Os esporos do *C. perfringens* presentes no meio ambiente (por exemplo, na ração e na cama), são extremamente resistentes a dissecção, produtos químicos e temperatura, sendo a cama contaminada uma fonte de reinfecção.

b) Sinais clínicos

Clinicamente as aves apresentam apatia severa, redução do apetite, penas eriçadas, desidratação, diarreia escura e, às vezes, com manchas de sangue. Nos casos agudos ocorre alta morbidade e mortalidade. Os sinais clínicos podem aparecer já aos 7 dias de idade, mas na maioria das vezes ocorre ao redor dos 17 ou 18 dias de idade. A forma subclínica da doença caracteriza-se por diminuição da absorção de nutrientes, alta conversão alimentar e baixo ganho de peso^[1,11]. A enterite necrótica também está relacionada com o aumento na taxa de condenções de fígado e de carcaças, que podem atingir 4% e 12% respectivamente, em lotes severamente afetados^[14].

c) Patologia

As principais lesões observadas por ocasião da necropsia são encontradas no intestino delgado (jejuno e íleo), que se apresenta dilatado, com retenção de gases, conteúdo fétido de cor esverdeada e hemorragias na parede intestinal. Nos casos agudos, a mucosa intestinal apresenta-se coberta por uma pseudomembrana de fibrina e tecido necrótico que também podem se acumular no lúmen intestinal^[11]. Microscopicamente é possível observar reação inflamatória, com severa necrose da mucosa intestinal. As lesões intestinais evoluem do ápice até as criptas das vilosidades, com degeneração do epitélio e exposição da lámina própria. No fígado pode ocorrer aumento do tecido fibroso entre os ácinos hepáticos e colangio-hepatite^[3, 13].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento do *C. perfringens* deve sempre ser considerado em conjunto com o histórico clínico, as lesões na necropsia e o exame histopatológico. A técnica de PCR permite identificar o agente no conteúdo intestinal com maior precisão. Atualmente a técnica PCR multiplex (reação em cadeia de polimerase múltipla) vem sendo amplamente utilizada para genotipificação de amostras através da amplificação dos genes das principais toxinas, *cpa* (toxina alfa), *cpb* (toxina beta), *etx* (toxina épsilon), *iA* (toxina iota), *cpe* (enterotoxina) e *cpb2* (toxina beta2)^[8,9, 15,16].

e) Diagnóstico diferencial

Diferenciar enterite necrótica de colibacilose e coccidiose, principalmente a causada por *Eimeria maxima*.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento do agente ou detecção através da PCR, devem ser enviadas ao laboratório amostras de fígado e intestino delgado (jejuno e íleo) sob refrigeração (2 a 8°C). Fragmentos deles

também devem ser coletados para exame histopatológico. Nesse caso, devem ser fixados em solução de formol a 10% tamponada. Ração e cama aviária também podem ser submetidos ao exame bacteriológico ou a testes moleculares para isolamento ou detecção, respectivamente. As amostras desses materiais devem ser conservadas e transportadas refrigeradas (2 a 8°C)^[13,14].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BALDASSI, L. Necrotic enteritis on broilers in São Paulo State. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 62, n. 1/2, p. 37-43, 1995.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. CHAIRMAN, S.B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J.E. **Isolation and identification of avian pathogens**. 2. ed., 1980.155 p.
5. CHOICKEN-ITURRINO, R.P. et al. Isolation and characterization of pathogenic Clostridium in meat products. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 91-98, 1988.
6. CRAVEN, S.E. et al. Incidence of Clostridium perfringens in broiler chickens and their environment during production and processing. **Avian Diseases**, v. 45, n. 4, p. 887-896, 2001.
7. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1999. 446p.
8. GHOLAMIANDEKHORDI, A.R. et al. Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 143-152, 2006.
9. GOMES, A.M.; Lobato, F.C.F.; Martins, N.R.S.; Assis, R.A. Genotipificação de Clostridium perfringens isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1943-1947, out. 2008.
10. GYLES, C.L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
11. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996.337 p.
12. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
13. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
14. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
15. QUIN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, 2002. 512p.
16. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p
17. SANTOS, J.R.G.; CONCEIÇÃO, F.R.; TURNÊS, C.G. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2076-2082, out. 2008.
18. VAN IMMERSEEL, F. et al. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.
19. VITTORI, J. et al. Alphitobius diaperinus spp como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 37, n. 3, jun. 2007.

1.1.6 Enterite ulcerativa

Conceito

Doença bacteriana aguda que atinge principalmente codornas, sendo também denominada doença das codornas. Eventualmente acomete outras espécies, como frangos jovens e perus. Caracteriza-se por inflamação e ulcerações no intestino com necrose hepática e com alta mortalidade, que pode chegar a 100% em codornas. Em frangos a mortalidade não passa de 10%^[1].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da enterite ulcerativa é o *Clostridium colinum*, bacilo Gram-positivo, anaeróbio, móvel, formador de esporos. O isolamento desse agente é relativamente difícil. Fermenta glicose, manose, rafinose, sacarose e trealose. São negativos para uréase, catalase, lipoase e lecitinase^[2,5]. Por ser esporulado, é extremamente resistente a agentes químicos e a variações de temperatura, permanecendo viável no ambiente por longos períodos. Os esporos são resistentes ao clorofórmio, a aquecimento a 70º C por 3 horas, a temperatura de 80º C por 1 hora e por 3 minutos a 100ºC^[4].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo é feito pelo histórico clínico e pelas lesões. O diagnóstico definitivo é realizado mediante o isolamento e caracterização bioquímica do agente etiológico^[1].

a) Epidemiologia

A transmissão ocorre pela ingestão de alimento, água ou carcaças contaminadas com esporos^[4]. Aves infectadas eliminam o agente pelas fezes, contaminando o ambiente. Equipamentos, pessoas e veículos também podem veicular o agente. Frangos de corte são mais resistentes à infecção, e normalmente quando ocorre está associada a fatores predisponentes, como doença infecciosa da bolsa (Gumboro), coccidiose e anemia infecciosa. Acomete normalmente aves jovens entre 4 e 12 semanas, porém cursa com baixa mortalidade. Em codornas a doença causa alta mortalidade^[1,6,9].

b) Sinais clínicos

O período de incubação é de aproximadamente 3 a 6 dias, e o curso da doença varia podendo durar de 10 dias a 6 semanas. Em casos agudos as aves podem morrer sem apresentar sinais clínicos. Quando há manifestação dos sinais clínicos, ocorre principalmente anorexia, apatia, olhos parcialmente fechados, penas eriçadas e diarreia, geralmente esbranquiçada^[1,5].

c) Patologia

Na necropsia observam-se lesões na porção final do intestino delgado e ceco e do fígado. No intestino, ocorre a presença de hemorragias e ulcerações em diferentes graus, com a formação de uma membrana diftérica amarelada ou mesmo perfuração. Alguns animais também apresentam hepatoesplenomegalia, com degeneração e focos necróticos em ambos os órgãos^[1,8].

Na histopatologia se observam, na porção intestinal afetada, focos hemorrágicos, áreas de necrose coagulativa, infiltração granulocítica e linfocitária na periferia. No fígado as lesões consistem em pequenos focos de necrose coagulativa, com discreta reação inflamatória, podendo apresentar colônias de bactérias, principalmente no parênquima^[2,5].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento do *C. colinum* é difícil. Recomenda-se o cultivo de amostras de tecido afeta-do em caldo triptosa-fosfato-glicose adicionado de 8% de soro equino. Durante a caracterização do agente, deve-se diferenciar do *Clostridium difficile*. Ensaios de imunofluorescência podem de ser usados para auxiliar no diagnóstico^[3].

e) Diagnóstico diferencial

É importante diferenciar a enterite ulcerativa das coccidioses e da enterite necrótica. O *Clostridium perfringens* pode atuar como agente secundário^[8].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento microbiológico, coletar amostras de fígado e baço conservados sob refrigeração. Devido à microbiota, o intestino não representa um material de eleição para o exame bacteriológico. Para exame histopatológico devem ser enviados fragmentos de fígado, baço e intestino fixados em solução tamponada de formol a 10%.

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CHAIRMAN, S.B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J. E. **Isolation and identification of avian pathogens**. 2. ed., 1980. 155p.
4. HIRSH, D. C.; MACLAGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
5. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
6. ONONIWU, J.C.; PRESCOTT, J.F.; CARLSON, H.C.; JULIAN R.J. Ulcerative Enteritis Caused by Clostridium colinum in Chickens. **Can. Vet. J.**, n. 19, p. 226-229, aug.1978.
7. QUIN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed, 2002. 512p.
8. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
9. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.

1.1.7 Dermatite gangrenosa

Conceito

Dermatite gangrenosa é uma doença infecciosa subcutânea que atinge varias espécies de aves, principalmente aves jovens. De caráter agudo, causa edema subcutâneo e necrose. Também é denominada dermatite necrótica^[1].

Etiologia e Patogênese

Os agentes etiológicos mais frequentemente associados à dermatite gangrenosa são o *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium septicum* e *Staphylococcus aureus*. Esses agentes podem apresentar-se isoladamente ou combinados. O *C. perfringens* tipo A e o *C. septicum* são classificados como clostrídios histotóxicos, pois suas toxinas induzem à necrose tecidual^[3,4]. O *C. septicum*

é um bastonete Gran-positivo grande, flagelado e esporulado com esporos ovais (subterminal ou central). O *C. septicum* produz DNAse, hialuronidase, neuraminidase, hemaglutinina e duas toxinas hemolíticas, sendo a principal a toxina alfa, com atividade leucotóxica, necrosante e letal^[2,3,5].

Diagnóstico

O isolamento do agente é difícil, visto que os agentes etiológicos são encontrados facilmente no ambiente e na pele das aves, podendo ocorrer contaminação na coleta da amostra. Deve-se pesquisar a causa primária que desencadeou o quadro de imunossupressão e realizar diagnóstico complementar para doença infecciosa da bolsa (Gumboro), anemia infecciosa, infecção por adenovírus, reticulendoendoteliose e aflatoxicose^[8].

a) Epidemiologia

As aves se infectam pelo contato com a cama ou com o solo contaminados. A ocorrência da doença está associada a fatores predisponentes como lesões de pele preexistentes e fatores imunossupressores tais como doença infecciosa da bolsa, anemia infecciosa, reticulendoendoteliose, adenovirose e fatores ambientais e alimentares.

A doença acomete aves jovens entre duas e oito semanas. Não há evidências de transmissão de ave para ave. A mortalidade é variável, podendo chegar a 50%, dependendo do agente ou da associação. O curso da doença é relativamente curto, podendo durar de 7 a 10 dias^[6].

As perdas econômicas associadas à dermatite gangrenosa variam de acordo com a fase em que ocorre. Em frango de corte as perdas são maiores quanto mais próximo ao abate. Nesse caso, as principais perdas ocorrem por mortalidade, “refugagem” e condenação no abate^[1,7].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, observa-se depressão, incoordenação, inapetência, ataxia, aumento da mortalidade. Aparecimento de celulite e lesões escuras na pele, geralmente nas extremidades das asas, coxas e abdome também é evidente^[1,2,9].

c) Patologia

As aves doentes apresentam lesões escuras na pele, localizadas principalmente na região do peito, das asas e das coxas. As lesões são caracterizadas por edemas subcutâneos, áreas hemorragicas ou serofibrinosas, podendo haver presença de bolhas gasosas com odor fétido. O baço e o fígado se apresentam hipertrofiados, edemaciados e com áreas de necrose. Microscopicamente, observa-se edema, enfisema e celulite no tecido subcutâneo, áreas de hemorragia e necrose no músculo esquelético e áreas de necrose coagulativa no fígado^[2,4].

d) Diagnóstico laboratorial

Clostridium septicum cresce bem nos meios de cultura enriquecidos, favorecido pela adição de glicose. As colônias são, inicialmente, redondas e semitransparentes. Posteriormente, tornam-se maiores e acinzentadas, com bordos filamentosos e irregulares. As características bioquímicas dos agentes *C. perfringens* e *C. septicum* estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Características fenotípicas e bioquímicas diferenciais entre *C. perfringens* e *C. septicum*.

Característica	<i>C. perfringens</i>	<i>C. septicum</i>
Motilidade	—	+
Glicose	+	+
Lactose	+	+
Sacarose	+	—
Maltose	+	+
Galactose	+	+
Salicina	—	+

Diagnóstico Diferencial

Realizar diagnóstico diferencial de diátese exsudativa (deficiência de vitamina E e selênio).

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Pode ser realizar o isolamento dos agentes a partir de suabes do tecido subcutâneo ou do fígado, com extremo cuidado para evitar contaminação. Devido à grande disseminação do(s) agente(s) no ambiente, proceder à coleta de material com extremo cuidado, da forma mais asséptica possível para evitar contaminação.

Para o exame histopatológico, coletar amostras do músculo esquelético, fígado e rim, tendo o cuidado de amostrar a região periférica das lesões, incluído tecido lesionado e aparentemente saudável. Fixar em solução de formol a 10% tamponada.

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CERVANTES, H.M.; MUNGER, L.L.; LEY, D.H.; FICKEN, M.D. Staphylococcus-induced gangrenous dermatitis in broilers. **Avian Diseases**, n. 32, p. 140-142, 1988.
4. COLLETT, S.R. **Gangrenous Dermatitis: A New Look at an Old Problem**. Poultry Diagnostic and Research Centre. The University of Georgia, College of Veterinary Medicine, 2005.
5. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 446p
6. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
7. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
8. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
9. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.

1.1.8 Estafilococose

Conceito

Estafilococose é uma doença infecciosa, não contagiosa, que causa quadros de artrite, sínovite e osteomielite purulenta principalmente em aves silvestres, geralmente como quadro secundário a outras doenças. Tem importância na saúde pública, pois está associada a surtos de toxin-feiração em humanos^[1,2].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico pertence ao gênero *Staphylococcus*, possui aproximadamente 29 espécies, no entanto apenas 4 podem ser patogênica para as aves, sendo a de maior importância *Staphylococcus aureus* e *S epidermidis*. É uma bactéria Gram positivacoagulase-positivo, aeróbio facultativo, beta hemolítica, catalase, manitol e glicose positivo.

O *S. aureus* é encontrado normalmente nas mucosas e pele das aves e no ambiente, a maioria dos fatores de virulência são codificados por genes constitutivos do genoma e alguns por plasmídeos. Os principais fatores de virulência estão associados a características estruturais, como presença de cápsula, proteína A e produção de toxinas^[5,9,10]. A parede celular consiste em proteínas, polissacarídeo e uma proteína (fator de aglomeração), que interage com o fibrinogênio induzindo a aglutinação. A proteína “A” combina-se com o fragmento Fc das imunoglobulinas, diminui a opsonização antigênica e consequentemente diminui a intesidade da fagocitose. O *S. aureus* excreta proteínas bioativas, como lipase, esterase, desoxirribonuclease, estafilocinase, hialuronidase e fosfolipase, *importantes para a patogênese da bactéria*. Além disso, produz toxinas com atividade hemolítica (alfa, beta, gama, delta) e diferentes propriedades de toxicidade. As toxia alfa e delta, por exemplo, tem ação sobre os lipídeos da membrana e levam a lise celular, já a toxina beta possui atividade de fosfolipase C, específica para esfingomielina^[4,7].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo é realizado através do isolamento do *S. aureus* nos órgãos e lesões.

a) Epidemiologia

Normalmente a estafilococose está associada a imunossupressão. Vários representantes do gênero *Staphylococcus* têm importância na saúde pública associados a casos de intoxicação alimentar, entretanto, estas cepas apesar de presentes com frequência na pele, carcaças, após o abate, não causam doença nas aves. As fontes de contaminação das carcaças, em geral são as condições de manipulação e estocagem no ambiente do frigorífico. *Staphylococcus aureus* é moderadamente resistente aos desinfetantes, a dessecção por semanas, ao aquecimento a 60°C por 3 minutos, entretanto, é sensível ao cloro na ausência de matéria orgânica. Pode sobreviver no ambiente por meses, principalmente associados a secreções ou matéria orgânica^[2,5].

b) Sinais clínicos

A estafilococose atinge aves de todas as idades. Lesões de pele, umbigo não cicatrizado, debicagem e corte de dedos favorecem a penetração do *S. aureus*. O período de incubação da doença varia de 3 a 4 dias e as aves acometidas apresentam dificuldade de locomoção, depressão, asas caídas e penas eriçadas. Em aves de postura também ocorre marcada diminuição da produção^[6,8].

c) Patologia

O *S. aureus* está associado tanto a lesões septicêmicas quanto localizadas, como osteomielite abscessos, lesões purulentas localizadas na pele e cabeça. Lesões de artrite e sinovite diferentes articulações, abscessos no coxim plantar lesões nas asas e no dorso. Ocasionalmente o *S. aureus* pode causar celulite e estar associado a dermatite gangrenosa em frangos. As lesões são escuras, úmidas e gangrenosas. Quadros de septicemia com congestão dos órgãos internos, endocardites e granulomas no fígado e no baço podem ocorrer levando a um aumento da mortalidade^[2,9,11].

d) Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico definitivo pode ser realizado através do isolamento e caracterização do *S. aureus*, sendo necessário, durante a caracterização bioquímica, realizar teste de coagulase e fermentação do manitol para diferenciar o *S. aureus*, patogênicos, do *S. epidermidis*, não patogênico. O *S. aureus* é positivo para ambos e o *S. epidermidis* é negativo respectivamente. Sangue bovino é mais apropriado para a detecção da toxina beta. Crescem em 12 horas, formando colônias opacas e lisas^[3,4].

e) Diagnóstico diferencial

É imprescindível diferenciar de outros agentes que podem causar lesões muito semelhantes, como *Mycoplasma synoviae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella gallinarum*, e *reovirus*. Deve-se considerar que o *S. aureus* frequentemente está associado a infecções secundárias o que dificulta o diagnóstico^[2].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

O *S. aureus* pode ser isolado diretamente de lesões no fígado, articulações, tendões, baço, medula óssea, saco da gema, sangue cardíaco e abscessos. As amostras destinadas a bacteriologia devem ser conservadas refrigeradas (2-8°C). Para exame histopatológico coletar amostras de tendões, articulação, fígado, baço e rim, que devem ser conservados em solução tamponada de formalina a 10%^[8,10]. A sorologia não tem valor para o diagnóstico.

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CHAIRMAN, S. B.H.; DOMERMUTH, C.H., PURCHASE, H.G.; WILLIAMS, J. E. **Isolation and identification of avian pathogens**, 2 th, 1980.155 p.
4. DWIGHT C. H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1999, 446p.
5. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames:Iowa State University Press, 1996.337 p.
6. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5 ed, London: WB Saunders. 2001.
7. QUIN, P.J.et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, 2002. 512p.
8. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New print, 2007. 165p.
9. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
10. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.

11. SCHWARTZ, L. D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4 ed., College of Agricultural Sciences, 1994.

1.1.9 Micoplasmoses

Conceito

As micoplasmoses aviárias são enfermidades infecto-contagiosas de distribuição mundial, afetam aves de todas as idades. A ocorrência está associada a altas perdas econômicas, tanto em frango de corte e matrizes.

As espécies de interesse na avicultura são *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) para perus e *M. iowae* (MI). Cada uma dessas espécies possuem características patológicas diferentes. Os micoplasmas aderem-se intimamente às paredes celulares do hospedeiro e causam doenças crônicas e infecções de longa duração. Os principais fatores de virulência dos micoplasmas são as adesinas, sobretudo as hemaglutininas, responsáveis por sua adesão a hemácias, rações imunológicas e motilidade. Os micoplasmas produtores de pneumonia aderem ao epitélio respiratório ciliado, induz a ciliostase, perdas de cílios e alterações citopáticas^[2,7,10,12].

Etiologia

Os micoplasmas são bactérias pertencentes à classe *Mollicutes*, não possuem parede celular, comportam-se como Gram negativos e possuem um genoma pequeno quando comparado a outras bactérias. Como não possuem parede celular são ligados por uma membrana trilaminar simples composta de proteínas glicoproteínas, glicolipídios, fosfolipídio e esteróis. A ausência de membrana celular torna os molicutes resistentes à ação de agentes antimicrobianos que atuam na parede celular ou sua síntese, entretanto dificilmente sobrevivem no meio ambiente, sendo sensíveis a maioria dos desinfetantes.

Epidemiologia

Uma importante forma de transmissão é através das aves infectadas, que permanecem portadoras por vários meses, a transmissão horizontal pode ser por aerossóis, pessoa, ração, água, fômites. Ocorre também transmissão via vertical, transovariana. Os micoplasmas são hospedeiro-específicos, em alguns casos infectam diferentes espécies com estreito relacionamento filogenético, como galinhas, perus e algumas outras espécies de aves domésticas como ocorre com MG e MS. No entanto, os micoplasmas que infectam aves não irão infectar mamíferos e os micoplasmas de mamíferos por sua vez não irão infectar aves.^{14,15,17}

Os micoplasma podem sobreviver sob forma desidratada por vários dias quando protegidos da luz solar, apesar da ausência de parede celular. O microorganismo permanece viável em excrementos de galinhas por um a três dias a 20°C e em gema de ovo por 18 semanas a 37°C. Os micoplasmas são sensíveis a maioria dos desinfetantes utilizados na avicultura.

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico das micoplasmoses é feito pela sorologia (SAR, ELISA, HI), isolamento bacteriano e PCR. Os micoplasmas são organismos de crescimento lento e exigentes *in vitro*, requerem de três a sete dias de incubação e meios semi-sintéticos, ricos em proteínas ou com adição de pelo menos 12% de soro suíno ou equino, o que torna seu cultivo difícil e limitado como ferramenta de diagnóstico de rotina. Os métodos sorológicos como SAR (soro aglutinação rápida) e ELISA são empregados na forma de triagem, visando à mensuração do nível de anticorpos

no soro das aves expostas ao antígeno. A SAR é um método rápido e de baixo custo que se baseia na capacidade de os anticorpos se ligarem a抗ígenos específicos. Já o teste de HI fundamenta-se na capacidade de alguns microrganismos apresentarem, em sua superfície, estruturas capazes de se combinarem com receptores específicos, presentes nas hemácias, as hemaglutininas. É um teste qualitativo e quantitativo que mede, principalmente a presença de imunoglobulinas IgG. Resultados falso positivos quando se utiliza SAR e o ELISA para a detecção de MG e MS podem ocorrer. A resposta humoral típica de uma ave começa com a produção de IgM. Após algum tempo, a produção de IgM se modifica em função da produção de IgG. Os testes sorológicos são capazes de detectar as diferentes classes de anticorpos. A SAR detecta imunoglobulinas da classe IgM que aparecem entre três e cinco dias após a infecção, enquanto que a IgG é detectada pelo HI, sete a dez dias após o início das infecções.

A técnica de PCR para diagnóstico de *Mycoplasma* spp., é utilizada para fins de diagnóstico na avicultura em alguns centros especializados, principalmente quando se trata de aves de reprodução.

O controle e monitoria das micoplasmoses estão no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, onde a Instrução normativa, 44 de 23 de agosto de 2001 aprova Normas Técnicas para o Controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. melleagridis*). Definindo normas e medidas de monitoramento da micoplasmose em estabelecimentos avícolas de controle permanente. Os estabelecimentos avícolas de reprodução devem ser livres de *Mycoplasma gallisepticum* e livres ou sob vigilância e acompanhamento para *Mycoplasma synoviae* e no caso de perus, livre de *Mycoplasma melleagridis*^[2,3,4,18,19].

Mycoplasma synoviae

O *Mycoplasma Synoviae* (MS) causa doença infecciosa em aves, caracterizada por inflamações nas membranas sinoviais e infecções subclínicas no aparelho reprodutor e trato respiratório superior em aves e perus. É uma enfermidade infecto-contagiosa de distribuição mundial, afetando aves de todas as idades, contudo, é mais severa em aves jovens. O impacto econômico da infecção por *M. synoviae* é difícil de estabelecer, esta associado a perdas relacionadas com a artrite em frangos de corte, podendo ser por eliminação de frangos durante o crescimento ou perdas por condenação das áreas afetadas^[17, 18].

Patogênese

O MS tem tropismos pelas serosas, causando quadro de sinovites, principalmente nas articulação e no trato respiratório. O período de incubação varia de acordo com a virulência da cepa, via de inoculação, fatores estressantes e forma de transmissão, normalmente o PI é de 11 a 21 dias. Em pintinhos contaminados através da via vertical o PI é mais curto. A infecção atinge aves jovens entre 4 e 16 semanas e em perus entre 10 a 24 semanas de idade. A produção de toxinas não é importante na virulência do MS, que basicamente possuem adesinas que lhes permitem fixar-se em membranas celulares. Ativação do complemento e de linfócitos T citotóxicos contribui para formação das lesões^[6, 8, 10].

a) Epidemiologia

O MS acomete aves de todas as idades, contudo é mais severa em aves jovens. A transmissão ocorre por via vertical e horizontal, através do contato direto, equipamentos, veículos e pessoas contaminados. A disseminação do MS é relativamente rápido entre aves lojadas no mesmo galpão. Há evidências da circulação de MS e MG em galinhas de “fundo de quintal” destinadas

à subsistência familiar, indicando risco iminente para criações comerciais localizadas proximamente a propriedades familiares. O MS não é estável em pH 6.8 ou mais baixo, sensível a temperatura superior a 39°C. Dificilmente sobrevivem no meio ambiente por não possuir parede celular, sendo sensível a maioria dos desinfetantes utilizados nos programas de limpeza e desinfecção convencionais^[5,12,15]. Brasil, há dificuldade de se estabelecer as perdas causadas por MS criado o conceito de que este é um patógeno secundário.

b) Sinais clínicos

As aves infectadas podem não desenvolver sinais clínicos ou manifestar sinovite com aumento das articulações, consequentemente claudicação, dificuldade de locomoção, letargia e perda de peso. As principais articulações afetadas são tibiotarsianas, bolsas esternais, plantares. A infecção do trato respiratório é leve, podendo ou não estar presente, sendo denominada como aerossaculite silenciosa. Plantéis de matrizes infectadas com *M. synoviae* possivelmente apresentam apenas quadros de aerossaculite de forma crônicas ou subclínicas, ocorrendo redução na postura. Pintinho oriundos de matrizes infectadas com MS possivelmente apresentarão sinovite, estando a manifestação associada a fatores estressantes e de manejo, como super lotação, má qualidade de cama^[1,15].

c) Patologia

As lesões encontradas na necropsia são inflamação das articulações, acúmulo de exsudato viscoso nas membranas sinoviais e tendões, principalmente da articulação tibiotársica, tarsometatársica e coxim plantar. As articulações das asas e bolsa do esterno também podem apresentar lesões, mas em menor frequência. O quadro de MS se agrava quando há infecções secundárias, tais como *E. coli*, Newcastle e bronquite infecciosa. Na forma respiratória pode-se observar aerossaculite. Lesões em outros órgãos como hepatomegalia, esplenomegalia, rins edemaciados e pálidos, podem estar presente em menor grau de ocorrência.

Microscopicamente observa-se depósito de fibrina com acúmulo de heterófilo nos espaços sinoviais com infiltração de linfócitos e macrófagos. Nas mucosas da traqueia e sacos aéreos pode observar infiltrados de linfócitos e heterofilos. Caso mais graves observa-se hiperplasia das células epiteliais, infiltrado difuso de células mononucleares e necrose caseosa^[2,9].

d) Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico pode ser feito através de provas sorológica (SAR e ELISA), o diagnóstico definitivo é realizado através do HI, isolamento bacteriano e a técnica de PCR. A SAR é usada como procedimento sorológico inicial para aferir plantéis de aves livres de MS, por ser um teste de grande sensibilidade, rápido e simples, mas se caracteriza pela baixa especificidade devido ao aparecimento de falsos positivos e falsos negativos. Esta baixa especificidade tem contribuído para falta de segurança no diagnóstico. Além disso, podem ocorrer reações cruzadas entre MG e MS, devido a diferenças significativas na sensibilidade e na especificidade de抗ígenos.

O isolamento bacteriano do MS tem suas limitações, dentre os *Mycoplasmas* spp., o MS é considerado o de maior dificuldade para o cultivo, devido à exigência de NAD (adenina nicotinamida dinucleotídeo). O meio mais utilizado para seu cultivo é o Frey, com composição específica. Nas análises bioquímicas o MS fermenta glicose e maltose, fosfatase negativo e não fermenta lactose. Atualmente a técnica de PCR tem sido empregada com sucesso para realização do diagnóstico de MS^[4,11,17,19].

Mycoplasma gallisepticum

a) Conceito

O MG causa doença respiratória crônica (DRC) em galinhas na forma de aerossaculite, em perus na forma de sinusite infecciosa. A doença afeta frangos de corte, aves de postura comercial e reprodutores, causando altas perdas econômicas. Estas perdas ocorrem em função do decréscimo no ganho de peso e conversão alimentar, queda na produção, qualidade e eclodibilidade de ovos, além de perdas por condenação de carcaças no abatedouro, devido principalmente a aerossaculite^[1,2].

b) Patogênese

A habilidade do MG para causar infecções é dependente da propriedade de adesão à célula hospedeira, que os torna capazes de se fixarem às membranas mucosas, da capacidade de se evadir da ação das imunoglobulinas e da estimulação de citocinas do hospedeiro, determinando a ocorrência de lesões celulares. A aderência é realizada pelas proteínas da membrana plasmática as adesinas, uma vez que o MG não possui parede celular a adesão a membrana da célula do hospedeiro é facilitada. No MG as adesinas já foram caracterizadas, denominadas de MGC1e MGC2. Outra proteína que também possui função de aderência é a pMGA, que está relacionada também com a função de hemaglutinação. O MG é responsável pela formação de produtos tóxicos como superóxidos e peróxido de hidrogênio. O acúmulo gradual desses componentes provoca inibição irreversível da catalase endógena, que por sua vez causa diminuição da superóxido dismutase. Esse processo provoca danos progressivos a células do trato respiratório^[2,6,8,15].

c) Epidemiologia

Do mesmo modo que o MS a transmissão do MG também ocorre de forma vertical e horizontal. Algumas aves podem se tornar portadoras assintomáticas, disseminando a doença pelo plantel. A doença se complica quando associada a infecções secundárias. De acordo com a IN 44 de 23 de agosto de 2001, lotes de granjas de reprodução de linhas puras bisavós, avós e matrizes quando positivos para MG, devem ser sacrificadas.

A morbidade geralmente é alta, entretanto, a mortalidade normalmente é baixa ficando entre 5 %, sendo mais elevada em lotes de frango de corte. O aumento na mortalidade está associada a fatores estressantes, como qualidade do ar, manejo inadequado, superlotação e infecções secundárias^[3,12,16].

d) Sinais clínicos

Em infecção experimental o PI de incubação pode variar de 6 a 21 dias, a sinusite em perus manifesta-se de 6 a 10 dias após a infecção experimental. Inicialmente a infecção se estabelece no epitélio do trato respiratório superior e posteriormente no epitélio do trato respiratório inferior.

Os sinais clínicos respiratórios são leves, as aves apresentam espirros, estertores respiratórios, secreção nasal, sinusite, aerossaculite e diminuição do consumo alimentar. O edema dos seios infra-orbitais é frequente em perus. Quando a infecção ocorre durante a fase de produção de ovos, ocasiona uma diminuição da postura e eclodibilidade. Frangos e perus de corte podem apresentar alta condenação no abatedouro se não forem tratados por aerossaculite^[1,15].

e) Patologia

As principais lesões macroscópicas encontradas são traqueíte, sinusite, aerossaculite, pneumonia fibrinosa, pericardite, perihepatite e depósito caseoso nos sacos aéreos. Presença de excesso

so de muco e exsudato catarral nas narias e traqueia. Outra lesões podem estar presente quando ocorre infecção secundaria, como no caso de infecção por *E. coli*. Microscopicamente apresenta-se infiltração de células mononucleares, hiperplasia das glândulas mucosas e reações linfocitarias. Nos pulmões são observado lesões granulomatosas^[2,914].

f) Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial como descrito anteriormente pode ser realizado através de exames sorológico,(ELISA, SAR e HI), entretanto o diagnóstico definitivo é através do isolamento bacteriano e PCR. O teste de HI (inibição da hemaglutinação) pode ser empregado como confirmatório, detecta anticorpos do tipo IgG que aparecem de 7 a 10 dias após o início da infecção e persistem por até 6 meses, entretanto esta sujeito a falso-negativo. Os titulos de IgM no soro podem persistir por até 80 dias. A técnica de PCR tem sido preferida por detectar o agente de forma direta, com rapidez e eficácia^[16,19,20].

Mycoplasma Meleagridis

a) Conceito

O *Mycoplasma meleagridis* (MM) causa infecções somente em perus, ocasionando aerosaculite, diminuição de eclosão, anormalidade no esqueleto e redução do desempenho. Por quase duas décadas o MM não é mais detectado nas linhagens comerciais do Brasil. Provoca imunossupressão discreta a moderada. Esta bactéria pode ser encontrada na bolsa de Fabricíus, na cloaca de perus jovens, no aparelho reprodutor de aves adultas e no trato respiratório de perus em crescimento sem causar lesões. Deformidades do esqueleto têm sido associadas com a presença de MM^[1].

b) Epidemiologia

A transmissão do MM pode ser através da via horizontal e vertical (transovariana). A transmissão vertical ocorre devido a infecção transovariana devido ao contato com sêmen contaminado. A transmissão horizontal pode ocorrer de forma direta por via aerógena e indireta através de fômites contaminados. A morbidade normalmente é alta, em contrapartida a mortalidade tende ser baixa, normalmente associada a infecções secundárias^[15].

c) Sinais clínicos

Em aves adultas a infecção pode ocorrer sem a presença de sinais clínicos. Embriões infectados podem ter dificuldade de eclosão. Pode haver aumento da mortalidade na primeira semana de vida dos perus e comprometimento do desempenho. Perus que nascem infectados podem apresentar problemas respiratórios. Em perus de 3 a 5 semanas pode ocorrer deformidade no esqueleto, denominada de síndrome TS-65, com aparecimento de aves com pernas tortas, curvadas e deformação das vértebras cervicais. Ocassionalmente pode ocorrer sinovite., inchaço da articulação tibiotarsiana^[1,2].

d) Patologia

Em aves adultas, as lesões são muito brandas ou inexistentes. Macroscopicamente observa-se discreta aerosaculite, principalmente nos sacos aéreos torácicos, lesão presentes também em embriões não eclodidos. As lesões histológicas encontradas nos sacos aéreos, caracterizam por infiltração de heterófilos, células mononucleares e fibrina. Células mononucleares e fibrinas podem ser encontradas nos pulmões. Na síndrome TS-65 em ossos longos, observa-se perose, alteração celular na zona proliferativa da placa de crescimento^[15,16].

e) Diagnóstico Laboratorial

Para o diagnóstico definitivo é necessário efetuar isolamento e identificação da bactéria. Bioquimicamente o MM caracteriza por não fermentar glicose, hidroliza arginina e possui atividade de fosfatase. Sorologias como os testes de SAR e ELISA podem ser usados para monitoria e confirmação da ocorrência de infecção pode ser feita pelo teste de HI devido sua alta especificidade.

De acordo com a IN 44 de 23 de agosto de 2001, lotes de granjas de reprodução de linhas puras bisavós, avós e matrizes quando positivos para MM, devem ser sacrificadas^[3,15].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para diagnóstico microbiológico de *Mycoplasmas* sp. proceder a coleta amostras de fígado, baço, traqueia, pulmões, suabe de traqueia e sacos aéreos, acondicionados sob refrigeração. No caso de suspeita de MS, alem dos demais órgãos coletar também articulação e suabes de articulação. Quando a suspeita for MM o ideal é coletar também o trato reprodutivo e sêmen, acondicionados sob refrigeração.

Para exame histopatológico coletar fragmentos dos mesmos órgãos orientados para coleta microbiológica, no entanto, fixados em formalina a 10%.

Para provas sorológicas a coletar de sangue/soro, de acordo com a finalidade, ou seja, quando a coleta tiver intuito de monitoramento oficial as quantias de amostras coletadas devem seguir a IN 44, de 23 de agosto de 2001 (Tabela 5) e encaminhado para laboratórios credenciados pelo Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Para outra finalidade, deve ser encaminhando para o laboratório no mínimo 20 amostras de sangue/ soro de vários pontos do galpão.

Para a técnica de PCR, coletar suabe de sacos aéreos e traqueia para MG e suabe de traqueia e de articulação para MS, conservado sob refrigeração.

De acordo com a IN 44, quando os resultados da monitoria forem positivos no HI ou ELISA, deve colher suabes de traqueia e soros de vinte aves para confirmação por cultivo e/ou PCR em laboratório credenciado ou oficial.

No caso do MM, estudos relatam que há quase 20 anos não é mais detectado nas granjas de perus. No entanto, sua monitoria esta inclusa no PNSA de acordo com a IN 44 para granjas reprodutoras de linhas puras bisavós, avós e matrizes de perus, a orientação para a coleta segue a mesma para MG e MS (quadro 01)^[3,5,13, 19].

Tabela 5. Orientação para coleta de acordo com a IN 44 de 23 de agosto de 2001.

MICOPLASMA	No nascimento de linhas puras e bisavós	Sorológico Bacteriológico	Ovos e pintinhos	20 aves por lote 30 ovos férteis por lote
	12ª semana (+/- 2 semanas)	Sorológico	Soro	MG e MM – 150 amostras/núcleo Ms 100 amostras/ núcleo
	Início postura 5% de produção (24 a 26 semanas)	Sorológico	Soros	MG e MM – 150 amostras/núcleo MS 100 amostras/ núcleo HI/MG e MS 100 amostras/núcleo
		Bacteriológico	Suabe de traqueia	20 aves / 02 aves por suabe
	A cada 3 meses	Sorológico	Soro	MG e MM – 150 amostras/núcleo MS 100 amostras/ núcleo

Fonte: Adaptado da IN 44, MAPA (2001)^[3].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 68. 24, ago. 2001.
4. CARDOSO A.L.S.P. et al. Prova de soroaglutinação rápida em galinhas reprodutoras como monitoria sorológica de micoplasmoses. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, p. 96-99, 2003.
5. CHRISTENSEN, N. H.; CHRISTINE A. Y.; McBAIN, A. J.; BRADBURY, J. M. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. **Avian Pathology**, n. 23, p. 127-143, 1994.
6. DUFOUR-GESBERT, F. et al. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 148-154, 2006.
7. DWIGHT C. H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1999, 446p.
8. GRASHOFF, M.; SCHUMACHER, L.; HAUSER, H. Mycoplasma Detection by the Mycoplasma PCR ELISA. **Biochemica**, n. 3, 1995.
9. GYLES, C.L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
10. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames:Iowa State University Press, 1996.337 p.
11. HIRSH, D. C.; MACLAGLAN, N.J.; WALKER, R. W. **Veterinary Microbiology**, 2th. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
12. HONG Y. et al. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. **Avian Diseases**, v. 48, p. 606-616, 2004.
13. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5th, London: WB Sauders. 2001.
14. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New print, 2007. 165p.
15. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
16. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
17. SANTOS, B.M.; GÓMEZ, S.Y.M.; DE PAULA, A.C.B. Confabilidade de um teste de triagem para Micoplasmose aviária. **Vet. Zootec.** v. 1, n. 1, p. 18-23, 2007.
18. WANG, H.; FADL, A.A.; KHAN, M.I. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. **Molec. Cell. Probes**, n. 11, p. 211-216, 1997.
19. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH / OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5 ed., 2004.
20. ZAIN, M.Z.; BRADBURY, J.M. Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on applicator swabs. **Vet. Microbiol.**, n. 49, p. 45-57, 1996.

1.1.10 Salmoneloses

Conceito

A salmonelose aviária é uma doença infecciosa de grande importância tanto para a produção avícola quanto para a saúde pública. Causada por sorovares específicos e inespecíficos do gênero *Salmonella* que ocasiona enterite e septicemia esporádica em planteis avícolas. Atualmente são conhecidos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*, entretanto aproximadamente 70% dos casos de salmonelose em animais e humanos são devido a 10 ou 12 sorotipos. Apesar dos avanços na área do conhecimento microbiológico e epidemiológico da salmonelose, é praticamente impossível eliminar totalmente a *Salmonella* spp. da produção avícola e da cadeia alimentar^[1,12,16].

Etiologia e patogênese

Pertencente à Família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* spp. está classificado em duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies e *Salmonella bongor* (Tabela 6). *Salmonella* spp. é classificada como coco-bacilo Gram negativo, móveis (exceção de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, que são imóveis), com flagelos peritriquiais e usualmente fazem parte da microbiota autoctone do trato intestinal de animais domésticos e selvagens, especialmente das aves, roedores, insetos, répteis e anfíbios^[16].

Tabela 6. Espécies de *Salmonella* spp.

<i>Espécie</i>	<i>Subespécies</i>	<i>Quantidade serovares</i>
<i>S. enterica</i>	entérica	1.531
	salamae	505
	arizonae	99
	diarizonae	336
	houtenae	73
	indica	13
<i>S. bongori</i>		22
TOTAL		2.579

Fonte: Adaptado de Quin, et al. (2002)^[16]

A *Salmonella* spp. possuem serovares bioquimicamente relacionados, diferenciando-se as subespécies entre si pela combinação de seus抗ígenos somáticos (O) e flagelar (H). A especificidade do抗ígeno "O" é determinada pela estrutura e composição do lipopolissacarídeo

(LPS) da parede celular, este抗ígeno consiste de unidades oligossacarídicas repetidas, onde o tipo, ordem e repetição dos açúcares diferem entre os sorotipos. O抗ígeno "O" é o principal responsável pela ativação das respostas imunes dos tipos humorais e celulares. Os抗ígenos "H" são de natureza proteica e também são espécie-específico, denominados抗ígenos H1 e H2 representados pela proteína Flagelina, codificados pelos genes *h1* e *h2*. Algumas *Salmonellas* possuem o抗ígeno capsular "Vi" encontrado somente em *S. Typhi*, *S. Dublin*, *S. Paratyphi* e *S. Hirschfeldii*. A classificação dos sorotipos segue o esquema de Kauffmann-White, sendo classificados segundo a diversidade dos抗ígenos, somático "O", determinada pela estrutura e composição do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular e são expressos por números arábicos^[7,8].

Na avicultura, a principal rota de infecção pela *Salmonella* spp. é a via oral. A contaminação fecal da casca dos ovos é o principal fator de disseminação do agente no incubatório. Após a ingestão da *Salmonella* spp. pela ave, a bactéria passa a se localizar no inglúvio e intestino, no qual ocorre a multiplicação da bactéria, sendo eliminada intermitentemente nas fezes. No intestino, a *Salmonella* spp. expressa diversos fatores de virulência que induzem a uma resposta inflamatória da mucosa intestinal, decorrente a produção de enterotoxinas e da invasão do epitélio^[8,10].

No local da lesão ocorre influxo de leucócitos neutrofílicos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos com liberação de substâncias vaso ativas que aumentam a permeabilidade dos vasos da mucosa intestinal, ocasionando a exsorção de fluido, resultando em diarreia. A penetração e a invasão das microvilosidades ocasiona à proliferação de macrófagos residentes nos folículos linfoides. As *Salmonella* spp são capazes de sobreviver no interior de macrófagos, possibilitando a disseminação para órgãos do sistema reticuloendotelial, como fígado e baço e quadros variáveis de bacteremia com a invasão de órgãos internos e aparelho reprodutor^[2,7,11].

As salmonelas são capazes de resistir nove meses em solos úmidos, na água e em insumos para alimentação animal. São sensíveis à luz solar, 60°C por 5 minutos e aos desinfetantes mais frequentemente empregados nos programas de limpeza e desinfecção como fenóis, clorados e iodados. Em baixas temperaturas a bactéria pode permanecer viável por meses.

Devido a grande importância da Salmonelose na avicultura e na saúde pública, plantéis de matrizes reprodutoras devem seguir padrões de certificação do Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, como livres de *Salmonella Gallinarum*, *S. Pullorum*, e livres ou sob vigilância e acompanhamento para *Salmonella Enteritidis*, *S. Typhimurium*, conforme a Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003^[6].

Na avicultura moderna, as principais salmoneloses são: Pulorose, Paratifo aviária, Tifo aviária e Arizonose.

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo é realizado através do isolamento, caracterização bioquímica e sorológica da bactéria. Prova de motilidade é necessária para diferenciar a *S. Gallinarum* e a *S. Pullorum*, que são imóveis. A identificação sorológica do gênero *Salmonella* spp pode ser feita com antisoros somáticos polivalentes para o antígeno O e H em testes de aglutinação rápida em lâmina. A prova de soroaglutinação rápida (SAR) detecta anticorpos contra *S. Gallinarum* e a *S. Pullorum*, sendo utilizado como método de triagem. Outras provas sorológicas como teste de soroaglutinação lenta em tubos e ELISA também são empregadas para confirmação do diagnóstico. A PCR também é utilizado no diagnóstico das salmoneloses^[14,19].

a) Pulorose

Conceito

Doença infectocontagiosa causada pela *Salmonella pullorum*, também conhecida por diarreia branca ou septicemia fatal dos pintinhos. Caracteriza-se por diarreia esbranquiçada e alta mortalidade em aves jovens, enquanto as aves adultas se tornam portadores assintomáticos^[2,7].

b) Etiologia e Patogênese

A *Salmonella pullorum* apresenta抗ígenos somáticos (O) 1, 9 e 12 e não possui抗ígenos flagelares H, ou seja, é uma salmonela imóvel. Pertence ao sorogrupo D de acordo com o esquema de Kauffmann-White (classificação elaborada a partir do conhecimento da estrutura antigênica).

ca dos sorotipos)^[9]. Apresenta significativas diferenças de susceptibilidade entre as diferentes linhagens de aves. Pode acometer aves de qualquer idade, mas principalmente aves jovens, nas três primeiras semanas de vida. A *S. pullorum* é relativamente resistente no ambiente, podendo sobreviver por meses em condições de umidade. Estudos relatam a sobrevivência de *S. pullorum* por cerca de 11 semanas em camas novas e 3 semanas em camas descartadas^[8,13,17].

c) Epidemiologia

A pulorose acomete geralmente aves jovens, sendo mais comum e severa em aves com menos de três semanas de idade e mais rara em aves adultas. A principal forma de transmissão é a vertical, ou transovariana. Essa forma de contaminação pode ocorrer diretamente na gema ou no albúmen através dos órgãos reprodutivos antes da formação da casca. As aves infectadas eliminam *Salmonella* spp. nas fezes, sendo esse um importante fator de contaminação ambiental. O canibalismo de aves infectadas, procedimentos como “debicagem” e ingestão de ovos contaminados podem estar envolvidos na transmissão do agente. A transmissão horizontal na incubadora, pelos pintinhos contaminados, também assume grande importância^[4,7].

Aves como patos, galinhas d’angola, faisões, codornas, papagaios, canários e pardais podem infectar-se naturalmente, sendo epidemiologicamente importantes para estabelecer critérios para programas de controle e erradicação de salmoneloses. Como o agente é eliminado pelas fezes, a transmissão pode ocorrer pela ingestão de ração e água contaminadas e pela cama contaminada. Pessoas, aves silvestres e moscas também podem estar envolvidas na transmissão da bactéria. A mortalidade é variada: em alguns surtos pode chegar a 100%, mas normalmente fica em torno de 50%. A morbidade normalmente é muito maior que a mortalidade pelo fato de que algumas aves afetadas, recuperando-se espontaneamente, tornam-se portadoras assintomáticas^[4,14].

A *S. pullorum* causa doença especificamente em aves, particularmente em galinhas e perus. Conforme a Instrução Normativa nº 78, de 2003, a pulorose é uma enfermidade de notificação e sacrifício obrigatórios no Brasil, para estabelecimento de reprodução avícola^[5].

d) Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos da pulorose nas aves jovens são apatia, diminuição do apetite, retardos no crescimento, amontoamento, diarreia esbranquiçada com material branco acumulado ao redor da cloaca, penas arrepiadas e asas caídas. Os pintinhos nascidos de ovos infectados, logo após o nascimento, apresentam letargia, fraqueza, anorexia e pode ocorrer morte súbita. O pico de mortalidade normalmente ocorre entre a segunda e a terceira semana de idade com rápido declínio na quarta semana^[3,4,12]. Em aves adultas a pulorose pode ser assintomática ou apresentar diminuição na postura, fertilidade e eclodibilidade, podendo em alguns casos apresentar diarreia branco-amarelada ou branco-esverdeada, bem como depressão e anorexia^[18].

e) Patologia

Alterações macroscópicas em aves jovens nos casos agudos podem estar ausentes. Quando presentes é possível observar hipertrofia e congestão do fígado, baço e rins, e onfalite. Pintinhos que sobrevivem podem apresentar lesões de necrose com aspectos nodulares, esbranquiçados ou acinzentados no fígado, no coração, na moela, no intestino e no pâncreas. O ceco pode conter material caseoso. Em aves adultas as lesões macroscópicas podem ser mínimas, porém as alterações mais comuns são folículos ovarianos císticos com a presença de material hemorrágico ou caseoso. Pode ocorrer atrofia dos ovários e ovoperitonite. Nódulos esbranquiçados podem estar presentes no coração, na moela, no mesentério, na parede intestinal e no fígado. Alterações cardíacas como pericardite também são um achado comum^[2,7,17].

Microscopicamente, nos casos agudos observa-se congestão vascular em vários órgãos, principalmente no fígado, no baço e nos rins. Também pode ocorrer necrose da mucosa e submucosa do ceco e em alguns casos necrose multifocal de hepatócitos com acúmulo de fibrina. Nos casos crônicos os animais apresentam congestão hepática crônica passiva com fibrose intersticial e inflamação fibrino-piogranulomatosa ou fibrino-supurativa com intensa infiltração de heterófílos e fibrina nos óvulos e ovários^[14,17].

f) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo da pulorose requer isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica da *S. pullorum*. Testes sorológicos como soroaglutinação rápida em placa (SAR), soroaglutinação lenta em tubos, ensaio imunoenzimático e ELISA detectam presença de anticorpos circulantes. Entretanto, esses testes podem apresentar falsos positivos e falsos negativos por reações cruzadas com outras salmonelas, principalmente *S. gallinarum* e *S. enteritidis*^[19].

• Tifo aviário

a) Conceito

O tifo aviário é a principal salmonelose que afeta granjas de postura comercial e aves de “fundo de quintal”. É uma doença septicêmica, caracterizada por curso agudo ou crônico, com índice de mortalidade moderado a alto, dependendo da virulência da cepa envolvida^[2,4].

b) Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é a *Salmonella gallinarum*, que, apesar das diferenças bioquímicas com *S. pullorum*, é antigenicamente muito semelhante, dificultando a diferenciação sorológica. A *S. gallinarum* possui os mesmos抗ígenos somáticos da *S. pullorum*: 1, 9 e 12. O tifo caracteriza-se por apresentar quadros septicêmicos mais comumente em aves adultas, no entanto pode acometer aves de todas as idades^[7].

c) Epidemiologia

A principal via de transmissão da *S. gallinarum* é a horizontal, através do contato com aves doentes e mortas (canibalismo). A presença de moscas, pássaros, roedores, veículos e fômites contaminados e a circulação de pessoas também são importantes na transmissão do agente^[8]. Aves portadoras disseminam grandes quantidades da bactéria no ambiente, facilitando a contaminação do plantel. Atualmente, considera-se a transmissão pela via vertical controversa, uma vez que alguns estudos detectaram *S. gallinarum* em ovos em percentuais baixos e outros mais recentes não detectaram *S. gallinarum* em ovos de galinhas infectadas^[5]. Em plantéis infectados a morbidade e a mortalidade são altas. e para a maioria dos casos a mortalidade varia entre 10 e 50%^[2,11].

d) Sinais clínicos

O tifo aviário acomete principalmente aves adultas. O período de incubação é de 4 a 5 dias, os principais sinais clínicos são prostração, diarreia esverdeada, queda na postura e inapetência. A morte sobrevém em poucos dias. O curso da doença é de 5 a 7 dias dependendo da virulência da cepa. Em aves jovens os sinais clínicos são semelhantes aos que ocorrem na pulorose, como letargia, inapetência e mortalidade^[3,4].

e) Patologia

Na necropsia os animais apresentam congestão dos órgãos internos, anemia devida à destruição de hemácias pelo sistema reticuloendotelial, hepatomegalia intensa com coloração bronze-es-

cura acompanhada de focos necróticos (esbranquiçados) e distensão da vesícula biliar. O baço se apresenta aumentado com pontos necróticos ou hemorrágicos, o ovário se apresenta atrofiado, com folículos hemorrágicos, císticos, disformes com conteúdo caseoso ou hemorrágico. Pode ocorrer peritonite por conta da ruptura de óvulos, enterite catarral principalmente no duodeno e pericardite com a presença de líquido no saco pericárdico. No exame histológico é possível observar necrose hepática multifocal, com infiltrado heterofílico, necrose focal no baço e infarto no miocárdio com áreas fibronecróticas. Estudos hematológicos verificaram quadro de anemia severa com diminuição da hemoglobina, hematócrito e contagem total de hemácias das aves infectadas. A hiperplasia da medula óssea é indicada pela acentuada leucocitose com presença de células jovens^[14,16].

f) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico pode ser realizado com provas sorológicas como soroaglutinação em placa, soroaglutinação lenta em tubo, microaglutinação e testes de ELISA. Todos esses ensaios podem fornecer dados altamente sugestivos de tifo aviário. Sorologia positiva deve ser diferenciada de outras salmonelas, principalmente do grupo D, como *S. enteritidis* e *S. pullorum*. O diagnóstico definitivo é realizado através do isolamento e da caracterização bioquímica da *S. gallinarum*, devendo-se ter cuidado para diferenciar bioquimicamente a *S. gallinarum* da *S. pullorum*^[9,19,22].

g) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve inicialmente levar em consideração outras salmonelas. Enfermidades infecciosas como colibaciloses, pasteurelose e micoplasmosse também merecem atenção quando da suspeita de tifo aviário.

• Paratifo aviário

a) Conceito

O paratifo aviário é uma doença com epidemiologia e etiologia complexas, causada por *Salmonella enterica* subespécie enterica, denominadas paratifoides, com exceção dos sorovares *S. arizonae*, *S. pullorum* e *S. gallinarum*. No passado, surtos de toxinfecção alimentar, principalmente os causados por *S. enteritidis*, com frequência eram associados ao consumo de ovos ou alimentos contendo ovos contaminados^[1,2].

b) Etiologia e Patogênese

As salmonelas entéricas mais frequentemente envolvidas nos casos de paratifo aviário são: *Salmonella enteritidis* (SE) e *Salmonella typhimurium*, entretanto, as *S. agona*, *S. infantis*, *S. Hadar*, *S. Senftenberg* e *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* e *S. enteritidis* são sorologicamente relacionadas e devem ser diferenciadas utilizando antissoros polivalentes O e H. A *Salmonella enteritidis*, além de colonizar o intestino das aves, invade outros órgãos, como, fígado, baço, vesícula biliar, pâncreas, folículos ovarianos e oviduto. A severidade e o curso da doença dependem, normalmente, de fatores ambientais, grau de exposição e da presença de infecções concomitantes^[4,10].

c) Epidemiologia

As salmonelas relacionadas que causam o paratifo são patogênicas para todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens. Depois de infectados, eles tornam-se portadores assintomáticos, mantendo a contaminação ambiental. Entre os mamíferos, os roedores são os principais vetores, pois são portadores de *S. Typhimurium* e *S. enteritidis* e podem ter acesso a locais críticos, como reservatórios de água e depósitos de ração. A transmissão horizontal pode ocorrer por insetos, ácaros e lagartos que atuam como veículos de transmissão entre os galpões, bem como pessoas,

equipamentos, água, alimentos e fômites contaminados^[5,18]. Pode ocorrer transmissão para o ovo por contaminação do trato reprodutivo, ou pela contaminação da casca do ovo em contato com as fezes nos ninhos. Além disso, a superfície externa da casca do ovo pode ser contaminada durante a postura, possibilitando a penetração da bactéria através da casca. Essa condição é favorecida por umidade, temperatura, tempo de exposição e qualidade da casca. A contaminação fecal da casca dos ovos tem grande importância também na disseminação da bactéria na incubadora^[14,21].

A mortalidade é mais frequente nas duas primeiras semanas de vida, sendo o pico de perdas entre o sexto e o décimo dia, e raramente acomete aves com mais de três semanas de idade. Nos casos de infecções alimentares envolvendo *Salmonella* spp., os sorovares isolados com maior frequência são *S. enteritidis*, seguido por *S. Typhimurium*^[18].

d) Sinais clínicos

A severidade e o curso da doença dependem de fatores ambientais, do grau de exposição e da presença de infecções concomitantes. As manifestações clínicas geralmente ocorrem em aves jovens, que permanecem eliminando o agente por longo período. As aves apresentam-se apáticas, com penas erriçadas, asas caídas, diarreia aquosa, desidratação, diminuição do consumo e procura por fonte de calor. A mortalidade nessa fase varia desde 10% até 80%, contudo, a partir da quarta semana, os sinais clínicos e a mortalidade tendem a desaparecer^[2,17].

Em aves adultas raramente se observam sinais clínicos, mas em alguns casos podem apresentar inapetência e diminuição da postura. Quando ocorre infecção horizontal ou na incubadora, a mortalidade de pintinhos é alta nos primeiros dias. O número de ovos bicados e não bicados contendo embriões mortos também é elevado^[2,4].

e) Patologia

Macroscopicamente, aves jovens podem apresentar hepatoesplenomegalia com congestão e pontos necróticos no baço e no fígado^[20]. Pode ocorrer enterite severa com lesões necróticas focais na mucosa do intestino delgado. O ceco pode apresentar-se atrofiado com a parede espessada e presença de conteúdo branco ou amarelado. Os rins também podem estar aumentados e congestos. Em pintinhos nota-se presença de gema não reabsorvida com característica necrótica ou caseosa. Em casos muito agudos, as alterações macroscópicas não são observadas. Aves adultas apresentam atrofia e lesões hemorrágicas no ovário e nos folículos^[14,18].

f) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo é realizado mediante isolamento e identificação do agente. As colônias com características de *Salmonella* spp. devem ser submetidas aos testes fenotípicos e bioquímicos, capazes de caracterizar o gênero *Salmonella* spp. assim como definir as características de motilidade, pois somente a *S. gallinarum* e *S. pullorum*, que pertencem ao grupo paratifoide, são imóveis. As amostras identificadas bioquimicamente como *Salmonella* spp. devem ser submetidas a sorotipificação^[16,22].

• Arizonose

A arizonose é uma doença infecciosa de grande importância econômica, principalmente para perus jovens, causada pela *Salmonella enterica arizona*. Apesar de a infecção por *S. enterica arizona* ter sido descrita em diferentes espécies, incluindo o homem, aves silvestres e domésticas, a espécie mais suscetível é o peru^[3].

A arizonose cursa com um quadro entérico que pode estar associado a empastamento de cloaca, necrose da parede cecal, septicemia, opacidade da córnea, ocasionalmente pneumonia e

morte. A principal via de transmissão é a vertical, como nos casos de *S. gallinarum* e *S. pullorum*. Há mais de duas décadas não ocorre seu isolamento no Brasil^[2,6].

Em galinhas a doença é rara, e quando ocorre, os sinais e as lesões são brandos. Para o isolamento e a caracterização bioquímico-antigênica, seguir o mesmo procedimento para as demais salmonelas. Existem descritas dezenas de sorotipos de *Salmonella arizona*^[2].

Colheita e remessa de material para exames laboratoriais

Para isolamento bacteriológico do agente ou detecção através da PCR devem ser coletados fígado, baço, intestino, tonsilas cecais, coração, ovários, gemas, ovos bicados, meconio, pintinhos de um dia (animal inteiro), devendo esses materiais ser conservados sob refrigeração entre 2 e 8°C. O número de amostras varia de acordo com a finalidade. No Tabela 7 está a descrição da amostragem mínima requerida pelo Mapa para monitoria oficial visando à certificação de plantéis. Também podem ser enviados para exame bacteriológico materiais como cama, suaves de arrasto e suaves de instalações e equipamentos. Nesses casos, devem-se manter as amostras coletradas em meio enriquecido com água Peptonada Tamponada ou leite desnaturado estéril. No caso de aves vivas, podem-se realizar suaves de cloaca utilizando um suave para cada duas aves^[6,15].

Tabela 7. Procedimentos para coleta de material segundo a Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa).

<i>Salmonela</i>	Primeira semana (1 a 5 dias)	Bacteriológico	Órgãos	Pool de 5/máximo 50 aves
			Swab de arrasto	1 pool dos círculos/galpão
	12 ^a semana (± 2 semanas)	Bacteriológico	Swab de arrasto ou	1 pool de dois suaves de arrasto por galpão do núcleo
			Swab de cloaca ou	1 pool de 50 aves/1 suave p/ 2 aves, um total de 100 aves por núcleo
		Sorológico	Fezes frescas	1 pool de 100 amostras de fezes por núcleo
			Soros	100 amostras/núcleo
	Início da postura 5% de produção (± 24 a 26 semanas)	Bacteriológico	Swab de arrasto ou	1 pool de dois suaves de arrasto por galpão do núcleo
			Swab de cloaca ou	1 pool de 50 aves/1 suave p/ 2 aves
		Sorológico	Fezes frescas	1 pool de 100 amostras de fezes por núcleo
			Soros	100 amostras/núcleo
	A cada 3 meses	Bacteriológico	Swab de arrasto ou	1 pool de 2 suaves de arrasto por galpão do núcleo
			Swab de cloaca ou	1 pool de 50 aves/1 suave p/ 2 aves
			Fezes frescas	1 pool de 100 amostras de fezes por núcleo
			Ovos bicados	Pool de 20 ovos/swabs de gema/ 150 ovos bicados não nascidos, em dez pools de 15 ovos
		Sorológico	Mecônio ¹	Mecônio de 200 aves, em quatro pools de 50 aves 50ml/pool /núcleo referente ao
			Soros	100 amostras/núcleo ²

¹ Oriundo de aves não vacinadas.

² matrizes não vacinadas.

Fonte: Adaptado da IN 78, MAPA (2003)^[6]

Para exame histopatológico, devem ser colhidos fragmentos de fígado, baço, ovário, rins e demais órgãos que apresentarem lesões. Esses fragmentos devem ser fixados em solução de formalina a 10% tamponada. Para monitoramento sorológico dos plantéis, realizar a colheita de sangue/soro visando ao diagnóstico de *S. pullorum*, *S. gallinarum* e *S. enteritidis*.

Referências bibliográficas

1. ANTUNES, P., CRISTINA, R., SOUSA, J.C., PEIXE, L., PESTANA, N. Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal Food of Microbiology**, p. 97-103, 2003.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
3. BACK, A. Manejo sanitário de perus. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 322-327, jul./set. 2007.
4. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
5. BERCHIERI JR., A.; MURPHY, C.K.; MARSTON, K.; BARROW, P.A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v. 30, p. 221-231, 2001.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p 3, 5, nov. 2003.
7. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
8. DHILLON, A.S.; SHIVAPRASAD, H.L.; ROY, P.; ALISANTOSA, B.; SCHABERG, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of Environmental Origin *Salmonella* in Specific Pathogen-Free Chicks. **Poultry Science**, p. 1323-1328, 2001.
9. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 446p.
10. GYLES, C.L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing, 2004. 456p.
11. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
12. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
13. HENDERSON,S.C.;BOUNOUS,D.I.;LEE,M.D. Early events in the pathogeneses of avian salmonellosis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, 1999.
14. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
15. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New print, 2007. 165p.
16. QUIN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, 2002. 512p.
17. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
18. RIEMANN, H.; KASS, P.; CLIVER, D. *Salmonella enteritidis* epidemic. **Science**, 287, p. 1754-1755, 2000.
19. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
20. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.
21. SILVA, E.; DUARTE, A. *Salmonella Enteritidis* em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, mai/ago, 2002.

22. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2 Doenças Víricas

1.2.1 Anemia infecciosa das galinhas

Conceito

Anemia infecciosa é uma doença viral, descrita em planteis de aves na maioria dos países com avicultura industrial, causando perdas econômicas devidas ao retard no crescimento (desuniformidade) e ao uso excessivo de medicamentos para controlar infecções bacterianas secundárias^[3,15]. A doença é caracterizada por marcada anemia, aplasia da medula óssea, mortalidade variável, atrofia generalizada de órgãos linfoides, retard no crescimento e imunossupressão. É considerada uma das viroses do complexo de doenças imunossupressoras economicamente importantes em aves.

Etiologia e Patogênese

O vírus da anemia infecciosa das galinhas, também denominado CAV (*Chicken Anemia Virus*) ou CIAV (*Chicken Infectious Anemia Virus*), recentemente foi classificado como pertencente à família *Circoviridae*, gênero *Gyrovirus*. O CAV é um DNA vírus de fita simples que não possui envelope^[12,13]. O genoma do CAV codifica três proteínas virais, VP1, VP2 e VP3. A VP1 forma o capsídeo e junto com a VP2 induz imunidade protetora. A VP3 ou “apoptina” exerce importante função na patogenia atuando na depleção de linfócitos T, ou seja, responsável pela apoptose dos precursores tímicos infectados e hemocitoblastos da medula óssea. Todas as cepas do CAV pertencem a um único sorotipo, entretanto, considerando as diferenças de imunogenicidade e de sequência de DNA, é esperado que as cepas possam diferir quanto a sua patogenicidade^[1,5,11].

A replicação inicial do CAV ocorre nos linfócitos T do timo e nas células hematocitopoiéticas da medula óssea. Destrução e depleção dos hemocitoblastos na medula óssea são evidenciadas por volta de oito dias após a infecção, resultando no surgimento da anemia. Os hemocitoblastos também dão origem aos trombócitos, sendo a redução dessas células relacionada ao aumento das hemorragias intramusculares. Os linfócitos B e suas células precursoras não são suscetíveis à infecção pelo CAV, essenciais para a sobrevivência e recuperação das aves infectadas. O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes ocorre três semanas após a infecção^[13,14,16].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo com base nos sinais clínicos, nas lesões e no histórico do plantel é difícil, uma vez que eles podem ser confundidos com outras enfermidades. Para associar a presença do CAV ao quadro clínico é necessário demonstrar a presença do vírus por isolamento viral ou detecção do DNA e, preferencialmente, em um número significativo de aves, para somente então associar a infecção aos sinais clínicos e às lesões^[14].

a) Epidemiologia

A transmissão do vírus da anemia aviária ocorre tanto pela via vertical quanto pela horizontal. A transmissão vertical é a forma mais importante para a disseminação do vírus para a progênie. Em lotes de reprodutoras infectadas a transmissão através do ovo ocorre entre oito e 14 dias após a infecção das fêmeas, podendo persistir por um período de três a seis semanas e em alguns

casos por até 12 semanas após a infecção. A transmissão vertical persiste até as aves desenvolverem anticorpos neutralizantes. Após a soroconversão, as matrizes transferem passivamente anticorpos para o ovo, que irão controlar a infecção, protegendo total ou parcialmente a progênie durante a fase de suscetibilidade da doença, ou seja, nas duas primeiras semanas de vida. A transmissão horizontal pode ocorrer por contato direto ou indireto, através de instalações, cama e fômites contaminados. A eliminação do vírus ocorre principalmente através das fezes, onde o vírus está em alta concentração, entre cinco e sete semanas após a infecção. A disseminação do vírus é favorecida pela resistência do CAV à inativação por desinfetantes comumente utilizados nos programas de limpeza e desinfecção^[2,4,11].

O CAV é bastante resistente ao tratamento físico e ao químico. Pode resistir ao éter etílico, ao clorofórmio, à acetona e à amônia quaternária 5%. É estável em pH 3 por cerca de três horas, 70°C por uma hora e à temperatura de 80°C por 15 minutos. É inativado a 100°C por 15 minutos, por desinfetantes à base de glutaraldeído 1% e à base de formol a 5% por 24 horas à temperatura ambiente. Desinfetantes comerciais com base em sabão não são eficazes para a eliminação do CAV. O uso de soluções com concentrações de 10% de iodo ou hipoclorito são eficazes para eliminação do vírus, mas requerem cerca de 2 horas de exposição a 37°C. Inativação de bioproductos de galinhas infectadas requerem tratamento a uma temperatura de 95°C por 35 minutos ou 100°C por 10 minutos^[2,3,12].

A morbidade e a mortalidade de aves em surtos podem variar. A taxa de mortalidade normalmente é de 10% a 20%, podendo chegar a 60%. Já a taxa de morbidade pode chegar a 100%. As perdas estão diretamente relacionadas com a idade em que as aves são infectadas, aos níveis de imunidade passiva e à circulação de doenças imunossupressoras, a como doença de Gumboro e a doença de Marek nos plantéis^[1,10].

b) Sinais clínicos

O período de incubação da doença varia de 10 a 21 dias, dependendo da carga viral infectante, das condições de manejo e de outras doenças envolvidas. Os sinais clínicos geralmente começam a surgir depois de 10 a 14 dias, com um pico de mortalidade dos 17 aos 24 dias^[11,13].

Aves de todas as idades são susceptíveis, mas somente pintinhos com baixa imunidade passiva ou infectados verticalmente podem manifestar os sinais clínicos da doença. As aves afetadas apresentam atraso no desenvolvimento, apatia, anemia, plumagem eriçada, hemorragias subcutâneas ou musculares e atrofia do timo. Devido à imunossupressão causada pelo CAV, podem ocorrer infecções secundárias como também redução da resposta imunológica a algumas vacinas^[3,12,10].

As matrizes infectadas durante o período de reprodução, não manifestam sinais clínicos, como alterações na postura, infertilidade dos ovos ou inviabilidade embrionária. O desaparecimento da imunidade passiva nos frangos ocorre por volta de duas a três semanas de vida. Após esse período, os frangos tornam-se suscetíveis ao CAV e, se infectados, desenvolvem apenas a doença subclínica, sem muitas perdas para o plantel^[5,14].

c) Patologia

Macroscopicamente, são observadas lesões hemorrágicas no tecido subcutâneo, nos músculos e no proventrículo, e atrofia do timo em diferentes níveis, podendo este apresentar-se com a coloração marrom-avermelhada. A bolsa de Fabricius também pode estar atrofiada. A medula óssea apresenta-se com coloração róseo-amarelada por causa da deposição de gordura. Em alguns casos podem ocorrer descoloração e inchaço de fígado, rim e baço^[9,11].

Microscopicamente, observa-se atrofia ou hipotrofia dos órgãos linfoides primários e secundários por conta da redução do número de células linfoides. No timo, na região do córtex, ob-

serva-se depleção de linfócitos e hiperplasia das células reticulares, que resultam na perda da arquitetura do timo e depleção dos timócitos. Observa-se atrofia e aplasia da medula óssea, desaparecimento de células hematopoiéticas e presença de células adiposas. No baço observa-se atrofia linfoide com hiperplasia das células reticulares^[2,6,17].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da anemia infecciosa pode ser realizado por isolamento viral, detecção de partículas virais e ensaios moleculares como a PCR ou estudo sorológico do plantel, utilizando testes de soroneutralização (SN), imunofluorescência indireta (IFA) e ELISA. A SN é uma técnica bastante sensível para detectar anticorpos, entretanto é uma técnica cara e os resultados demoram em torno de três semanas para ser obtidos. O isolamento viral apresenta baixa sensibilidade e as diferenças genéticas interferem na replicação do vírus, dificultando o isolamento de algumas cepas. A reação de PCR é uma técnica molecular que permite a detecção do DNA do CAV de forma rápida, segura e econômica, possibilitando a detecção do DNA viral a partir de tecidos e do soro de aves, assim como de cultivos celulares logo após a infecção^[4,16,17].

e) Diagnóstico diferencial

As lesões macroscópicas e microscópicas não são características apenas da anemia infecciosa das galinhas. Agentes imunossupressores podem agir sinergicamente agravando o quadro da anemia infecciosa das galinhas, como no caso das doenças de Marek e de Gumboro, da infecção por reovírus aviário e micotoxicoses. Sendo assim, deve-se realizar o diagnóstico diferencial para as doenças de Marek e de Gumboro, e para infecção por adenovírus e reovírus aviário. Intoxicações por sulfonamidas e micotoxinas, apesar de também causar quadros de anemia e hemorragias, atingem aves de diferentes idades e não apresentam quadros tão agudos como nos casos de anemia infecciosa das aves^[3,13].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para o isolamento viral e PCR, coletar timo, fígado, baço, bolsa de Fabricius, fêmur (medula óssea) e intestino. As amostras podem ser acondicionadas sob refrigeração (2 a 8°C) ou congelados (-20°C). Para exame histopatológico coletar de fêmur (medula óssea), timo, baço, bolsa de Fabricius, fígado e proventrículo, devendo esses órgãos e tecidos ser fixados em solução de formalina a 10% tamponada.

Amostras de sangue/soro de no mínimo 2ml podem ser coletadas para detecção de anticorpos neutralizantes ou mesmo ser utilizadas em ensaios de PCR para a detecção do vírus^[10,15].

Referências bibliográficas

1. ADAIR B.M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. **Develop. Comp. Immunol.** n. 24, p. 247-25, 2000.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. BRENTANO, L.; MORAES, N.; WENTZ, I.; CHANDRATILLEKE, D.; SCHAT, K. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. **Avian Diseases** n. 35, p. 793-800, 1991.
5. BÜLOW, V.V. Avian infectious anemia and related syndrome caused by chicken anaemia virus. **Crit. Rev. Poult. Biol.** v. 3, p. 1-17, 1991.

6. GORYO, M. et al. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). **Avian Pathology**, v. 18, p. 73-89, 1989.
7. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
9. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
10. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
11. McNULTY, M.S. Chicken anemia agent: a review. **Avian Pathology**, v. 20, p. 187-203, 1991.
12. QUIN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, 2002. 512p.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
15. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.
16. SOMMER F.; CARDONA C. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. **Avian Disease**, v. 47, n. 4, p. 1466-1473, 2003.
17. TODD, D., MAWHINNEY, K.A. MCNULTY, M.S. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**, p. 1661-1666, 1992.

1.2.2 Bouba aviária

Conceito

A bouba das aves, também conhecida por epitielioma contagioso, “pipoca”, varíola aviária ou difteria aviária, é uma doença infecciosa, altamente contagiosa, caracterizada pelo aparecimento de erupções na pele e nas mucosas. Amplamente difundida no mundo, acomete galinhas, perus e pássaros de qualquer idade, sendo mais comum e grave nas jovens, apresentando-se sob forma epitieliomatosa cutânea, diftérica ou septicêmica. Atualmente, a bouba encontra-se bem controlada em granjas avícolas comerciais, resultado dos programas de vacinação e de biossegurança. Entretanto, em determinadas regiões, ainda acomete perus, pois estes são mais sensíveis às cepas do vírus^[2,8].

Etiologia e Patogênese

O vírus da bouba aviária é um poxvírus pertencente ao gênero *Avipoxvirus*, da família *Poxviridae*. É um DNA vírus, de fita dupla e está entre os vírus mais estudados e conhecidos. Sorologicamente, o *Avipoxvirus* compreende apenas um sorotipo, entretanto quatro cepas infectam especificamente aves como galinhas, pombos, perus, codornas e canários^[5,6,8]. O vírus da bouba penetra nas células do epitélio no local da infecção, replica-se formando inclusões citoplasmáticas eosinofílicas denominadas corpúsculo de Bollinger. A resposta do hospedeiro caracteriza-se por hiperplasia folicular nas primeiras 72 horas. A síntese da partícula viral com capacidade infecciosa ocorre 72 a 96 horas após a infecção. Em alguns casos o vírus é transportado via corrente sanguínea e dissemina-se para outros órgãos^[1,3,4].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo pode ser realizado considerando os sinais clínicos, as lesões cutâneas e o histórico do lote. A confirmação pode ser realizada pelo isolamento viral em culturas celulares, pela inoculação em ovos embrionados e por exame histopatológico^[1,3].

a) Epidemiologia

O vírus não penetra na pele íntegra; necessita de soluções de continuidade ou lesões na pele para penetrar no organismo. A transmissão ocorre de forma mecânica, pelo contato direto com aves doentes, através de feridas (solução de continuidade), por canibalismo, por vetores mecânicos (picadas de mosquitos, piolhos) e por fômites contaminados. Os mosquitos podem carrear o vírus e permanecer infectados por algumas semanas, sendo estes responsáveis pela grande disseminação da doença nos plantéis^[8].

O *Avipoxvirus* é sensível a radiação UV, clorofórmio, hidróxido de sódio a 1% e calor úmido, resistindo apenas 5 minutos em temperaturas de 120 a 130°C e pH menor que 3. Resiste na cama das aves por cerca de 2 anos em temperatura ambiente (calor seco) e ao fenol a 1%. Normalmente a mortalidade é baixa, mas pode elevar-se quando ocorre a forma diftérica ou quando há complicações por infecções secundárias ou deficiências de manejo^[4,7,12]. Não há tratamento para a buba aviária. A prevenção é a soma de medidas profiláticas e a vacinação.

b) Sinais clínicos

O período de incubação varia entre as diferentes espécies. Em galinhas, perus e pombos é normalmente de 4 a 10 dias. A doença não é vista na primeira semana de vida das aves e raramente na segunda semana, possivelmente devido ao período de incubação e à difusão lenta do vírus. As manifestações clínicas podem ocorrer de duas formas: cutânea, ou forma seca, e diftérica, ou forma úmida. Uma forma septicêmica pode ocorrer em canários e outros pássaros pequenos^[2,3].

A forma cutânea caracteriza-se por lesões nodulares e crostas nas regiões desprovidas de penas, como pernas, patas, bico, barbelas, cristas e ao redor dos olhos. As aves acometidas apresentam redução no ganho de peso e na produção de ovos. Em frangos de corte as lesões em forma de crostas foram observadas nas asas e no dorso. Nas áreas cobertas de penas ela tem sido denominada buba atípica^[8,11]. Nos casos mais graves os animais têm dificuldade de encontrar o alimento e tendem a morrer de inanição.

Na forma diftérica há comprometimento do trato respiratório superior e do trato digestório. Algumas aves podem manifestar dispneia e inapetência. Observam-se placas esbranquiçadas na mucosa da boca, língua, faringe, laringe, e em alguns casos também no esôfago e na traqueia. As lesões nas mucosas espalham-se rapidamente e dificultam a ingestão de alimentos. Quando as lesões se concentram na traqueia pode ocorrer a formação de tampões que dificultam a respiração^[3,7,10].

c) Patologia

A superfície das lesões observadas na forma cutânea, inicialmente, são úmidas tornando-se secas e irregulares no decorrer da infecção com formação de crostas. As lesões podem variar de pequenos nódulos que evoluem para vesículas, pústulas, formando crostas (cor marrom-escura), que podem ser infectadas secundariamente por bactérias e fungos. O aumento no tamanho das lesões é resultado da proliferação viral nas células epiteliais e da infiltração de célula inflamatórias. Na forma diftérica, as placas encontradas nas mucosas aumentam de tamanho, tornam-se amareladas e necróticas formando uma membrana diftérica ou pseudodiftérica. Em geral as lesões se concentram na mucosa da boca, do esôfago e da traqueia^[2,3,7].

Microscopicamente, observa-se hiperplasia do epitélio e presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmático, denominados de corpúsculo de Bollinger, sendo esta considerada lesão patognomônica da buba aviária. Na mucosa da traqueia pode haver hipertrofia inicial, seguida de hiperplasia das células produtoras de muco com posterior alargamento das células epiteliais contendo corpos de inclusão citoplasmática eosinofílicos^[7,10].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo é realizado através do isolamento viral pela inoculação na membrana cório-alantoide (CAM) de embriões com 9 a 12 dias. Os ovos são incubado a 37°C por 5 a 6 dias. Posteriormente, devem ser examinados para verificar a presença de lesões. Culturas celulares também são utilizadas para o isolamento viral, observando-se a formação de corpúsculos de Bollinger. Técnicas moleculares como PCR e RFLP (*restriction fragment length polymerase*) também podem ser utilizadas para detectar o vírus. Testes sorológicos como o teste de ELISA, imunodifusão e neutralização de vírus podem ser utilizados como testes complementares^[2,13].

e) Diagnóstico diferencial

É importante diferenciar a buba aviária da laringotraqueite infecciosa, pois as lesões úmidas ou traqueais são semelhantes. O diagnóstico diferencial pode ser realizado pelo exame histopatológico, no qual é possível detectar corpúsculos de Bollinger. Doenças nutricionais como deficiência de vitamina A e deficiência de biotina ou ácido pantotênico podem ser associadas a quadros de dermatite generalizada, com rachaduras na pele dos pés e formação de crostas nas comissuras do bico e ao redor dos olhos e das narinas^[10,11].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral e PCR, coletar pele lesionada, lesões diftéricas e lesões nodulares. O material deve ser acondicionado sob refrigeração entre 2 e 8°C. Para exame histopatológico deve-se coletar pele lesionada, mucosa e lesões diftéricas, que devem ser fixadas em solução de formalina a 10% tamponada. Para exames sorológicos, coletar amostras de sangue/soro de um número representativo de aves do plantel. As provas sorológicas também podem ser utilizadas para monitoria vacinal^[9,13].

Referências bibliográficas

1. AFONSO, C.L.; TULMAN, E. R.; ZSAK, Z.L.U.L.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. The Genome of Fowl pox Virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 8, p. 3815-3831, 2000.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back. 2002. 246p.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 446p.
5. FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Editora da UFSM, Santa Maria, 2007. 769 p.
6. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
7. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed, London: WB Saunders. 2001.

8. MOÇO, H.F. et al. Bouba Aviária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, jul. 2008.
9. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
10. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
11. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
12. SCHWARTZ, L.D.; DWIGHT, L. **Poultry Health Handbook**. 4. ed., College of Agricultural Sciences, 1994.
13. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.3 Bronquite infecciosa

Conceito

A bronquite infecciosa das aves (BI) é uma doença respiratória viral aguda que ocorre em todos os países com avicultura industrial. É altamente contagiosa, ocasionando perdas econômicas decorrentes da diminuição do desempenho das aves, da piora na conversão alimentar, do aumento na condenação no abate e da diminuição da produção e da qualidade dos ovos^[3,6].

Etiologia e Patogênese

O vírus da bronquite infecciosa (VBI) pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*. Três grupos compõem o gênero *Coronavirus*: dois grupos de vírus de mamíferos e um grupo que acomete aves, no qual está incluso o VBI. O VBI é envelopado, contém um genoma de RNA de fita simples, e é constituído por três proteínas estruturais majoritárias: M (proteína da membrana), S (glicoproteína de superfície) e N (proteína do nucleocapsídeo). A glicoproteína S (*spike protein*) é clivada em duas subunidades, S1 e S2, responsáveis pela união do vírion com a membrana das células do hospedeiro. A subunidade S2 é mais conservada em sua sequência de aminoácidos, e S1 é a principal proteína viral indutora de anticorpos neutralizantes (resposta imune humoral), relacionados à proteção viral. A proteína N forma um nucleocapsídeo longo, flexível e helicoidal que engloba o RNA genômico^[4,5,9,13].

A classificação do VBI em sorotipos é baseada nas características da glicoproteína S. Mutações nessa glicoproteína resultam na evasão aos anticorpos neutralizantes vacinais e no consequente desenvolvimento da doença por sorotipos heterólogos à estirpe vacinal. Vários sorotipos do VBI podem ser definidos pelo teste de neutralização do vírus (VN) e mais recentemente pela técnica RT-PCR^[15].

A prevalência dos diferentes sorotipos varia de acordo com a região. Os sorotipos mais comumente encontrados são Massachusetts, Connecticut, Arkansas 99, Iowa, Georgia, California, Delaware (DE/0172), Holland, T (Australiano), Holt e Gray (Tabela 8)^[3,9]. Algumas amostras de VBI possuem atividade hemaglutinante. A proteção cruzada entre os diferentes sorotipos é variável. A capacidade de mutação e recombinação do VBI, aliada à pressão de seleção pelo uso prolongado de vacinas vivas, contribui para o aparecimento de uma grande variedade de sorotipos e subtipos. As amostras vacinais vivas atenuadas podem recombinar com cepas de campo circulantes e resultar em novos vírus, razão pela qual a introdução de novos sorotipos vacinais deve ser evitada ou ser criteriosamente avaliada^[3,8,10].

Tabela 8. Características dos principais sorotipos virais.

Sorotipo	Sinonímia	Característica
Beaudette 66579	M42ATC VR22ATC	- Causa rápida mortalidade embrionária (< 48 horas) - Apatogênico para aves - Apresenta reação cruzada com o vírus Tipo Massachusetts - Possui patogenicidade reversível
Massachusetts 82828	M-41 IBV-41 VR21ATC	- Altamente patogênico - Possui tropismo pelo sistema respiratório e pelo sistema reprodutor - Raramente causa nefrite
Connecticut A5968	IBV-46 VR817ATC	- Pouco patogênico - Causa poucas lesões nos sistemas respiratório, reprodutor e urinário
Amostras nefrotrópicas	Holland H52 Holte e Gray Amostra T	- Causam lesões no trato respiratório, reprodutor, urinário e bursa de Fabricius; H120 é mais atenuado e não causa lesão no rim Mais patogênica que Holland
Arkansas	A-99	Causa lesões no trato respiratório e reprodutor. Não causa nefrite

Fonte: Adaptado de JORDA et al., 2001^[11]

Inicialmente, após entrar no organismo, o VBI replica-se no trato respiratório superior, causando a perda do revestimento de células protetoras dos sinos nasais e da traqueia. Ocasiona uma breve viremia, podendo ser detectado nos rins, no trato reprodutor e nas tonsilas cecais. Algumas cepas de VBI, conhecidas como nefropatogênicas, causam lesões renais e estão associadas principalmente à doença em frangos de corte^[1,15].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da bronquite infecciosa pode ser realizado com base nos sinais clínicos, nas lesões e no histórico do lote. Entretanto, o diagnóstico definitivo deve ser realizado pelo isolamento e pela identificação do agente.

a) Epidemiologia

A transmissão ocorre por via horizontal. O vírus dissemna-se rapidamente no lote, por contato direto ou indireto. O VBI se propaga principalmente via aerossol (espirros), por materiais orgânicos contaminados, água e equipamentos. Até o momento, a transmissão vertical não se mostrou significativa. Entretanto, a contaminação da superfície dos ovos com o VBI é uma maneira possível pela qual o vírus pode se disseminar em incubadoras e instalações de embalagem de ovos. Em geral, os animais portadores podem transmitir o vírus até 2 meses após a infecção inicial, e as aves recuperadas da infecção permanecem susceptíveis a infecção por outro sorotipo, visto que não há imunidade cruzada entre os sorotipos^[3,5,14].

Algumas cepas do VBI são relativamente termossensíveis, podendo ser inativadas em 15 minutos a 56°C. De modo geral, resistem ao tratamento com pH ácido (2) por 1 hora a 37°C, mas são sensíveis à maioria dos desinfetantes e à radiação UV^[9].

A mortalidade normalmente é baixa. Quando ela aumenta, geralmente está associada a infecções secundárias. As maiores taxas de mortalidade estão associadas à infecção precoce, nos primeiros dias de vida, ou quando estão envolvidas cepas com tropismo pelo tecido renal. Em aves adultas dificilmente ocorre mortalidade, observando-se mais comumente quadros reprodutivos ou respiratórios^[2,7, 13].

b) Sinais clínicos

O período de incubação é relativamente curto, aproximadamente 18 a 36 horas, dependendo da dose e da via de inoculação. Aves de todas as idades são suscetíveis à infecção, apesar de a doença ser mais severa em aves jovens^[11].

Em aves jovens, os principais sinais clínicos são prostração, redução do consumo de alimento, espirros, ronqueira (devida ao acúmulo de muco na traqueia) e coriza. Frangos de corte podem desenvolver aerossaculite em razão de infecções secundárias. Em aves adultas no período de postura o vírus se dissemina no trato reprodutivo levando a uma forte queda na produção de ovos e a uma perda da qualidade externa e interna dos ovos, resultando em ovos deformados ou de casca fina com conteúdo aquoso e presença de pequenos pontos hemorrágicos na clara ou na gema. A taxa de eclosão pode ser gravemente afetada. Em fêmeas jovens, o desenvolvimento do oviduto pode ficar comprometido; nesse caso, na maioria das vezes os ovos são depositados na cavidade abdominal, o que pode desencadear peritonite, ou podem ser reabsorvidos^[3,13,14].

c) Patologia

Nas lesões macroscópicas, visualiza-se exsudato catarral ou mucoso na traqueia e nos brônquios, congestão pulmonar e inflamação catarral ou fibrinosa nos sacos aéreos, que podem estar opacos. Em alguns casos, a coagulação do exsudato produz material purulento nos brônquios, o que leva à morte^[3]. No caso de infecção por cepas com tropismo renal, os animais apresentam perda de coloração dos rins, lóbulos renais e ureteres aumentados com acúmulo de uratos^[11].

Aves adultas apresentam degeneração do ovário, ovidutos inchados e presença de ovo ou óvulos na cavidade abdominal. Normalmente não apresentam lesões macroscópicas na traqueia^[16].

Microscopicamente, pode ser observado na traqueia diminuição dos cílios, descamação do epitélio, infiltrado de heterófilos e linfócitos, e edema na porção da mucosa e submucosa. O lúmen traqueal pode conter exsudato seromucoso, com ou sem a presença de células inflamatórias. A ausência de cílio e a descamação ocorrem nos dois primeiros dias após a infecção, independentemente da idade das aves. Nos sacos aéreos ocorre a presença de edema, escamação de células epiteliais e exsudato fibroso. Em aves adultas, no trato reprodutivo se observa redução localizada ou generalizada de cílios, fibroplasia e edema, com presença de focos de infiltrado celular mononuclear. Nos rins se observa infiltrado de células inflamatórias, necrose do epitélio tubular, acúmulo de uratos e material necrótico do lúmen (nefrite/nefrose)^[11,13].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da BI é classificado em: direto, através de microscopia eletrônica e imuno-fluorescência, que possibilitam a observação da presença do vírus nos tecidos infectados; ou indireto, pelo isolamento viral.

O isolamento viral é feito em ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) com 9 a 10 dias de incubação. A infecção pode ser detectada pela mortalidade embrionária tardia devida ao nanismo e ao enrolamento do embrião, detectados após 18 a 20 dias de incubação. Esses sinais são mais evidentes após a terceira passagem. Culturas de células da traqueia (anéis traqueais) também podem ser usadas para isolamento dos vírus da BI. Nesse caso, a cilioestase e as lesões ao epitélio traqueal são observadas entre 48 e 72 horas após a inoculação^[2,4,16].

Ensaios moleculares também são empregados para diagnóstico e tipificação do VBI por meio de RT-PCR e RFLP. Esses métodos, além de possibilitar a detecção do vírus no tecidos e estabelecimento do genótipo viral, são formas rápidas e altamente sensíveis e específicas^[6,15].

O monitoramento sorológico com intervalos de duas a três semanas fornece subsídios para o diagnóstico, bem como para avaliar os resultados da vacinação. Os testes sorológicos utilizados

são: precipitação em ágar gel (AGP), neutralização do vírus (VN), inibição da hemaglutinação (HI) e teste de ELISA^[14,16].

e) Diagnóstico diferencial

Realizar diagnóstico diferencial de coriza infecciosa, laringotraqueíte, doença de Newcastle, pneumovirose e micoplasmose. Na doença de Newcastle, o quadro clínico é mais severo, com mortalidade elevada e sinais nervosos. Nos casos de coriza infecciosa, observa-se edema facial com descarga nasal serosa, o que dificilmente ocorre na BI. Em aves de postura, quando ocorre queda na produção de ovos e alterações de qualidade de casca, é importante diferenciar da Síndrome da Queda da Postura (EDS), na qual não ocorre alteração da qualidade da albumina e ocorre na BI. Também diferenciar de causas nutricionais, que podem acarretar alteração na produção de ovos^[11,13].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral, coletar traqueia, pulmão, rins, tonsilas cecais, ovário e oviduto e manter em meios específicos com antibiótico, sob refrigeração (2 a 8°C)^[12].

Para os ensaios moleculares, coletar rins, traqueia, pulmões, tonsilas cecais e condicionar sob congelamento a -20°C. Para exame histopatológico, coletar fragmentos de pulmões, traqueia, rins, ovários e ovidutos, devendo esses ser fixados em solução de formalina a 10% tamponada^[15].

Para monitoramento sorológico, coletar soro de uma quantidade representativa do plantel em estudo. Ao encaminhar o material para o laboratório, é essencial que ele seja acompanhado de uma ficha com os dados do histórico de vacinação do lote.

Referências bibliográficas

1. AMBALI, A.G.; JONES, R.C. Early pathogenesis in chicks of infection with eterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, 34, p. 809-819, 1990.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. COOK, J.K.; HUGGINS, M.B. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: the role in disease. **Avian Pathology**, 15, p. 129-138, 1986.
5. D'ARCE, R.C.F. **Desenvolvimento de técnicas moleculares para o diagnóstico diferencial do vírus da bronquite infecciosa e do pneumovírus aviário**. 2004. 79f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas, 2004.
6. DEWIT, J.J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, n. 29, p. 71-93, 2000.
7. DI FABIO, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Diseases**, n. 44, p. 582-589, 2000.
8. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1999, 446p.
9. FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769 p.
10. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
11. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.

12. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p
15. SANTIAGO, S.T.L. **Análise molecular de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em Minas Gerais, Brasil**. 2001. 88 f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária) – Faculdade de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
16. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.4 Doença de Newcastle

Conceito

A doença de Newcastle (DN), também denominada pseudorraiva aviária, é uma enfermidade viral, aguda, altamente contagiosa que acomete aves silvestres e comerciais. A doença causa grande impacto econômico na avicultura mundial, sendo notificada na maioria dos países produtores de aves, incluindo o Brasil. As principais perdas causadas pela doença estão associadas tanto à mortalidade quanto às sansões do mercado de carnes^[1,4].

Etiologia e Patogênese

O vírus da doença de Newcastle (VDN), também denominado *paramixovirus* aviário 1 (APMV-1), pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Rubulavirus*. É um RNA vírus de fita simples, envelopado. Testes sorológicos e propriedades da estrutura viral possibilitaram a classificação do vírus em nove grupos de *paramyxovirus* aviários, descritos como APMV-1 a APMV-9^[2,4].

O APMV-1 caracteriza-se pela capacidade de aglutinar eritrócitos. Essa característica se evidencia pela presença de glicoproteínas, hemaglutininas (H), com atividade hemaglutinante. Vários fatores de patogênese são responsáveis pela virulência do vírus. Entre eles destacam-se a neuramidase (N) e a glicoproteína F (GpF). A neuramidase catalisa a hidrólise dos resíduos terminais de ácido siálico, auxiliando a entrada do vírus na célula e a replicação viral. A GpF é responsável pela adesão do vírus às membranas celulares do hospedeiro, introdução do material genético viral na célula e fusão das células infectadas, resultando no característico efeito citopático e formação de sincícios^[2,10,11].

Convencionalmente, a nomenclatura usada para os diferentes isolados do vírus deve atender os seguintes critérios:

1. sorotipo;
2. espécie ou tipo de ave em que o vírion foi isolado;
3. localização geográfica do isolamento;
4. ano do isolamento.

Exemplo: APMV-3/parakeet/Netherlands/449/75.

Diagnóstico

Não há a presença de sinais clínicos característicos ou lesões patognomônicas na DN. Entretanto, deve-se suspeitar da doença nos casos de alta mortalidade no lote. O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento do vírus com a inoculação em ovos embrionados ou detecção através de ensaios moleculares baseados na PCR^[14].

a) Epidemiologia

A eliminação do vírus pelas aves infectadas vai depender do local de multiplicação do agente. A transmissão do agente ocorre pelo contato direto com aerossóis, muco nasal e fezes contaminadas. Água, equipamentos, trânsito de pessoas e veículos contaminados também podem ser responsáveis pela difusão da doença. Pequenos roedores, insetos e artrópodes também podem estar envolvidos na transmissão mecânica do vírus. Quando ocorre a infecção em aves adultas, em idade reprodutiva, pode ocorrer produção de ovos contaminados. A infecção e morte do embrião ocorrem durante os quatro ou cinco primeiros dias de incubação. Algumas aves, como o pato, podem albergar o vírus sem manifestar a doença, comportando-se como portador assintomático^[1,4].

O vírus da DN é inativado por álcool etílico 70%, fenol 3%, formalina 2%, acetona 50%, soda cáustica 2%. Altas temperaturas e radiação solar facilitam a inativação do vírus pelos agentes químicos. Em contrapartida, temperaturas baixas interrompem sua inativação. O cozimento de produtos cárneos a 80°C destrói o vírus. Na penugem de pintinhos e nas vísceras de aves infectadas o vírus pode permanecer viável por 87 dias e 126 dias respectivamente. O APMV-1 pode suportar pH extremo, entre 2 e 10, por algumas horas. Pode sobreviver em ovos frescos por muitos meses e em carcaças congeladas por alguns anos^[11].

A morbidade da doença é praticamente de 100% e a mortalidade varia de acordo com o patotipo viral envolvido. Alguns autores descrevem índices de mortalidade que podem chegar a 50% ou mais em aves adultas, e até 100% em aves jovens num período de 72 horas após a infecção^[14].

A DN é doença de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial, de controle e vigilância permanente pelo Ministério da Agropecuária e Abastecimento (Mapa), contemplado no Plano Nacional de Sanidade Avícola^[8].

b) Sinais clínicos

O período de incubação pode variar de 2 a 21 dias, mas geralmente é de 2 a 5 dias. A replicação viral ocorre inicialmente no epitélio do trato respiratório e do trato intestinal, seguida pela disseminação hematogena para o baço e a medula óssea. Viremias secundárias resultam na infecção de outros órgãos, inclusive pulmões, intestino e SNC.

A virulência da cepa viral pertencente ao PMVA-1 pode manifestar-se em diferentes graus de severidade que variam desde uma infecção subclínica, na qual os sinais clínicos são inaparentes ou discretos, até uma doença fatal com alta mortalidade. O PMV-1 agrupa cinco patotipos¹, classificados de acordo com o grau de patogenicidade em: entérico; lentogênico ou vacinal; mesogênico e velogênico, que é subdividido em dois tipos, velogênico neurotrópico e velogênico viscerotrópico, conforme descrição abaixo^[2,3,4,9].

I. Velogênico Viscerotrópico, ou “forma de Doyle”: patotipo de alta virulência, que causa doença severa e fatal com elevada mortalidade em galinhas. Os principais sinais clínicos são apatia, diarreia esverdeada, lesões hemorrágicas principalmente nos intestinos, e edema ao redor dos olhos e na cabeça. Neste caso, a mortalidade pode atingir 100%.

II. Velogênico Neurotrópico, ou “forma de Beach”: provoca problemas respiratórios severos, como espirros e corrimento nasal com ruído pulmonar. As aves podem apresentar inchaço na cabeça e face, letargia, sintomas nervosos como torcicolo, paralisia das pernas, tremores musculares e, finalmente, morte, que pode chegar a 100% das aves. Em aves de postura a produção de ovos reduz drasticamente.

¹ Nota do revisor: Neologismo que significa ‘grupos de cepas com atributos de virulência semelhantes e envolvidos em doenças correlatas’.

III. Mesogênico, ou “forma de Beaudette”: patotipo menos patogênico, que pode causar apenas leves sinais respiratórios, queda de postura em poedeiras e, eventualmente, sinais nervosos. A mortalidade é normalmente baixa e mais importante em aves jovens.

IV. Lentogênico, ou “forma de Hittchner”: comumente usado como cepa vacinal, pode causar sinais respiratórios brandos em aves jovens.

V. Entérico assintomático, não é patogênico, não causa sinais clínicos nem lesões nas aves e também tem sido utilizado como cepa vacinal. Portanto, nem todas as cepas do vírus de Newcastle causam a doença propriamente dita.

c) Patologia

Não existem lesões patognomônicas na doença de Newcastle. As lesões variam de acordo com o patotipo envolvido, a idade (jovens são sensíveis) e os manejos deficientes, que induzem a excesso de umidade e amônia ou imunossupressão^[16]. Os patotipos mais virulentos causam predominantemente lesões hemorrágicas no trato gastrointestinal, principalmente no proventrículo e no intestino delgado. As lesões variam desde inflamações difteroides até a presença de necroses e úlceras. As hemorragias podem estar presentes em outros locais, como tecido subcutâneo, músculos, laringe, membranas serosas, traqueia, pulmões, sacos aéreos, coração e ovários. No tecido linfoide intestinal também podem ser observadas áreas de hemorragia e edema, principalmente nas tonsilas cecais. Aves de postura podem apresentar ovo-peritonite e o ovário com folículos degenerados ou hemorrágicos^[13,14,15].

Patotipos mesogênicos podem causar hemorragias no proventrículo, acúmulo de fluidos nos seios nasais, nas narinas e na traqueia. Amostras lentogênicas podem induzir à traqueíte discreta, observada no início da infecção, exacerbada quando ocorre infecção secundária^[9].

As alterações microscópicas são mais severas nas infecções por patotipos com alta virulência, podendo ser observada encefalomielite não purulenta com degeneração de neurônios e infiltração linfocitária perivasicular. Nos demais órgãos, as alterações variam desde hiperemia e necrose até denso infiltrado celular, hipotrofia do tecido linfoide, necrose no baço, degeneração medular na bursa de Fabricius. Entretanto, essas lesões não têm relevância para o diagnóstico^[5,10].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo pode ser realizado pelo isolamento do vírus com inoculação em ovos embrionados ou ensaios moleculares como RT-PCR. No caso do isolamento, a confirmação é realizada por testes de inibição da hemaglutinação (HI), que também permite o diagnóstico diferencial dos vírus da influenza aviária. Amostras de DN isoladas em ovos em surtos da doença devem ser testadas *in vivo* em pintinhos ou por sequenciamento de RNA para determinação da patogenicidade e classificação do isolado quanto ao patotipo^[12,18]. Somente laboratórios oficiais e credenciados pelo Mapa podem realizar o diagnóstico de DN no Brasil.

Testes sorológicos para detecção de anticorpos para DN, como teste de ELISA, HI, neutralização de vírus e AGP, podem ser utilizados para monitorar a circulação do agente nos plantéis^[16].

Atualmente a DN vem sendo controlada em plantéis comerciais por meio de programas de vacinação. Em alguns Estados são vacinadas apenas as matrizes para transferência de imunidade materna à progénie. A diminuição da imunidade passiva nos pintinhos é gradativa conforme vai aumentando a idade, chegando a níveis muito baixos no momento do abate de frangos de corte, por volta dos 42 dias de idade. Por isso, deve-se ter muita prudência na interpretação de resultados sorológicos de pintinhos filhos de matrizes vacinadas nas primeiras semanas de vida devido aos altos níveis de anticorpos decorrentes da imunidade passiva. A monitoria das aves vacinadas normalmente é realizada pelos testes de HI e ELISA^[18].

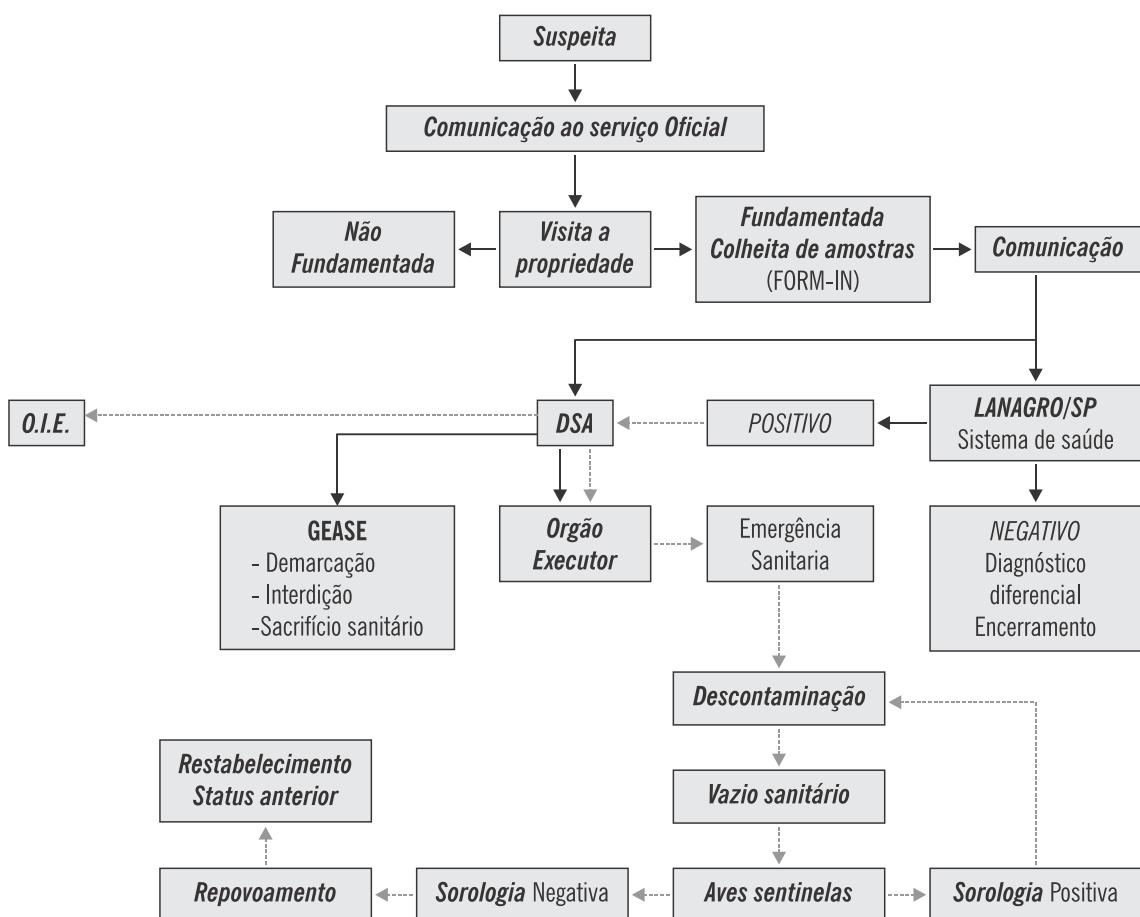
e) Diagnóstico diferencial

Realizar o diagnóstico diferencial principalmente de influenza aviária, bronquite infecciosa, encefalomalacia, encefalomielite aviária e doença de Marek no caso de lesões no SNC^[17].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

O Serviço Oficial de Defesa Sanitária deve ser notificado na suspeita clínica de DN. Nesse caso, o material deve ser coletado por um médico-veterinário oficial e encaminhado a laboratório credenciado pelo Mapa para realizar diagnóstico de DN. Sempre que suspeitar de DN é necessário fazer o diferencial de influenza aviária. Essa diferenciação é realizada somente por testes laboratoriais. Em campo, quando a suspeita clínica for de DN, o Serviço Oficial de Defesa Sanitária deve ser imediatamente informado para que ele possa realizar a colheita de material, conforme orientações contidas no Plano Nacional de Contingência de Influenza Aviária e Newcastle e no Ofício Circular nº 157, de 2007/DAS^[6,7,8].

Para mais informações acerca dos procedimentos de coleta de material para diagnóstico de DN ver o item *Influenza aviária*, neste capítulo.



Referências bibliográficas

1. ALEXANDER, D.J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *Journal Comp. Path.*, v. 122, p. 105-106, 1995.

2. ALEXANDER, D.J.; ALLAN, W.H. Newcastle disease virus pathotypes. **Avian Pathology**, n. 3, p. 269-278, 1974.
3. AWAN, M.A. et al. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 23, p. 405-423, 1994.
4. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
5. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 17, DE 07 DE ABRIL DE 2006. **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 6, 10 abr. 2006.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular nº 157, de 2007/DAS. Brasília, 30 de outubro de 2007.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Coordenação de Sanidade Avícola. Abril de 2006.
9. BROWN C., KING D.J., SEAL B.S. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. **Vet Pathol**, 36, p. 125-132, 1999.
10. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110 p.
11. FLORES, L.M.; SEGABINAZF, S.D.; SANTOS, H.F.; BASSAN, J.D.L. Epidemiologia da Doença de Newcastle - revisão bibliográfica. **A hora veterinária**, n. 153, p. 57-61, set./out. 2006.
12. GOHM D.S., THUR B., HOFMANN M.A. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathol**, 29, p. 143-152, 2000.
13. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
14. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
15. KOUVENHOVEN B.: Newcastle disease. In: Virus Infection of Birds, **Elsevier Science Publishers**, p. 341-361, 1993.
16. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
17. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
18. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.5 Influenza aviária

Conceito

A Influenza Aviária (IA) é uma doença de extrema importância para a avicultura mundial. Nos últimos anos a IA tornou-se foco da atenção mundial por sua alta patogenicidade em aves, difusão em vários países e potencial zoonótico. Desde o século XIX a doença é conhecida, e formas menos severas de IA foram identificadas desde o ano de 1950^[1,2].

As perdas associadas à IA variam de acordo com a cepa do vírus, a espécie de ave infectada, o número de estabelecimentos atingidos, os métodos de controle utilizados e, principalmente, a velocidade da implantação de ações de controle e erradicação. As principais perdas econômicas relacionadas com a notificação de IA são: o sacrifício e a destruição das aves, os custos com ações de quarentena e vigilância e, principalmente, sanções e perda de mercados compradores. Além disso, para o meio rural as perdas são maiores ainda, refletindo-se em um problema social grave, principalmente para as regiões com avicultura industrial desenvolvida^[8,11].

A IA é uma doença de notificação obrigatória, constante na lista da OIE e considerada exótica no Brasil, onde o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) mantém monitoramento

das principais espécies domésticas. O PNSA estabelece normas específicas para o controle e a erradicação da IA e da doença de Newcastle^[4,6,8].

Etiologia e Patogênese

O vírus da influenza aviária (AIV) é RNA vírus de fita simples, envelopado, pertencente à família *Orthomyxoviridae*. Atualmente existem quatro gêneros, chamados *influenzavirus A*, *influenzavirus B*, *influenzavirus C* e o *Thogotovirus*. Os tipos B e C são encontrados somente em humanos^[12,13].

O vírus da influenza é um RNA vírus, envelopado, esférico, medindo aproximadamente 200nm de diâmetro. O envelope contém projeções rígidas (*spikes*) de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). As características antigênicas dessas duas glicoproteínas de superfície possibilitam a divisão do vírus em vários subtipos. A hemaglutinina pode ser classificada em 16 tipos, e a neuraminidase em nove tipos. Todos os vírus têm um antígeno HA e um antígeno NA, aparentemente em qualquer combinação. As hemaglutininas são responsáveis pela ligação do vírion na célula receptora e pela atividade hemaglutinante do AIV, sendo sintetizadas como um polipeptídio e depois clivadas em HA1 e HA2 por enzimas da célula alvo do hospedeiro. A clivagem da HA é essencial para a infectividade do vírus porque esse evento medeia a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal^[1,17].

As neuraminidases são responsáveis pela liberação de novos vírus na célula do hospedeiro. Os subtipos H5 e H7 estão relacionados com a influenza aviária altamente patogênica^[13].

A replicação viral ocorre inicialmente no trato respiratório e no trato digestório. O vírus se liga a receptores siálicos (sialoglicoproteínas) da superfície das células passando a ser englobado pela célula pela endocitose. Nesse evento, o antígeno HA é o mais importante, pois é responsável pela atividade hemaglutinante do vírus e pela ligação aos receptores das células alvo. As características antigênicas da HA e da NA sofrem constantes mutações dificultando o controle da doença pelo sistema imunológico^[1,3,17].

O alto nível de recombinação genética, especialmente entre integrantes dos AIV do tipo A, é consequência do genoma segmentado, que permite permutações de genes. Cada vez que há recombinação de seu genoma, entre si ou com vírus de outra espécie animal, ou mesmo quando sofre mutações pontuais, surge uma nova variante do vírus cujo efeito na população é desconhecido. A adaptação ao novo hospedeiro significa principalmente alteração rápida das glicoproteínas da superfície, especialmente da HA e, por consequência, expressão de um novo perfil antigênico, sem imunidade para ele nas diferentes espécies animais, inclusive no homem^[12,14,18].

Inúmeros isolados do AIV circulam entre diversas espécies animais ao redor do mundo. Embora o AIV possa infectar uma diversidade grande de espécies de aves e mamíferos, os reservatórios naturais são as aves aquáticas, marítimas e silvestres, sendo consideradas atípicas as infecções em galinhas, perus e suínos. Surtos de IA em galinhas e perus têm sido frequentemente registrados em países da Ásia^[13].

Diagnóstico

Os sinais clínicos, como alta mortalidade em pouco tempo, são sugestivos de influenza aviária e devem ser considerados um alerta para a tomada imediata de medidas seguras para o diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial para IA somente pode ser realizado em laboratórios oficiais do Mapa. Atualmente todas as amostras clínicas de animais com suspeita de IA são encaminhadas ao Lanagro (Laboratório Nacional Agropecuário), com sede no município de Campinas, SP. Os procedimentos para coleta e transporte de material para diagnóstico de AI devem

obedecer ao Plano Nacional e Contingência de Influenza Aviária e Newcastle e ao Ofício Circular nº 15, de 2007/DAS^[5,6,13].

a) Epidemiologia

As fontes de transmissão para as criações de aves industriais podem ser espécies de aves domésticas “de fundo de quintal”, como patos e perus, aves de vida livre, aves exóticas de companhia e outras espécies de animais, como suínos^[2].

A transmissão do vírus pode ocorrer de forma direta ou indireta pelo contato com material contaminado com secreções dos sistemas respiratório e digestório de aves infectadas. Cama, insetos, equipamentos, veículos de transporte, bebedouros, comedouros, alimentos, gaiolas, pessoas e fômites contaminados com o vírus podem tornar-se agentes potenciais de disseminação da doença. As aves de vida livre podem transmitir diretamente a infecção ao compartilharem o ambiente de criação^[3,18].

A capacidade de disseminação da IA está relacionada com a quantidade de vírus eliminados pelas secreções. Existem poucas evidências da transmissão vertical, porém já foi demonstrado que o vírus pode ser encontrado dentro ou na superfície dos ovos quando a fêmea está infectada. No caso de infecção experimental de galinhas com o vírus H5N2, quase todos os ovos produzidos no terceiro e no quarto dia após a infecção estavam infectados pelo AIV^[7,9,14].

O vírus é sensível ao calor, 56°C por 3 horas ou 60°C por 30 minutos, luz UV e pH ácido. Produtos químicos como os agentes oxidantes, dodecil sulfato de sódio, detergentes, β-propiolactona e desinfetantes comuns, como formalina e compostos iodados, inativam o vírus. O esterco contaminado representa um grande problema no controle da doença, pois o vírus da IA pode permanecer viável por mais de 100 dias em galpões contaminados, principalmente nos meses frios. Para as formas altamente patogênicas, como H5 e H7, estudos demonstraram que um único grama de esterco contaminado pode conter vírus suficientes para infectar milhões de aves. Na água, o vírus pode sobreviver por até 4 dias à temperatura de 22°C e mais de 30 dias a 0°C^[9,15]. A morbidez e a mortalidade são muito variáveis, dependendo da patogenicidade da cepa envolvida, podendo variar de 0% a 100%.

A IA é considerada uma zoonose, o que representa preocupação para a saúde pública, uma vez que alguns subtipos, tais como H5N1, H9N2, H7N7 e H7N2, que já foram diagnosticados em humanos. O subtipo H5N1, por exemplo, é considerado altamente patogênico aos seres humanos, ocasionando doença respiratória severa com alta mortalidade^[10].

b) Sinais clínicos

O período de incubação é variável, dependendo da dose infectante, da via de infecção e da espécie afetada, podendo variar de poucas horas a 3 dias^[13].

Os sinais clínicos da IA em aves são extremamente variáveis e dependentes de fatores como espécie infectada, idade, infecções concomitantes, fatores imunossupressores, níveis de imunidade adquirida e fatores ambientais. Em aves domésticas os sinais clínicos podem estar associados a alterações nos tratos respiratório, digestivo, urinário e reprodutor^[1,12].

De modo geral, as aves infectadas com cepas de baixa patogenicidade podem manter-se assintomáticas ou apresentar espirros, tosse, inflamação dos seios nasais, depressão e diarreia. Nesse caso, normalmente não ocorre mortalidade, exceto quando ocorrem infecções secundárias. Matriizes reprodutoras podem apresentar alterações na postura, como diminuição da produção e ovos deformados ou com casca fina e sem pigmentação. Quando a infecção envolve cepas altamente patogênicas, pode ocorrer mortalidade súbita ou grave depressão, redução de apetite, barbelas e cristas cianóticas, hemorragias subcutâneas nas patas, diarreia, edema da face e alterações nervosas^[7,13].

c) Patologia

As lesões decorrentes da infecção da IA são variáveis, dependendo da virulência, da espécie e da idade dos animais acometidos. Em alguns casos a morte pode ocorrer antes que as lesões sejam observadas^[13].

Nos casos mais graves, na necropsia é possível observar congestão da musculatura, edema subcutâneo de cabeça e pescoço, cianose de cristas e barbelas, edema nas patas, congestão das conjuntivas, exsudato mucoso na traqueia ou traqueíte hemorrágica, petéquias nos músculos do peito, serosa dos órgãos e gordura abdominal. Lesões como congestão renal com depósito de uratos, hemorragia nas mucosas da moela e do proventrículo, hemorragia, degeneração ovariana, peritonite por causa de ovo ectópico e salpingite com acúmulo de exsudato no oviduto também podem estar presentes^[8,10,18].

As lesões histopatológicas não são patognomônicas. Pode-se observar necrose linfoide multifocal, necrose pancreática e miocardite. Pode ser observado infiltrado linfoide no baço, no miocardio, no globo ocular, nas cristas, nos músculos esqueléticos e no cérebro, no qual também pode ocorrer a formação de manguitos perivasculares, necrose de células neuronais, edema e hemorragia. Necrose e hemorragias na mucosa da moela e proventrículo são um achado frequente^[13,14].

d) Diagnóstico laboratorial

Para a confirmação do diagnóstico de IA é necessário isolamento, identificação, caracterização do subtipo e determinação da patogenicidade do isolado viral. Todos os procedimentos de isolamento e identificação viral devem seguir as normas internacionais previstas pela OIE^[19] (Figura 2). O isolamento deve ser realizado pela inoculação em ovos embrionados SPF de 9 a 11 dias de idade, via cavidade alantoide com macerado de tecidos ou excreções tratados com antibióticos. O procedimento para o diagnóstico definitivo leva pelo menos duas a três semanas, pois são necessárias no mínimo três passagens em ovos. Sete dias após a inoculação os ovos devem ser avaliados quanto ao desenvolvimento e à viabilidade do embrião, e o líquido alantoide deve ser submetido aos ensaios de imunodifusão em ágar ou AGP para verificar atividade hemaglutinante do vírus^[13,16,18].

Técnicas moleculares baseadas na PCR também possibilitam a detecção e caracterização rápida do AIV. A contaminação dos órgãos e suaves por bactérias e a má refrigeração do material coletado afetam diretamente os resultados obtidos nos ensaios de isolamento e detecção viral através de ensaios moleculares^[19]. Ensaios sorológicos, como inibição da hemaglutinação (HI) e imunodifusão em ágar gel para detecção de anticorpos de nucleoproteínas (NP), podem ser usados para a detecção de anticorpos circulantes para AIV^[10].

O PNSA no Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle prevê, para a certificação do *status* de país livre, amostragem na linha de abate de frango de corte de 24 aves por lote para a sorologia^[7].

e) Diagnóstico diferencial

Como não há sinais clínicos e lesões específicas, no caso de suspeita de IA deve-se realizar diagnóstico diferencial de doença de Newcastle e outras enfermidades, como cólera aviária, laringotraqueíte infecciosa, bronquite infecciosa, varíola aviária (pox - forma diftérica), psitacose (clamidiose em pássaros psitacídeos) e micoplasmosse^[14].

Medidas sanitárias ante focos de IA e NC

A partir da confirmação do diagnóstico de IA, o Serviço Oficial de Defesa Sanitária – Grupo Especial de Atendimento Sanitário Emergencial deverá implementar ações de emergência sa-

nitária (Figura 1) nas zonas de proteção e de vigilância ao redor da propriedade de ocorrência do foco de IA. Inicialmente as unidades de produção com diagnóstico positivo para AI são interditadas e é estabelecida a área de vigilância. A zona de proteção deve possuir um raio de 3km do foco, e a zona de vigilância um total de 10km, podendo esta ser ampliada ou reduzida conforme determine o estudo epidemiológico da região. Posteriormente, é realizado o sacrifício imediato (eutanasia) de todas as aves e todos os suínos no local do foco. Além disso, são proibidos o egresso e o ingresso de qualquer tipo de animal na propriedade, inclusive cães, gatos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos e suínos. As medidas são complementadas pela despopulação, desinfecção do local do foco e repovoação com aves sentinelas^[6].



Figura 1. Divisão da área afetada em zonas de proteção e vigilância a partir do foco.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais na suspeita de DN e IA

Os procedimentos descritos para coleta de material obedecem à recomendação do Plano Nacional e Contingência de Influenza Aviária e doença de Newcastle, Ofício Circular nº 15, de 2007/DAS e Nota Técnica nº 16/2006^[5,6].

A amostragem para coleta de material deve incluir aves com início de quadro sintomático, aves saudáveis e aves moribundas^[11]. A integridade e qualidade da amostra colhida são de competência do Serviço Oficial, assim como a adoção das providências para a remessa das amostras ao laboratório oficial^[6]. No caso de aves vivas, deverão ser colhidos: sangue, para obtenção de soro, e suabes de traqueia e de cloaca. O material para sorologia (soro) deverá ser congelado para o envio ao laboratório, ao passo que o material destinado ao isolamento viral ou PCR (suabes) deverá ser transportado sob refrigeração (2 a 8°C) ou congelado em nitrogênio líquido ou gelo seco.

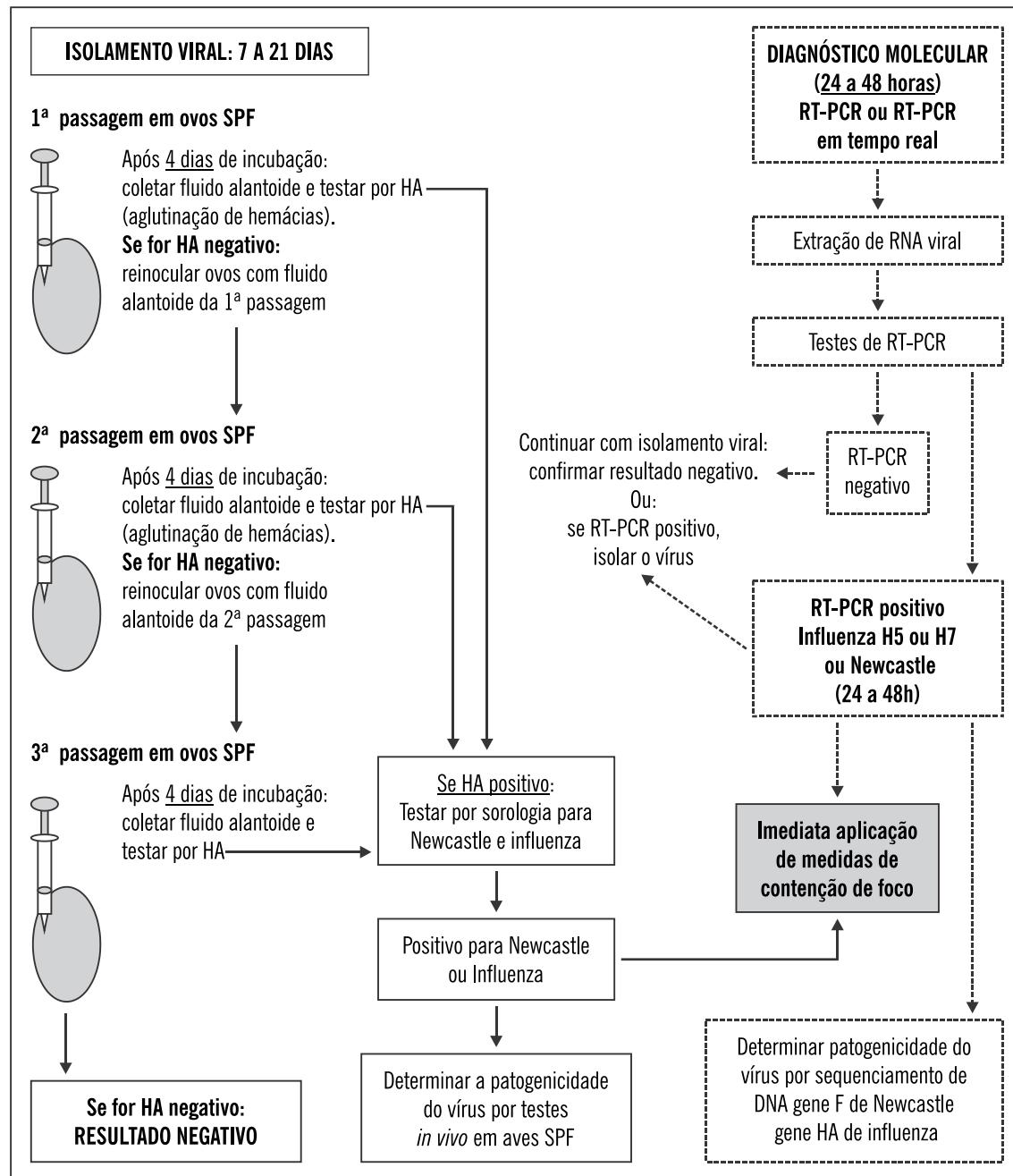
De acordo com o Ofício Circular nº 15, de 2007/DAS, devem ser coletados 3 *pools* de 10 suabes cloacais e 3 *pools* de 10 suabes traqueais por galpão, devendo estes ser mantidos em meio de transporte específico^[5]. Os suabes de traqueia e de cloaca devem ser acondicionados em recipientes separados.

No caso de necropsia, colher separadamente órgãos e tecidos dos tratos respiratório e digestivo e do sistema nervoso, mantendo-os em frascos estéreis com meio de transporte específico^[5]. As amostras devem ser lacradas, identificadas e transportadas sob refrigeração, em caixas isotérmicas com gelo reciclável, ou congeladas em nitrogênio líquido ou gelo seco^[6].

É imprescindível enviar ao laboratório o histórico de vacinação do lote, principalmente caso tenha sido realizada a vacinação contra a doença de Newcastle. No caso de pintinhos oriundos

de matrizes vacinadas contra DN, eles vão apresentar imunidade passiva. Nesse caso, deve-se enviar ao laboratório o histórico de vacinação do lote de matrizes. O título vacinal transmitido à progênie tende a diminuir gradativamente com o aumento da idade dos pintinhos. No caso de aves de descarte de postura comercial ou descarte de matrizes, por apresentarem altos títulos vacinais, o exame sorológico não é representativo, devendo-se preconizar somente a coleta de suabes traqueais e de cloaca e coleta de órgãos^[5,6].

Figura 2. Diagnóstico da doença de Newcastle e da influenza aviária.



Fonte: Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle⁶.

Referências bibliográficas

1. ALEXANDER, D.J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 3-13, 2000.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 17, DE 7 DE ABRIL DE 2006. **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 6, 10 abr. 2006.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular nº 15, de 2007/DAS. Brasília, 30 de outubro de 2007.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Coordenação de Sanidade Avícola. Abril de 2006.
7. ELBERS, A.R.W.; KOCH, G.; BOUMA. A. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. **Avian Pathology**, n. 34, p. 181-187, 2005.
8. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
9. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
10. LNDT, B. Z.; BANKS, J.; ALEXANDER, D.J. Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in *in vivo* tests. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 347-350, 2007.
11. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
12. TUMPEY, T.M.; SUAREZ, D.L.; PERKINS, L.E.; SENNE, D.A.; LEE, J.; LEE, Y.J.; MO, I.P.; SUNG, H.W.; SWAYNE, D.E. Evaluation of a high-pathogenicity H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. **Avian Diseases**, 47, p. 951-955, 2003.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
15. SILVA, L. J. Influenza Aviária: perigo real ou imaginário?. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 2, 2006.
16. STARICK, E.; WERNER, O. Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens. **Avian Diseases**, 47, p. 1187-1189, 2003.
17. SUAREZ, D.L. Evolution of avian influenza viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 15-27, 2000.
18. SWAYNE, D.E.; SUAREZ, D.L. Highly pathogenic avian influenza. **Reviews in Science and Technology**, v. 19, p. 463-482, 2000.
19. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.6 Doença de Marek

Conceito

A doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa contagiosa de grande importância para a avicultura mundial causada por um herpesvírus. As principais perdas associadas à doença são o aumento de mortalidade, a imunossupressão e as condenações no abate^[2].

Etiologia e Patogênese

A doença de Marek (DM) é causada por um vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Herpesvirus* denominado Vírus da Doença de Marek (DMV). O DMV apresenta características tanto de *Alfaherpesvirus*, como de *Gamaherpesvirus*^[8]. É um DNA vírus de fita dupla linear, com tamanho de 160 a 180pb, que pode ser dividido em três sorotipos: 1, 2 e 3. O sorotipo 1 (*Gallid herpesvirus 2- MDV*) é oncogênico e virulento, capaz de induzir à formação de tumores. Pode ser classificado em 4 patotipos de acordo com a sua patogenicidade: moderadamente virulento (mMDV), virulento (vMDV), muito virulento (vvMDV) e muito mais virulento (VV + MDV). O sorotipo 2 (*Gallid herpesvirus 3*) é apatogênico e não oncogênico. O sorotipo 3 é avirulento, não oncogênico, encontrado naturalmente em perus, denominado “*herpes-virus of Turkeys*” (HVY). Os sorotipos 2 e 3 são utilizados nas vacinações, pois existe reação antígênica cruzada entre os três sorotipos capaz de conduzir imunidade protetora. O vírus da doença de Marek patogênico possui tropismo linfoide, e somente o sorotipo 1 é oncogênico e induz a neoplasias linfoides^[1,5,15].

Após a infecção, o MDV pode estabelecer três formas de patogênese: forma produtiva, forma latente e transformação tumoral. Na forma produtiva, ocorre a replicação do DNA viral, síntese de抗ígenos e, em alguns casos, produção de partículas virais. A forma latente ocorre nos linfócitos T ativados; nesse caso, a infecção não é produtiva e o genoma viral sofre replicação muito limitada. A transformação tumoral ocorre somente nos casos de infecção pelo sorotipo 1, que induz a transformações tumorais nas células infectadas^[2,6,16]. O MDV é transportado pelos macrófagos pulmonares para os órgãos linfoides, onde causa primariamente infecção dos linfócitos B e citólise. O pico da infecção citolítica ocorre 3 a 6 dias após a infecção com intensa destruição celular, lesões necróticas, presença de infiltrado fagocítico com presença de granulócitos, bem como hiperplasia das células reticulares. Ocorre grave atrofia tímica e da bolsa de Fabricius e um quadro de imunossupressão severa^[4,9].

O vírus da DM associa-se às células e migra em um período de duas semanas para o folículo da pena, onde ocorre infecção produtiva eliminando vírus completos e infectantes. Nos plexos nervosos periféricos é possível observar a presença de intenso infiltrado inflamatório lipo-histiocitário com predominância de macrófagos^[2,12].

Diagnóstico

A suspeita de DM pode ser levantada com base nos sinais clínicos, nas lesões encontradas na necropsia e no histórico do lote. O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento viral em cultivos celulares ou em ovos embrionados. Devido ao fato de o DMV estar presente em todos os tipos de criação de galinhas e a vacinação ser largamente empregada, sua detecção por si só não tem valor prático; sua presença deve estar associada às lesões. O exame histopatológico aliado aos sinais clínicos e ao histórico auxiliam na diferenciação das lesões tumorais causadas pela DM das causadas pelo vírus da leucose aviária e da reticuloendoteliose^[1,11].

a) Epidemiologia

A DM acomete diferentes espécies de aves, como perus, codornas e, principalmente, galinhas, ocasionando surtos a partir da terceira ou quarta semana de idade. A transmissão pode ocorrer pela via horizontal, através de aerossóis e poeira. Entretanto, a presença do vírus nos folículos das penas é a principal fonte de contaminação do ambiente e de outras aves devido à descamação das células queratinizadas. Algumas aves podem tornar-se portadoras sem desenvolver a doença, sendo responsáveis pela manutenção e disseminação do DMV. Não há evidências de transmissão vertical^[12,13].

O vírus sobrevive por mais tempo em ambiente frio, aumentando sua viabilidade nos meses de inverno. Quando associado às penas ou ao pó, pode permanecer viável durante meses à temperatura de 20°C e durante anos a 4°C^[2,6].

De modo geral, a mortalidade e a morbidade são baixas principalmente devido aos programas de vacinação, tanto para frangos de corte quanto para matrizes e galinhas de postura. A vacinação de pintinhos de um dia leva a reduções significativas nas condenações de carcaças no abatedouro por lesões tumorais cutâneas, principalmente em frangos de corte^[1,12].

b) Sinais clínicos

Em campo, o período de incubação é muito variável e difícil de precisar em razão da evolução crônica da doença. Experimentalmente, os sinais clínicos iniciam em até duas semanas após a infecção. São descritos casos em aves de três a 60 semanas de idade. De modo geral, três a quatro semanas após a infecção pode ser observada linfomatose ou linfoma nas vísceras e músculos, decorrente da transformação neoplásica dos linfócitos após a infecção pelo DMV, dando origem aos tumores^[14]. As manifestações clínicas podem ser agrupadas em: forma nervosa, cutânea, viscerai, e associadas.

A forma nervosa ocorre quando um ou mais nervos periféricos são afetados. Há replicação do vírus nas fibras nervosas, desmielinização e afluxo de células mononucleares ou linfoides causando, inicialmente, inflamação e proliferação anormal de células linfoides. Ocorre a paresia assimétrica progressiva e, mais tarde, a paralisia completa de uma ou mais extremidades. Quando o plexo braquial ou o nervo vago são comprometidos, as aves apresentam asas caídas e papo “penduloso”. Lesões nos nervos cervicais levam a sinais de torcicolo, e nos nervos ciáticos levam à perda dos movimentos das pernas. A mortalidade está associada à dificuldade das aves em se locomover e acessar os comedouros e bebedouros^[2,13].

A forma cutânea normalmente só é observada no frigorífico por ocasião do abate, visto que não há um quadro definido e lesões se resumem a nódulos nos folículos das penas. Na forma ocular, a ave apresenta intenso infiltrado linfocitário em um olho ou em ambos, que se traduz clinicamente por dificuldade de adaptação à luz, pupila puntiforme e cegueira parcial ou total. Na forma viscerai, pode ocorrer depressão, caquexia, diarreia esverdeada e tumores em órgãos como coração, fígado e pâncreas^[5,9].

c) Patologia

A gravidade das lesões tumorais depende da virulência, do desafio de campo, da idade e da genética das aves. Aves desafiadas após cinco dias de vida são menos suscetíveis à formação de tumores uma vez que seu sistema imunológico é imunocompetente para controlar a divisão das células tumorais^[3].

Na necropsia é possível evidenciar lesões nos nervos periféricos como hipertrofia, perda das estriações e coloração acinzentada ou amarelada. Tumores linfoides podem ser encontrados em qualquer órgão, principalmente fígado, rins, baço, coração, gônadas e bolsa de Frabrius. Na íris se observa despigmentação e irregularidade na pupila. Algumas aves também podem apresentar lesões não neoplásicas, como atrofia da bolsa e do timo^[4,2,11]. No exame histopatológico é possível observar a presença de infiltrado inflamatório linfocítico, desmielinização nos nervos periféricos e proliferação das células Schwann^[12].

As aves que apresentam tumores viscerais tendem a apresentar também processos neoplásicos na pele ou anexos cutâneos, mais comumente no pescoço, nas coxas e na região ventral. As lesões na bolsa de Fabricius caracterizam-se por atrofia das camadas cortical e medular dos folículos linfáticos^[1,9].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado pelo isolamento viral em cultivos celulares ou em ovos embrionados. O vírus replica-se em fibroblasto de galinha (CEF) e de pato (DEF), ou em células de rim de galinha (CKC)^[14].

Ensaios destinados à detecção de sequências genômicas virais baseados na PCR, além de permitir o diagnóstico da infecção, possibilitam diferenciar cepas não oncogênicas das oncogênicas^[7].

Provas sorológicas têm sua aplicabilidade limitada, pois não definem o patotipo viral. Para triagem de plantéis pode-se utilizar a imunodifusão em ágar gel, a imunofluorescência e o teste de ELISA. A presença de anticorpos para DMV em galinhas não vacinadas após quatro semanas de idade é um indicativo de infecção. Antes dessa idade, a presença de anticorpos está associada à imunidade passiva^[3,17].

e) Diagnóstico diferencial

Em caso de suspeita de DM, nas formas cutânea e visceral, ou associadas, é importante fazer diagnóstico diferencial de leucose linfoide (Tabela 9) e reticuloendoteliose. Nos quadros que cursam com manifestações nervosas, deve-se incluir no diagnóstico diferencial a doença de Newcastle e encefalomielite aviária, nas quais os sinais neurológicos ocorrem em aves mais jovens e não há presença de tumores. O botulismo também deve ser incluído no diagnóstico diferencial da forma nervosa, entretanto deve-se determinar a ocorrência de um quadro de paralisia flácida e não há presença de tumores^[1].

Tabela 9. Diagnóstico diferencial entre doença de Marek e leucose linfóide.

Característica	Marek	Leucose linfoide
Idade apresentada	Jovens	Adultos
Paralisias	Geralmente presente	Ausente
Comprometimento dos nervos periféricos	Geralmente presente	Ausente
Bursa de Fabricius	Aumento difuso/atrofia	Tumor nodular
Tumores de pele/músculo	Podem estar presentes	Ausente
Infiltrado nervo periférico	Geralmente presente	Ausente
Infiltrado celular linfocitário na pele	Geralmente presente	Ausente
Proliferação celular na bursa	Interfolicular	Intrafolicular

Fonte: Adaptado de Back, A. (2002)^[1].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral e PCR, colher células da pele por raspado, e folículos das penas ou fezes. O material deve ser conservado sob refrigeração entre 2 a 8°C até o processamento laboratorial. Para PCR também se pode colher sangue e fragmentos de órgãos e tecidos com lesões tumorais, podendo o material ser acondicionado sob refrigeração ou congelação^[7].

Para exame histopatológico, colher fragmentos de fígado, baço, pâncreas, proventrículo, gônadas, nervos periféricos, bursa, timo, olhos ou qualquer órgão com lesões tumorais. As amostras de tecido devem ser conservadas em solução de formalina a 10% tamponada, mantendo a proporção de uma parte de tecido para 10 de solução de formalina^[10,17].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERICHEI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. BUMSTEAD, N.; SILLIBOURNE, J.; RENNIE, M.; ROSS, N.; DAVISON, F. Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. **J Virol. Methods**, n. 65, p. 75-81, 1997.
4. CALNEK, B.W., Lucio, B., SCHAT, K.A.; SOHOJ, H. Pathogenesis of Marek's disease virus-induced lesions. I. Lesion characterization & cell line establishment. **Avian Diseases**, 33, p. 291-302, 1989.
5. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed., 2000. 1110p.
6. FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p.
7. HIRAI, K. Molecular biology of Marek's disease virus: a review. In S. KATO, T. HORIUCHI, T. MIKAMI; K. HIRAI (Eds.) **Proceedings of the International Symposium on Marek's Disease**, 1988.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
9. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
10. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
11. PAYNE L.N., E.D. Marek's Disease. Martinus Nijhoff, Boston, 1985. 359p.
12. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
13. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p
14. Schat, K.A. Isolation of Marek's disease virus: Revisited. **Avian Pathology**, 34, p. 91-95, 2005.
15. VENUGOPAL, N. Evolution of Marek's disease – A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. **The Veterinary Journal**, p. 175-183, Sep. 2005.
16. Witter, R.L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. **Avian Diseases**, 41, p. 149-163, 1997.
17. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.7 Doença infecciosa da bursa

Conceito

A doença infecciosa da bursa (IBD), também denominada doença de Gumboro, causa grandes perdas econômicas na indústria avícola em diferentes partes do mundo. É uma doença infecciocontagiosa viral aguda de aves jovens que afeta particularmente o tecido linfoide da bursa Fabricius. A IBD é amplamente disseminada nas criações de aves do Brasil. As perdas econômicas estão relacionadas com o elevado número de aves doentes, a alta morbidade e a mortalidade, fatores esses associados à severa imunossupressão causada pela doença, que predispõe a inúmeras infecções secundárias, como dermatite gangrenosa, infecção por *E. coli* e estafilococose, entre outras, o que eleva a mortalidade^[1,7].

Etiologia e Patogênese

O vírus da IBD ou IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*) é um RNA membro da família *Birnaviridae*, gênero *avibirnaviridae*, não envelopado, icosaédrico, que possui aproximadamente 58 a 65nm de diâmetro. O vírus tem tropismo por linfócitos B imaturos da bursa de Fabricius, sendo esse, portanto, o órgão alvo primário. O genoma é composto por dois segmentos de fita dupla de RNA, denominados A e B, sendo o segmento A maior que o segmento B. As proteínas estruturais do IBDV são identificadas como VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5^[5,6].

O segmento A codifica as proteínas VP2, VP3, VP4 e VP5, e as proteínas estruturais VP2 e VP3 são formadoras das porções externas e internas do capsídeo respectivamente. A proteína VP2 é codificada por uma região de sequência variável do genoma e possui epítopos conformação-dependente relacionados à antigenicidade do vírus e à indução de apoptose^[3, 8,10]. Mutações nessa proteína podem ser responsáveis pelo surgimento de novas variantes do IBDV e por diferenças na antigenicidade e atenuação viral^[15]. A VP3 desempenha diferentes papéis durante o ciclo viral, sendo requerida no controle da maturação do víron; já a VP4 está envolvida no enovelamento das demais proteínas. A VP5 é um fator importante na determinação da patogenicidade do vírus. O segmento B é responsável pela codificação da proteína VP1, denominada RNA polimerase viral, e está envolvida na replicação do material genético viral durante a infecção^[4,5,6].

São conhecidos dois sorotipos, 1 e 2; o sorotipo 1 infecta principalmente galinhas, e o sorotipo 2 é menos virulento e também considerado não patogênico. Os IBDVs pertencentes ao sorotipo 1 podem ser classificados, de acordo com sua patogenicidade, em clássicos, variantes e altamente virulentos (vvIBDV)^[11].

O vírus é eliminado pelas fezes por até duas semanas após a infecção. A infecção dos animais normalmente ocorre pela mucosa oral. O vírus pode ser detectado inicialmente nas células linfoides dos cecos, do duodeno e das células de Kupfer do fígado, onde faz a replicação primária e, em seguida, através da corrente sanguínea, atinge as células da bursa de Fabricius^[1,8]. Nas aves os órgãos linfoides primários incluem a bursa de Fabricius e o timo. Como órgãos linfoides periféricos ou secundários estão classificados o baço, as tonsilas cecais, a medula óssea e a glândula de Harder. O IBDV, ao acometer esses órgãos na primeira semana de vida, causa uma supressão permanente na produção de anticorpos pela depleção de linfócitos B. Quanto mais precoce a infecção, mais graves e irreversíveis serão os danos causados na bursa de Fabricius, resultando no processo de imunossupressão permanente. No caso de aves mais velhas, nas quais o sistema imune está maduro e as populações de linfócitos B já migraram para os folículos linfoides, o processo de imunossupressão é menor e tende a ser temporário^[9,13,17].

Diagnóstico

A suspeita clínica de IBD pode ser levantada a partir da análise do histórico de mortalidade do lote, dos sinais clínicos e das lesões. O diagnóstico definitivo pode ser realizado pelo isolamento do vírus em ovos embrionados ou em cultura de células e detecção de anticorpos circulantes para IBDV. Atualmente as técnicas moleculares como RT-PCR têm sido utilizadas com bastante segurança no diagnóstico da doença^[2,19].

a) Epidemiologia

A infecção em pintinhos sem imunidade passiva e com menos de três semanas de idade induz a severa imunossupressão. Após a terceira semana, a infecção pode provocar, além de imunossupressão, alta mortalidade. O vírus passa a ser eliminado nas fezes a partir do segundo dia após a infecção e vai até o décimo. O IBDV pode disseminar-se dentro de um lote de aves pelo contato direto com aves infectadas e consumo de alimentos e água contaminados, sendo conside-

rado altamente contagioso entre aves e entre lotes. Insetos como o cascudinho (*Alphitobius dia-perinus*) também atuam como vetores da IBD. Em áreas de alta densidade de produção de frangos de corte, as pessoas relacionadas com a atividade, os fômites e os veículos de transporte são os principais disseminadores da doença entre as granjas. Não há evidência de transmissão vertical e de que aves infectadas permaneçam portadoras^[16,18,19].

A morbidade pode chegar a 100% e a mortalidade varia de 20% a 30%, dependendo principalmente da condição imunitária do lote, da virulência da cepa e dos agentes secundários envolvidos^[1,14].

O vírus é bastante resistente, persistindo por vários meses em instalações contaminadas. Em instalações, alimentos e fezes contaminados, o vírion é capaz de permanecer viável por mais de 100 dias. Sua notável resistência a desinfetantes lhe permite sobreviver em granjas por meses, mesmo após limpezas e desinfecções. É resistente a diversos agentes químicos, mas é inativado com solução de formalina a 0,5% após 6 horas, cloramina 0,5% após 10 minutos; formol e pH altos são mais eficazes contra o vírus. A capacidade de infectar pintinhos diminui quando submetido à formalina 0,5% por 6 horas. Compostos à base de amônia natural e glutaraldeído em uma solução a 0,1% mostraram possuir ação sobre o vírus em presença de matéria orgânica. A cloramina a 0,5% pode destruir o vírus em 10 minutos. Os aldeídos são os que têm apresentado melhor ação contra o IBDV^[2,5,6].

Atualmente o controle e a prevenção da IBD têm sido baseados no uso de vacinação e esquemas de biosseguridade. A proteção materna é essencial para proteger as aves nos seus primeiros dias de vida contra o desafio de campo, porém já está comprovado que essa imunidade também age nos vírus vacinais interferindo no sucesso da vacinação^[3,13].

b) Sinais clínicos

O período de incubação é muito curto e os sinais clínicos da doença podem ser detectados em 2 a 3 dias. Os pintinhos descendentes das matrizes vacinadas tornam-se susceptíveis à infecção pelos vvIBDV por volta dos 27 dias de idade e tornam-se totalmente suscetíveis entre 37 e 40 dias de idade. Já em pintinhos descendentes de matrizes não vacinadas, a fase de suscetibilidade ocorre entre 3 e 10 dias de idade, e se tornarão totalmente suscetíveis entre 23 e 26 dias de idade. Quando a infecção ocorre em pintinhos de até três semanas de idade, ocasiona uma severa imunossupressão, podendo não apresentar manifestação de sinais clínicos, mas picos de mortalidade com morte súbita. Aves jovens podem manifestar depressão, prostração severa, hemorragias na pele e nos músculos do peito e desidratação com descoloração do músculo peitoral^[2,14].

Na forma subclínica, frequente em aves infectadas com menos de duas semanas de idade, os sinais clínicos são leves, apresentando quadro de atraso do crescimento e baixa mortalidade. É importante considerar que, devido à imunossupressão, os animais tornam-se mais suscetíveis a infecções secundárias e têm menor resposta à vacinação para outras enfermidades^[10,18].

c) Patologia

Na necropsia as principais alterações são encontradas na bursa de Fabricius, que inicialmente se apresenta edemaciada, com um aumento de tamanho, hiperêmica e com transudato amarelado gelatinoso cobrindo a superfície serosa. Hemorragias e áreas de necrose podem estar presentes em casos mais severos. Cinco dias após a infecção, a bursa diminui rapidamente de tamanho (atrofia), ocorrem necrose e depleção de linfócitos nos órgãos linfoides secundários, incluindo o baço, a glândula de Harder e as tonsilas cecais. O timo se apresenta opaco. A medula óssea apresenta aspecto amarelado e gorduroso ou cor-de-rosa. Petéquias podem estar presentes nos músculos do peito e das coxas devido à ação do IBDV nos mecanismos da coagulação.

Mudanças no aspecto da parede e no conteúdo intestinal e aumento de muco podem ocorrer em alguns casos^[1,3,14].

No exame histopatológico é possível identificar destruição dos sítios de proliferação dos linfócitos B e alteração na arquitetura folicular normal da bursa em consequência da degeneração e da necrose na região medular dos folículos. As áreas interfoliculares tornam-se proeminentes devido à hipertrofia do tecido conectivo. Outros órgãos linfoideos, como timo, baço, tonsilas cecais e glândula de Harder, podem apresentar graus variados de necrose dos folículos linfoideos. Algumas variantes do vírus podem causar lesões menos severas, mas podem induzir a uma rápida atrofia da bursa e severa imunossupressão^[2,3].

d) Diagnóstico laboratorial

Para detecção de anticorpos circulantes podem ser empregadas as técnicas de neutralização de vírus (VN), soroneutralização (SN), precipitação em ágar gel (AGP) e testes de ELISA. A soroneutralização e o teste de ELISA são testes quantitativos e preferíveis quando comparados com AGP. O teste de ELISA, além de ser mais rápido, apresenta alta sensibilidade e especificidade^[3,9].

O isolamento viral pode ser realizado na membrana córion-alantoide de ovos embrionados com 10 a 11 dias, ou em cultivo celular. Para isolamento deve-se utilizar macerado de baço e bursa de aves mortas ou “eutanasiadas” na fase aguda. Após o isolamento, o IBDV deve ser tipificado^[11,19].

As técnicas moleculares como RT-PCR e RT-nested-PCR também permitem a detecção direta do vírus, mostrando-se mais sensíveis e específicas do que o isolamento. A tipificação das cepas de IBDV representa importante indicativo na escolha adequada da cepa vacinal e na monitoria da eficiência de programas de vacinação em campo. O isolamento viral não é uma ferramenta de rotina no diagnóstico de IBD em função do custo e do trabalho. Além disso, há indicativos de que os vírus de campo não crescem facilmente em ovos embrionados ou em culturas celulares, existindo risco de falso-negativos^[8, 19].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir outras doenças que apresentam sinais clínicos e lesões semelhantes, como doença de Marek, coccidiose, anemia infeciosa das galinhas, reticulodoteliose, bronquite infeciosa e síndrome hemorrágica (hemorragias musculares, mas ausência de alterações na bolsa)^[13].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para diagnóstico sorológico (preferencialmente teste de ELISA), enviar ao laboratório 3ml de soro de um número representativo de aves do plantel (*ver capítulo XX {coleta de material}*). Para exame histopatológico, colher amostras de bursa de Fabricius, baço, proventrículo, fígado, rim, timo, tonsilas cecais, conservadas em solução de formalina a 10% tamponada. No caso de lotes vacinados, é importante o envio do histórico de vacinações, pois vacinas vivas podem causar lesões em graus leves na bursa^[12].

Para a detecção do vírus através de ensaios moleculares, como RT-PCR e isolamento viral, colher a bursa de Fabricius e o baço. O material deve ser congelado a -20°C e encaminhado o mais rápido possível para o laboratório^[19].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. BOLIS, D.A.; PAGANINI, F.J.; SIMON, V.A.; ZUANAZE, M.F.; SCANAVINI-NETO, H.; CORREA, A.R.; ITO, N.M.K. Gumboro Disease: Evaluation of serological and anatomo-pathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, n. 2, v. 5, maio/agosto, 2003, p. 137-146.
4. BROWN, B.S. IBD: a Worldwide Perspective. **Misset World Poultry**, v. 8, n. 6, 1992.
5. FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p.
6. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
7. ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A. **Doença de Gumboro: revisão de literatura avanços em biotecnologia e novos conhecimentos**. São Paulo: ELANCO Saúde Animal, 2001. 76p.
8. JACKWOOD D.J.; JACKWOOD, R.J. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. **Avian Dis.**, 41, p. 97-104, 1997.
9. JACKWOOD D.H.; SAIF Y.M. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. **Avian Dis.**, 31, p. 766-770, 1987.
10. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
11. LUKERT, P.D. & DAVIS, R.B. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. **Avian Dis.**, v. 18, p. 243-250, 1974.
12. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
15. SANTOS, B.M. et al. Ocorrência de doença infecciosa bursal após vacinação com vacina atenuada com baixa passagem. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 511-513, out./dez., 2004.
16. SKEELES, J.K.; LUKERT, E.V.; DE BUYSESCHER, O.J. Infectious bursal disease virus infections. I. Complement and virus-neutralizing antibody response following infection of susceptible chickens. **Avian Dis.**, n. 23, p. 95-106, 1979.
17. TORBEYNS, R. Significance of Infectious Bursal Disease Serology in an Integrated Quality Control Program Under European Epidemiologic Conditions, **Avian Diseases**, n. 44, p. 611-17, 2000.
18. VAN DER BERG, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. **Avian Pathol.**, v. 29, n. 3, p. 175-194, 2000.
19. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.8 Encefalomielite Aviária

Conceito

Encefalomielite aviária (EA), ou tremor epidêmico, é uma doença infecciosa viral que acomete o sistema nervoso das aves. A EA está amplamente difundida ao redor do mundo e afeta várias espécies de aves, como galinhas, perus, faisões e codornas. As perdas econômicas estão associadas à mortalidade das aves jovens e à diminuição da produção das aves de postura. Atualmente, devido à utilização de eficientes programas vacinais, os casos de EA são mais raros, normalmente associados a erros de vacinação^[1,3].

Etiologia e Patogênese

O vírus da encefalomielite aviária (EAV) pertence à família *Picornaviridae* e gênero *Enterovírus*. É um RNA vírus de fita simples, icosaédrico, não envelopado. Possui quatro proteínas estruturais principais: VP1, VP2, VP3 e VP4. VP1, VP2 e VP3 são expostas na superfície do vírion; já a proteína VP4 está localizada na porção interna do capsídeo. Associado à proteína VP1 está o receptor responsável pela adsorção viral à membrana celular das células alvo. A replicação viral ocorre no citoplasma em um complexo associado à membrana^[4,5,11].

Existem dois patotipos do EAV que, apesar de sorologicamente similares, apresentam variações quanto ao tropismo e à virulência. Isolados de campo, são geralmente enterotrópicos de baixa patogenicidade, exceto em casos em que ocorre infecção vertical ou transmissão horizontal rápida^[7,8].

A infecção ocorre por via oral e as aves contaminadas eliminam o vírus pelas fezes. A replicação do vírus ocorre nas células epiteliais do intestino delgado, através da placa de Peyer e vasos linfáticos. O vírus penetra na corrente sanguínea, posteriormente atinge outros órgãos e o sistema nervoso central^[10,15]. As cepas Van Roehl (VR) são neurotrópicas e altamente mutáveis. Causam lesões macroscópicas nos embriões, como distrofia muscular, hemorragias e encefalomalacia^[2,14].

O EAV é resistente a éter, clorofórmio, detergentes não iônicos, baixo pH, pepsina e DNAse. No entanto, é suscetível ao formaldeído e à beta-propiolactona^[4].

Diagnóstico

A suspeita de EA deve considerar, além dos sinais clínicos (quando a doença ocorre em pintinhos), histórico do lote e programa de vacinação. A confirmação do diagnóstico pode ser realizada por isolamento viral, exame histopatológico e PCR. O estudo sorológico também pode auxiliar no diagnóstico^[1].

Epidemiologia

A transmissão das cepas de campo pode ocorrer tanto pela via horizontal quanto pela via vertical, sendo essa a mais importante forma de transmissão^[3].

A infecção ocorre pela via oral, e as aves contaminadas passam a eliminar o vírus nas fezes três dias após a infecção. Aves muito jovens podem excretar o vírus por mais de duas semanas; já aves acima de três semanas de idade eliminam o vírus por um período de aproximadamente cinco dias. Reprodutoras infectadas produzem ovos contaminados por três a seis semanas. A transmissão horizontal pode ser direta ou indireta, e a disseminação do EAV no galpão de aves alojadas em cama ocorre de forma rápida. Alguns autores citam que a transmissão horizontal pode ocorrer já na incubadora^[11,13].

A presença de anticorpos neutralizantes é o maior determinante da resistência à infecção pelo EAV, sendo eles responsáveis pela resistência relacionada à idade^[1].

Sinais Clínicos

O período de incubação varia de acordo com a forma de transmissão. Quando ocorre transmissão via vertical, o período de incubação é de 1 a 7 dias; já quando a transmissão ocorre pela via horizontal, o período de incubação é de no mínimo 11 dias. Em pintinhos com mais de três semanas de idade a infecção do SNC aparentemente não progride a ponto de levar a manifestação de sinais clínicos^[3,11].

As manifestações clínicas estão relacionadas à idade em que as aves foram infectadas. Quando ocorrem sinais nervosos, eles somente são observados nas primeiras semanas de vida dos pintinhos, que clinicamente apresentam: tremores musculares (principalmente na cabeça e no pescoço) de intensidade variada, apatia, olhos semicerrados, ataxia com perda de controle das pernas e paralisia. Com a progressão da ataxia as aves permanecem prostradas, amontoadas e incapazes de comer ou beber, e a morte sobrevém por sede ou inanição. Os pintinhos que sobrevivem tem seu desenvolvimento prejudicado e em alguns casos podem apresentar cegueira devida à opacidade da tonalidade no cristalino^[1,2].

Não existem sinais clínicos característicos da EA em aves adultas. Galinhas de postura geralmente apresentam queda na produção de ovos em graus variáveis, porém não há alterações na qualidade da casca. A eclodibilidade dos ovos diminui cerca de 20% por conta da mortalidade embrionária^[8].

Patologia

Raramente são observadas lesões macroscópicas na necropsia. Em aves jovens, podem eventualmente ser encontradas áreas esbranquiçadas na região muscular da moela. Aves adultas podem apresentar opacidade azulada no cristalino^[2,3,6].

No exame histopatológico os principais achados concentram-se no SNC, como encefalomielite não purulenta disseminada, com vasculite e presença de infiltrado linfocítico perivasicular. No cerebelo e no mesencéfalo pode ser observada microgliose nodular e difusa. No mesencéfalo, dois núcleos (núcleo *rotundus* e núcleo *ovoidalis*) são acometidos por microgliose difusa, podendo ser considerada lesão patognomônica da EA^[13]. Outro achado frequente é a cromatólise central dos neurônios no núcleo do tronco cerebral. Não há envolvimento do sistema nervoso periférico. Em alguns casos, no proventrículo podem ser observados focos intensos infiltrados linfocitários. Lesões similares podem ocorrer no miocárdio e no músculo da moela, e nesse caso deve-se diferenciar da doença de Marek^[2,3,13].

Diagnóstico laboratorial

O isolamento viral pode ser realizado pela inoculação de ovos embrionados com 5 a 7 dias de incubação e posterior observação das lesões macroscópicas e histológicas. Deve-se utilizar preferencialmente macerado de SNC (cérebro e cerebelo). Esse mesmo material pode ser utilizado para a detecção do genoma viral com métodos moleculares baseados na PCR^[9]. A detecção de抗ígenos virais pode ser realizada com ensaios de imunofluorescência indireta a partir de lâminas histológicas do SNC^[3].

Ensaços sorológicos como virusneutralização, imunofluorescência indireta, imunodifusão e teste de ELISA podem ser utilizados para detectar anticorpos circulantes para o EAV. O teste de ELISA, além da rapidez, apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo a prova de eleição para monitoria vacinal^[13,14].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral, colher SNC (cérebro e cerebelo), pâncreas e duodeno, acondicionados sob refrigeração a uma temperatura de 2 a 8°C. Para o exame histopatológico, colher SNC (cérebro e cerebelo) inteiro, moela, proventrículo, duodeno, pâncreas, fígado, devendo esses ser fixados em formalina a 10% tamponada. Para exames sorológicos, enviar ao laboratório de diagnóstico 3ml de soro de um número representativo de aves, acompanhado de informações acerca do histórico de vacinação^[8, 10].

Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial deve contemplar outras doenças que cursam com sinais nervosos, como doença de Newcastle, influenza aviária, deficiência de vitamina E e A (onde ocorre hemorragia cerebral), deficiência de riboflavina, doença de Marek (presença de tumores) e aspergilose^[12].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
4. FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p.
5. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1999, 446p.
6. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
7. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
8. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
9. OHISHI, K.; SENDA, M.; YAMAMOTO, H.; NAGAI, H.; NORIMATSU, M.; SASAKI, H. Detection of avian encephalomyelitis viral antigen with a monoclonal antibody. **Avian Pathology**, p. 49-59, 1994.
10. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
11. McNULTY, M.S.; CONNOR, T.J.; McNEILLY, F.; McFERRAN, J.B. Biological characterisation of avian enteroviruses and enterovirus-like viruses. **Avian Pathology**, p. 75-87, 1990.
12. QUINN,P.J.; MARKEY, K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, 2005.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
15. SHAFREN, D.R. & TANNOCK, G.A. The pathogenesis of avian encephalomyelitis viruses. **Journal of General Virology**, 72, p. 2713-271, 1991.

1.2.9 Laringotraqueíte infecciosa

Conceito

A Laringotraqueíte Infecciosa Aviária (AIL) é uma doença respiratória aguda, altamente contagiosa que acomete galinhas de todas as idades. A doença causa grande impacto econômico para a maioria dos países com produção avícola expressiva. No Brasil, surtos da AIL em galinhas poedeiras comerciais foram descritos nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e, mais recentemente, em plantéis avícolas de postura comercial e industrial e aves caipiras do Estado de Minas Gerais^[12]. As principais perdas econômicas associadas à doença são decorrentes da alta taxa de mortalidade, da queda na produção de ovos e da piora no desempenho dos frangos^[2].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da AIL é o vírus *Gallid herpesvirus* tipo 1, ou Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa (AILV). O vírus pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* e gênero *Iltovirus*^[8]. É um DNA vírus de fita dupla, esférico, envelopado, com capacidade de formação de corpúsculos de inclusão intranuclear. Possui um envelope rico em glicoproteínas altamente antigênicas capazes de induzir tanto resposta imune-humoral quanto celular. As principais glicoproteínas são: B (gB), C (gC), D (gD), X (gX) e K (gK). As gB, gD, gH e gK são essenciais para a replicação viral, enquanto gC, gE, gG, gI e gJ estão envolvidas principalmente com o reconhecimento das células alvo e com a virulência. Apenas um sorotipo do vírus causa a doença, mas dentro do mesmo sorotipo pode haver cepas com variação de patogenicidade. O vírus possui tropismo pelo epitélio respiratório, replicando-se no epitélio da laringe, traqueia e em outras membranas e tecidos, como conjuntiva, seios nasais, sacos aéreos e pulmões^[5,6,12].

Apesar de o vírus da AIL ser envelopado, apresenta alta resistência à maioria dos desinfetantes comerciais utilizados na avicultura industrial. Alguns autores relatam que o vírus pode permanecer viável no exsudato traqueal e na carcaça das aves por períodos de 10 a 100 dias, em temperatura de 13 a 23°C e por várias semanas na cama ou nos dejetos. O vírus é sensível a calor, luz UV, clorofórmio, éter, fenol (5%), cresol (3%), formalina, hipocloritos e iodóforos^[13,14].

Diagnóstico

O diagnóstico pode ser baseado no isolamento viral e posterior caracterização do isolado por meio de técnicas moleculares ou em achados histológicos, como a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares no epitélio do trato respiratório^[4].

a) Epidemiologia

O AILV infecta preferencialmente galinhas, perus e faisões de todas as idades, embora a ocorrência seja maior em aves adultas com cerca de 10 semanas e em fase de produção. Os plantéis de postura comercial e de frangos de corte são os mais vulneráveis em decorrência da alta densidade animal^[4,10].

A principal forma de transmissão do ALV ocorre pela via horizontal, pelo contato direto de aves infectadas com as suscetíveis, ou de forma indireta por equipamentos, pessoas, veículos e aerossóis contaminados. Condições estressantes como manejo, ambiência, postura e densidade e podem desencadear a doença em aves portadoras assintomáticas (vírus latente)^[3]. Aves que tiveram a doença ou que foram vacinadas podem albergar o vírus e eliminá-lo por longo período de tempo. Aves “de fundo de quintal” podem permanecer contaminadas sem manifestar a doença clínica, tornando-as uma importante fonte de manutenção do vírus e de disseminação no ambiente^[7,14].

O vírus pode permanecer em estado latente no nervo trigêmeo ou persistir no trato respiratório como infecção inaparente nas aves portadoras por toda sua vida, sendo classificado como pneumotrópico. As aves infectadas eliminam o vírus da AIL pelas secreções oronasais, principalmente durante situações estressantes^[11].

As taxas de morbidade e mortalidade são altas. A morbidade pode chegar a 100% e a mortalidade varia de 10% a 70%. Em áreas endêmicas, programas de vacinação para matrizes e poedeiras antes do início da postura são empregados para prevenir a doença. É importante considerar que o vírus vacinal atenuado pode provocar reações vacinais, assim como permanecer circulante no plantel, sofrer mutações e tornar-se patogênico novamente. Por isso, deve-se evitar a mistura de aves vacinadas e não vacinadas^[4].

b) Sinais clínicos

As principais vias de infecção são a via nasal ocular e a oral. O período de incubação é de 6 a 12 dias e os sinais clínicos variam de acordo com a patogenicidade da cepa. Algumas cepas são altamente citolíticas, principalmente na traqueia, causando extensas áreas de necrose e hemorragias^[10].

Nos casos agudos as aves apresentam severa dificuldade respiratória, descarga nasal, fortes estertores, expectoração de muco sanguinolento, tosse e, em casos mais severos, morte em 2 ou 3 dias. O exsudato traqueal sanguinolento eliminado através da boca durante crises de tosse e movimentos da cabeça pode manchar de sangue as penas, as paredes, os equipamentos e, consequentemente, contaminar o ambiente. Como a traqueia se encontra parcialmente bloqueada com sangue e exsudato, a ave estende o pescoço durante o esforço de tosse para evitar o sufocamento^[2,7].

A forma moderada ou subaguda da doença é mais frequente e, nesse caso, a mortalidade tende a ser baixa. Os sinais respiratórios são mais brandos, podendo ocorrer conjuntivite, traqueíte, estertores suaves e descarga nasal persistente^[3].

c) Patologia

As lesões mais importantes são observadas na traqueia, que, inicialmente, se apresenta com a mucosa hiperêmica, edemaciada, inflamada, tornando-se hemorrágica, com a presença de exsudato sanguinolento e fibrinoso com o passar do tempo. Em alguns casos, também se podem observar lesões diftéricas com presença de tecido necrosado, que facilmente se desprende, na traqueia, nos brônquios, nos pulmões e nos sacos aéreos^[5]. Nos surtos com cepas de baixa patogenicidade, essas lesões são mais brandas. Ocasionalmente pode ocorrer uma discreta laringotraqueíte com conjuntivite.

No exame histológico é possível observar presença de infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa da traqueia, perda de cílios do epitélio respiratório e necrose do epitélio atingindo a lâmina própria^[11,12]. Corpúsculos de inclusão intranucleares são considerados lesões patognomônicas da AIL, sendo encontrados entre o primeiro e o quinto dia após a infecção e desaparecendo em seguida por conta da descamação do epitélio^[12]. A formação de sincícios também ocorre no epitélio da traqueia e na conjuntiva nas primeiras semanas após a infecção^[11,12].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento viral pode ser realizado em ovos (SPF) inoculados via membrana cório-alantoide (MCA). No caso de cultura celular, podem-se utilizar células de rim de embrião de galinha (CEK) e fígado de embrião de galinha (CELi), porém o isolamento viral é uma técnica laboriosa^[1,15].

Atualmente se têm utilizado técnicas moleculares como PCR e PCR em Tempo Real para detecção do DNA viral como método de diagnóstico. A PCR-RFLP também tem sido utilizada com sucesso em estudos para avaliar o possível papel dos vírus vacinais em surtos da doença em países onde a vacinação é recomendada^[10].

Para o diagnóstico sorológico podem-se utilizar as técnicas de virusneutralização, imuno-difusão em ágar gel, imunofluorescência direta e teste de ELISA, entretanto, oferecem baixa sensibilidade devida à baixa soroconversão das aves infectadas^[14,16]. No caso de plantéis vacinados, os resultados das provas sorológicas têm pouco valor diagnóstico, devendo-se, nesse caso, optar pelo teste de ELISA para diferenciação do título vacinal.

e) Diagnóstico diferencial

Nos casos de suspeita de AIL é importante fazer diagnóstico diferencial de outras doenças respiratórias, como bronquite infecciosa, micoplasmose, pneumovirose, doença de Newcastle e coriza infecciosa.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

A presença do vírus pode ser detectada no tecido da traqueia 6 a 8 dias após a infecção. O isolamento viral pode ser realizado a partir da inoculação de exsudato respiratório ou conjuntival, raspados de traqueia ou tecidos. Esses materiais devem ser conservados sob refrigeração, entre 2 e 8°C, e submetidos imediatamente ao laboratório de diagnóstico veterinário. Para ensaios moleculares (PCR), coletar traqueia e suabes traqueais, podendo estes ser conservados sob refrigeração ou mesmo congelados a -20°C^[9,15].

Para o exame histopatológico, colher fragmentos da laringe, da traqueia e do pulmão, devendo ser fixados em formalina a 10% tamponada. Para provas sorológicas, como teste de ELISA, enviar aproximadamente 3ml de soro de um número representativo do plantel. Nos casos de plantéis vacinados, é imprescindível o envio do histórico de vacinação ao laboratório de diagnóstico, junto com o material.

Referências bibliográficas

1. ABBAS, F.; ANDREASEN, R.J. Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. **Avian Dis.**, 40, p. 290-295, 1996.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
5. CLAVIJO, A.; NAGY, E. Differentiation of infectious Laryngotracheitis Virus strains by Polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 41, p. 241-246, 1997.
6. FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p
7. HIDALGO, H. Infectious Laryngotracheitis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 3, p. 157-168, 2003.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
9. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
10. LINARES, J.A.; BICKFORD, A.A.; COOPER, G.L.; CHARLTON B.R.; WOOLCOCK, P.R. An outbreak of Infectious Laryngotracheitis in California broilers. **Avian Diseases**, v. 38, n. 1, p. 188-192, 1994.

11. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
12. PORTZ, C. **Caracterização biológica e molecular de amostras brasileiras do vírus da laringotraqueíte infecciosa**. 2008. 108 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
15. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., 2004.

1.2.10 Leucose aviária

Conceitos

O complexo leucótico aviário compreende uma variedade de neoplasias benignas e malignas. Nesse complexo se enquadram cinco tipos de leucose que acometem as aves: a) leucose linfóide, b) leucose mieloide, c) eritroblastose, d) mieloblastose, e) mielocitomatose. A doença está amplamente difundida no mundo, causando grandes perdas econômicas para a maioria dos países com avicultura moderna.

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico das leucoses aviárias é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Alpharetrovirus*, denominado vírus da leucose aviária (ALV). O ALV pode ser classificado em 6 subgrupos (A, B, C, D, E, e J), de acordo com a característica antigenica das glicoproteínas do envelope viral. O vírus possui quatro genes principais contidos no genoma (RNA), *gag*, *pro*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica proteínas estruturais internas, o gene *pro* (protease) codifica a enzima da protease, o gene *pol* (polimerase) codifica a enzima transcriptase reversa e integrase, e, por último, o gene *env* (envelope), que codifica glicoproteínas transmembrana (TM) e de superfície (SU) do envelope.^[4,9,12]

A entrada do vírus na célula ocorre após a ligação da glicoproteína do envelope a receptores celulares específicos. Pela ação da transcriptase reversa, são sintetizadas cópias de DNA de fita dupla a partir do genoma viral (RNA) no citoplasma das células hospedeiras^[6,12].

Os retrovírus podem ser classificados como endógenos ou exógenos. Os retrovírus endógenos resultam da infecção das células de linhagem germinativa e são transmitidos para a progênie, sendo regulados por genes celulares, normalmente silenciosos^[3,5].

Os AVL dos subgrupos A, B, C, D e J são classificados como vírus exógenos e podem ser transmitidos via horizontal ou vertical, mas não têm a capacidade de integrar o seu cDNA no genoma da célula hospedeira. O subgrupo E é considerado endógeno e tem a capacidade de inserir ou integrar seu material genético no DNA da célula do hospedeiro. O subgrupo J tem sido o mais comumente isolado de surtos da doença, com tropismo pelas células mieloides da medula óssea e frequentemente associados a tumores envolvendo células da linha granulocítica produzidos na medula óssea (mielocitomatose), também denominada leucose mieloide^[1,9,14].

O ALV é sensível a solventes lipídicos, como éter, e a detergentes, como sulfato de dodecila sódico; é rapidamente inativado em temperaturas altas, porém pode ser preservado por longos períodos quando submetido a temperaturas extremamente baixas^[4].

Diagnóstico

A suspeita de ALV pode ser levantada a partir de achados de necropsias, como a presença de tumores na bursa de Fabricius, no fígado, no baço e em outros órgãos. O diagnóstico definitivo pode ser obtido por isolamento viral e detecção através da PCR, e em ambos os casos deve-se levar em consideração a análise histopatológica. Imunensaios, como teste de ELISA, apesar da baixa especificidade, podem ser utilizados para detectar anticorpos antiproteína p27^[2,11].

Epidemiologia

Atualmente a leucose aviária é considerada controlada no Brasil e em outros países com avicultura moderna em consequência da adoção de rígidas medidas de biossegurança. A transmissão do ALV pode ocorrer tanto de forma vertical quanto horizontal. A transmissão vertical está associada à eliminação do vírus pelas glândulas secretoras de albúmen no oviduto; já a transmissão horizontal pode ocorrer no incubatório pelo contato direto, por aerossóis, e pelo meconônio. Aves infectadas também podem eliminar o vírus via saliva e fezes.

As aves infectadas verticalmente não desenvolvem resposta imune contra o vírus, tornando-se mais suscetíveis a desenvolver o quadro de tumorações. Quando ocorre contaminação horizontal na incubadora, pode ocorrer prejuízo na produtividade, mas raramente há presença de tumores, principalmente se a infecção ocorre após a primeira semana de idade, haja vista a capacidade precoce do pintinho de estabelecer uma resposta imune eficiente contra o vírus^[5,10].

Sinais Clínicos

Por se tratar de uma doença crônica, o aparecimento de sinais clínicos e lesões tende a ser lento e tardio, a partir de 14 a 16 semanas. Dependendo da patogênese do vírus, duas formas da doença são mais frequentemente evidenciadas: leucose linfoide (LF), devida à transformação neoplásica dos linfoblastos na Bursa de Fabricius e posterior indução de focos metastáticos em outros órgãos, ou leucose mieloide (LM), em que as células neoplásicas passam a ocupar toda a medula óssea e em alguns casos também o periôsteo, formando tumores nodulares na superfície dos ossos, como esterno e costela.

Sinais clínicos podem não ser evidentes e quando presentes são inespecíficos. De modo geral, as aves podem apresentar apatia, crista pálida, algumas vezes abdômen distendido devido à presença de tumores, caquexia e morte^[1,10]. Nos casos de leucose linfoide observa-se também aumento da bursa de Fabricius, perceptível na palpação. Na leucose mieloide, além dos sinais clínicos inespecíficos, pode ocorrer baixo desenvolvimento, paralisia de membros e deformidades ósseas^[1,2,10].

A forma de eritroblastose, apesar de rara, quando ocorre, os animais apresentam um pronunciado quadro de hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia. Quando o curso da doença é subclínico, o quadro se caracteriza por diminuição da produção de ovos sem o desenvolvimento de tumores. As perdas econômicas estão associadas, principalmente, ao aumento na mortalidade, que pode variar de 2% a 20%, e por infecções secundárias que levam à diminuição do desempenho de produção dos lotes^[3,13].

Patologia

Os principais aspectos anatomo-patológicos que devem ser considerados para diferenciação dos quadros de leucose mieloide e leucose linfoide estão descritos na Tabela 10. Na leucose linfoide as lesões normalmente se localizam na bursa de Fabricius, que geralmente está aumentada, no fígado, no baço e, eventualmente, em outros órgãos, como coração, pulmão, mesentério, medula óssea e gônadas^[10,11,13]. Os tumores apresentam coloração branco-acinzentada, com aspecto nodu-

lar, miliar ou difuso. Na leucose mieloide observam-se formações nodulares volumosas de coloração amarelada associadas a grandes ossos, articulações, principalmente costocondrais e órgãos como baço e fígado. Também são frequentes achados como hepatoesplenomegalia com a presença de múltiplos focos puntiformes esbranquiçados e difusos no parênquima^[2,9].

Tabela 10. Aspectos anatomo-patológicos dos quadros de leucose mieloide e leucose linfoide em aves de criação industrial

Órgãos	Leucose linfoide	Leucose mieloide
Bursa de Fabricius	Aumento de volume, com a presença de tumores nodulares	Sem lesões
Fígado	Hepatomegalia, com a presença de tumores de aspecto difuso, miliar ou nodular	Presença de tumores nodulares ou difusos esbranquiçados
Baço	Esplenomegalia com a presença de tumores de aspecto difuso, miliar ou nodular	Tumores difusos
Medula óssea	Aspecto tumoral (às vezes), com envolvimento focal ou difuso	Presença de infiltrados tumorais difusos de coloração amarelada

Na histologia da leucose linfoide observam-se estruturas tumorais formadas por linfoblastos com núcleo volumoso e vesicular que substitui e comprime as células dos órgãos e tecidos, em vez de se infiltrarem entre elas. Na bursa de Fabricius também é possível observar proliferação intrafolícular das células tumorais. Nos casos de leucose mieloide, na medula óssea se observa a proliferação de células mieloides imaturas com núcleos grandes, citoplasma contendo granulações eosinofílicas e a presença de numerosas mitoses^[7,9,13].

Diagnóstico laboratorial

O isolamento viral é realizado em ovos embrionados (SPF), devendo-se utilizar ensaios moleculares com PCR para detectar e identificar o vírus. Protocolos de PCR também podem ser utilizados no diagnóstico de rotina para a detecção do ALV a partir de amostras clínicas. O diagnóstico sorológico pode ser realizado utilizando-se o teste de ELISA, porém este ensaio não difere os subgrupos virais, visto que é direcionado à detecção de anticorpos contra a proteína do capsídeo p27, comum a todos os ALVs^[3,10].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral pode-se colher sangue, fragmento de massas tumorais, folículos das penas, fezes, suabes cloacais e albúmen, devendo esses itens ser acondicionados sob refrigeração de 2 a 8°C. Caso seja direcionada a detecção pela PCR, pode-se coletar também albúmen e soro sanguíneo, que podem ser enviados ao laboratório de diagnóstico congelados a -20°C.

Para exame histopatológico, colher fragmentos de massas tumorais, do fígado, do baço, da bursa de Fabricius, do intestino e do pulmão e fixar em solução de formalina a 10% tamponada. Para o exame sorológico utilizando o teste de ELISA, enviar, sob refrigeração, 3ml de sangue de um grupo representativo de aves do plantel^[8,12].

Diagnóstico Diferencial

No diagnóstico diferencial, além de considerar as doenças do próprio complexo leucose, incluir outras doenças tumorais, como doença de Marek e reticuloendoteliose.

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
4. FADLY, A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review. **Avian Pathol.**, v. 29, p. 529-535, 2000.
5. FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p.
6. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
7. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
8. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
9. MANZAN1, R.M.; BACCARO, M.R.; FERREIRA, A.J.P.; SINHORINI, I.L.; MORENO, A.M. Histopathological and ultrastructural characteristics of myeloid leukosis in broiler chicken. **Arq. bras. med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 5, p. 757-761, 2006.
10. PAYNE, L.N.; BROWN, S.R.; BUMSTEAD, N.; HOWES, K.; RAZIER, J.A.; THOULESS, M.E. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. **Journal of General Virology**, p. 801-807, 1991.
11. QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, 2005.
12. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
13. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
14. WITTER, R.L.; BACON, L.D.; HUNT, H.D.; SILVA, R.E.; FFADLY, A.M. Avian leukosis virus subgroup J infection profiles in broiler breeder chickens: association with virus transmission to progeny. **Avian Diseases**, n. 44, p. 913-931, 2000.

1.2.11 Pneumovirose aviária

Conceito

As doenças respiratórias causam grandes perdas econômicas para a avicultura moderna devido ao aumento da mortalidade, aos gastos com medicamentos, à piora na conversão, à queda na postura e à redução na qualidade dos ovos. A pneumovirose aviária, ou rinotraqueite dos perus, é uma doença aguda do trato respiratório superior de galinhas e perus caracterizada por um quadro de espirros, sinusite e corrimento nasal. A doença também está associada à síndrome da cabeça inchada nas galinhas^[2].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da pneumovirose aviária é um *Metapneumovírus*, anteriormente denominado *Pneumovírus*, pertencente à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*. O *Metapneumovírus* ou Vírus da Pneumovirose Aviária (APV) é um vírus RNA de fita simples, pleomórfico, classificado até o momento, em quatro subtipos: A, B, C e D. A maioria das amostras do *Metapneumoviírus* isolados no Brasil é caracterizada como pertencente ao subtipo A.

As principais proteínas codificadas pelo *Metapneumovirus* são: N (nucleocapsídeo), P (fosfoproteínas), M (matriz), F (fusão), M2, SH (*small hidrophonic*), G (adsorção) e L (polimerase). As proteínas F e G são imunogênicas e induzem anticorpos neutralizantes (Tabela 11). A proteína G também promove a ligação do vírus à célula alvo, enquanto a proteína F auxilia a penetração do vírus, a fusão do envelope e a formação de sincícios^[4,6,9].

O *Metapneumovirus* é sensível à maioria dos desinfetantes químicos e a altas temperaturas. Permanece viável no ambiente por meses, principalmente quando associado com matéria orgânica.

Tabela 11. Principais proteínas codificadas pelo genoma do *Metapneumovirus* e suas funções.

Proteína	Função
Proteínas associadas ao nucleocapsídeo	
N	Proteína principal do nucleocapsídeo, liga-se fortemente ao genoma
P	Principal fosfoproteína
L	Principal subunidade da polimerase
Proteínas transmembrana e de superfície	
F	Glicoproteína que auxilia na penetração do vírus, fusão do envelope e formação de sincício
G	Glicoproteína da espícula com domínios variáveis e promove a ligação do vírus à célula hospedeira
SH	Função ainda desconhecida
Proteínas da matriz	
M	Promove a interação entre o nucleocapsídeo e o envelope
M2	Função ainda desconhecida

Fonte: Adaptado de Calnek, (2000)^[4].

A infecção dos animais ocorre através do trato respiratório, a partir do qual o vírus atinge as células do epitélio ciliado dos condutos nasais, laringe e traqueia. A replicação do vírus implica ciliostase, que predispõe a infecção por agentes secundários. Após a replicação primária no trato respiratório, o vírus, através da corrente sanguínea, atinge o oviduto^[11].

Diagnóstico

A suspeita clínica deve considerar as manifestações clínicas, o histórico do lote e as lesões. Entretanto, devido à ausência de um quadro clínico-patológico específico da doença e à possibilidade de envolvimento de agentes secundários que podem agravar o quadro, o diagnóstico conclusivo deve ser realizado pela identificação do agente^[1].

a) Epidemiologia

A pneumovirosa aviária é uma doença economicamente importante para perus e galinhas de todas as idades, principalmente em aves jovens, até sete semanas de idade.

A transmissão do APV ocorre principalmente pela via horizontal, de forma direta, pelo contato com aves doentes, e indireta pelos aerossóis, pela água, pelos alimentos, pelos fômites e pelos veículos contaminados. Apesar da presença do vírus no oviduto, não há evidências de con-

taminação vertical. As aves, durante a infecção, podem eliminar o vírus pelas secreções nasais. Nos sistemas de produção em que as aves são criadas em gaiolas, a transmissão do vírus é relativamente lenta^[8,13].

As taxas de mortalidade e morbidade são elevadas. A morbidade pode chegar a 100% e a mortalidade varia de 1% a 50%, dependendo de fatores predisponentes e da ocorrência de infecções secundárias^[5,12].

b) Sinais clínicos

Fatores predisponentes como manejo deficiente, baixa qualidade da água, intensificação da produção, condição da cama, ausência de vazio sanitário, condições de ambiência (baixa ventilação, poeira, oscilação térmica) podem estar relacionados ao agravamento da doença. A infecção pode ocorrer em qualquer idade, porém o quadro clínico é mais severo em aves jovens, até sete semanas de idade.

Em frangos de corte, o período de incubação é de aproximadamente quatro semanas. Clínicamente os animais apresentam corrimento nasal, espirros, avermelhamento da conjuntiva, edema subcutâneo na cabeça, apatia e diminuição no consumo. A infecção, quando associada à síndrome da cabeça inchada, é caracterizada por apatia, edema na face e nos seios infraorbitários, desorientação, torcicolo e opistotônico. A síndrome da cabeça inchada é relatada tanto em frangos como em galinhas de postura^[3,5].

Em poedeiras comerciais os sinais clínicos geralmente são brandos e caracterizados por descarga nasal, edema periorbital, queda na produção de ovos e produção de ovos com casca fina. Em reprodutoras os sinais clínicos aparecem nas primeiras semanas de produção e durante o pico produtivo. Podem apresentar conjuntivite, lacrimejamento, inchaço facial, apatia, queda na produção, alteração na casca dos ovos, degeneração ovariana e atresia folicular. Podem ocorrer ainda desorientação, torcicolo, opistotônico e otite^[2,13].

Em perus a doença causa grave infecção respiratória e os animais apresentam apatia, espirros, sinusite, secreção nasal, estertores traqueais, conjuntivite, edema do seio infraorbital ou submandibular. Os sinais clínicos tendem a se acentuar quando há problemas no manejo ou ocorrência de infecções secundárias, podendo o quadro evoluir para aerossaculite, pericardite e pneumonia com aumento da taxa de mortalidade^[1,10].

c) Patologia

Os achados de necropsia concentram-se principalmente no trato respiratório superior. As principais lesões observadas são: presença de muco traqueal, secreção muco-catarral das narinas, sinusite e edema submandibular. Algumas aves podem apresentar inchaço na região da cabeça com edema subcutâneo gelatinoso e material purulento ou caseoso na glândula lacrimal. Em reprodutoras e poedeiras o ovário apresenta lesões inflamatórias com degeneração dos folículos ovarianos. Peruas em produção podem ter postura interna, peritonite e ovos deformados^[1,3].

Microscopicamente, observa-se cilioestase ou necrose dos cílios na traqueia, presença de infiltrado inflamatório com predomínio de heterófilos e linfócitos e hiperemia subepitelial. Em alguns casos é possível observar alterações na superfície celular e cílios dos cornetas nasais^[8].

d) Diagnóstico Laboratorial

O isolamento viral pode ser realizado em culturas celulares (cultivo de anel de traqueia). Nesse caso é possível visualizar o aparecimento do efeito citopático. Em ovos embrionados normalmente não se observam alterações características no embrião. A utilização de imunoensaios, como o teste de ELISA, para o diagnóstico sorológico é rápida e eficaz para estudar a circulação

do vírus nos planteis. É importante que sejam colhidas amostras de sangue pareadas com intervalo de 10 a 15 dias^[4,9].

Testes moleculares como RT-PCR e Nested-PCR também são empregados na rotina de diagnóstico do APV. Essas técnicas são mais vantajosas quando comparadas ao isolamento viral, pois detectam pequenas quantidades de partículas virais de forma rápida e sofrem pouca influência de outros agentes patógenos ou contaminantes^[14].

e) Diagnóstico diferencial

Incluir no diagnóstico diferencial micoplasmoses aviárias, coriza infecciosa, bronquite infecciosa, bordeteliose, cólera aviária, doença de Newcastle e laringotraqueite das aves^[8].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral e detecção do APV por técnicas moleculares (PCR), coletar fragmentos da traqueia e dos cornetas nasais. No caso da PCR também podem ser colhidos suaves traqueais. Os materiais devem ser conservados sob refrigeração ou, no caso de amostras para PCR, também podem ser congeladas a -20°C^[12].

Para exame histopatológico, colher traqueia, pulmão, rins, ovário e oviduto. Fixar em solução de formalina a 10% tamponada. Para exame sorológico, coletar amostras de sangue suficientes para obtenção de aproximadamente 3ml de soro de um número representativo de aves do lote. Nesse caso, sempre remeter ao laboratório o histórico de vacinações.

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. COOK J.K.A. Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens. **Vet. J.** n. 160, p. 118-125, 2000.
4. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
5. FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p.
6. D'ARCE, R.C.F. **Desenvolvimento de técnicas moleculares para o Diagnóstico diferencial do vírus da bronquite infecciosa e do pneumovírus aviário**. 2004. 79 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas, 2004.
7. HAFEZ, H.M. The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review. **Archiv fur Geflugelkunde**, 57, p. 181-185, 1993.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
9. JONES, R. C. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. **Avian Pathology** 25, p. 639-648, 1996.
10. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
11. KHERNA, R.S.; JONES, R.C. *In vitro* and *in vivo* studies on the pathogenicity of avian pneumovirus for the chicken oviduct. **Avian Pathology**, 28, p. 257-262, 1999.
12. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
13. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
14. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.

1.2.12 Síndrome da queda de postura

Conceito

A síndrome da queda de postura, também denominada EDS-76 (*Egg Dropping syndrome*), identificada em 1976, é uma doença infectocontagiosa das galinhas domésticas amplamente disseminada na maioria dos países com avicultura desenvolvida. Ela causa queda da postura, alterações na qualidade interna dos ovos e má qualidade da casca^[1].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da EDS-76 é um vírus pertencente à família *Adenoviridae* e dividido em dois gêneros: o *Mastadenovirus*, que infecta mamíferos, e o *Aviadenovirus*, que infecta aves. O *Aviadenovirus* é um vírus DNA de fita dupla, não envelopado, que pode ser classificado em três grupos (I, II e III). O *Aviadenovirus* do grupo III (ADVIII) é responsável pela EDS-76 e é o único representante do grupo capaz de aglutinar eritrócitos de aves. Os *Aviadenovirus* do grupo I já foram isolados em perus e em casos de esplenomegalia em faisões. O ADVIII, como os demais *Adenovirus*, é relativamente resistente ao meio ambiente e aos desinfetantes comumente utilizados, como amônia quaternária e glutaraldeído. Podem resistir ao congelamento, a ácidos fracos e a solventes lipídicos, mas são sensíveis ao aquecimento a 56°C por 10 minutos^[2,5].

Alguns autores descrevem que a EDS-76 teve origem em patos, sendo a adaptação do vírus em galinhas decorrente da contaminação de fibroblastos de embrião de patos utilizados na fabricação da vacina de Marek, destinada à vacinação de galinhas^[2,3,4].

Inicialmente, a replicação do vírus ocorre na mucosa nasal, é seguida de viremia, atinge os tecidos linfoides, principalmente o timo, replica-se, faz uma nova viremia e invade o infundíbulo e a glândula da casca, onde induz intensa produção de exsudato inflamatório e consequente diminuição da qualidade da casca do ovo. O ADVIII não se multiplica no intestino, mas está presente nas fezes, possivelmente por conta da contaminação delas com exsudato do oviduto^[8].

Diagnóstico

Histórico de lote que não atinge o pico de postura, produção de ovos de baixa qualidade, com falta de pigmentação da casca, aumento na taxa de ovos sem casca e queda na produção são sugestivos de EDS. A confirmação do diagnóstico pode ser realizada pelo isolamento e identificação do agente viral^[9].

a) Epidemiologia

A transmissão do ADVIII ocorre tanto pela via horizontal como pela via vertical. A infecção horizontal, geralmente associada ao contato com material fecal contaminado, pode ocorrer em qualquer idade/fase, porém de forma muito lenta, principalmente em casos de aves alojadas em gaiolas.

Nos casos em que ocorre transmissão vertical, os pintinhos que nascem não apresentam sinais clínicos até o início da postura. Contudo, atuam como fonte de infecção e disseminação do vírus no ambiente. Atualmente a EDS-76 está sob controle como resultado da ampla utilização de vacinas e controles rigorosos de biosseguridade nos plantéis de avós, todavia patos e gansos atuam como reservatórios naturais do vírus sem apresentar clinicamente a doença^[4,8].

b) Sinais clínicos

O período de incubação do ADVIII varia de 4 a 17 dias, dependendo da fase em que ocorre a infecção. Em animais na fase de crescimento o período de incubação é mais longo que em animais na fase de produção.

Clinicamente as aves afetadas apresentam postura de ovos despigmentados, ovos com casca fina ou sem casca e queda na taxa de postura de 10% a 30 % durante um período de seis a oito semanas. Esses sinais são comuns em lotes infectados sem imunidade contra o vírus ou submetidos a condições de estresse. Lotes infectados após a 10^a semanas de idade não atingem o pico de postura e passam a apresentar alta incidência de alterações na casca do ovo. Em pintinhos a infecção resulta em aumento de mortalidade na primeira semana; já aves na fase de crescimento podem não manifestar sinais clínicos ou apresentar apenas um quadro leve de diarreia^[1,4,10].

c) Patologia

Na necropsia nem sempre há lesões evidentes. Quando presentes, se observa atrofia de oviduto e ovário, óvulos flácidos, ovos ectópicos e leve esplenomegalia. No exame histológico observa-se edema e intenso infiltrado inflamatório misto com predominância de heterófilos na lâmina própria do infundíbulo e do útero. A presença de corpúsculos de inclusão no epitélio do oviduto e na glândula da casca, apesar de nem sempre ocorrer, é uma lesão importante e indicativa de EDS-76^[8].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado mediante o isolamento e posterior identificação do ADVDIII em ovos embrionados de patos ou gansos. Também podem ser utilizadas culturas de células de embriões de patos e gansos ou células de fígado e rim de embriões de galinha. A replicação viral pode ser detectada pela morte embrionária ou pelo efeito citopático nos casos de culturas celulares. Mesmo assim, é imprescindível a utilização de ferramentas moleculares para detecção e caracterização viral. O AVDIII não se replica em ovos embrionados de galinhas nem em células de linhagem de mamíferos^[11].

Por ser um vírus com propriedade hemaglutinante, a utilização de testes sorológicos como HI (inibição da hemoaglutinação) torna-se eficiente para detectar a presença de anticorpos circulantes. Ensaios imunoenzimáticos, como o teste de ELISA, também podem ser utilizados, principalmente para monitoria da resposta vacinal. Entretanto, não é eficiente para verificar se o lote é negativo, pois são comuns reações falso-positivas. Ensaios baseados na PCR também podem ser utilizados nas rotinas de diagnóstico, apresentando alta sensibilidade e especificidade^[4,6].

e) Diagnóstico diferencial

É imprescindível diferenciar EDS de outras doenças que afetam a produção de ovos, como Newcastle, bronquite infecciosa, influenza aviária e doenças nutricionais^[1].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento viral, coletar ovos de aves suspeitas ou que apresentam lesões no oviduto e baço e enviar ao laboratório de diagnóstico sob refrigeração de 2 a 8°C. Para o diagnóstico diferencial, obrigatoriamente, deve-se colher ovário, oviduto e baço para estudo histopatológico. Nesse caso, as amostras devem ser fixadas em solução de formalina a 10% tamponada.

Em se tratando de monitorias sorológicas de plantel ou de avaliação da soroconversão vacinal, colher sangue das aves sempre de forma aleatória no galpão. No caso de aves alojadas em gaiolas, coletar sangue de aves alojadas no início, meio e fim do galpão, sempre de um número representativo. Enviar ao laboratório 2 a 3ml de soro por ave, sob refrigeração. Em caso de lotes vacinados, encaminhar junto com as amostras de sangue o histórico de vacinação^[7,9].

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. Burke, C.N., Luginbuhl, R.E. & Williams, L.F. (1968). Avian adenolike viruses-characterization and comparison of seven isolates. **Avian Diseases**, 12, p. 483-505.
4. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
5. FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Editora: UFSM, Santa Maria, 2007. 769p.
6. HESS, M. Detection and differentiation of avian denoviruses: a review. **Avian Pathology**, 29, p. 195-206, 2000.
7. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
8. MCFERRAN, J. B.; CLARKE, J. K.; CONNOR, T. J. Serological classification of avian adenoviruses. **Archives of Virology**, v. 39, n. 1-3, p. 132-139, 1972.
9. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
10. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
11. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.

1.2.13 Orthoreovirus aviário

Ao *Orthoreovirus aviário* (ARV) estão associadas doenças que ocasionam perdas na avicultura atual. O ARV também é denominado reovírus aviário devido à primeira classificação, que foi *Respiratory Enteric Orphan*. O ARV está associado a duas manifestações clínicas nas aves, relacionadas com atrite viral e com a síndrome de má absorção. Nesta parte do capítulo serão abordadas as duas manifestações separadamente.

1.2.13.1 Artrite viral

Conceito

A artrite viral vem ganhando destaque na avicultura atual por agir de forma negativa na cadeia produtiva. Transtornos locomotores como artrites e tenossinovites infecciosas estão entre os principais problemas de origem sanitária que ocasionam redução no desempenho dos frangos e prejuízos no abate devidos às condenações. A artrite viral acomete inúmeras espécies de aves de interesse comercial, estando mundialmente difundida^[2].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é o *Orthoreovirus aviário* (ARV), membro da família *Reoviridae*, gênero *Orthoreovirus*. É um vírus RNA de fita dupla, não envelopado, e seu genoma viral pode ser separado em três classes, de acordo com o tamanho, em grande (large = L), médio (médium = M) e pequeno (small = S). A composição do genoma inclui três segmentos grandes (L1, L2 e L3), três segmentos médios (M1, M2 e M3) e quatro segmentos pequenos (S1, S2, S3 e S4).

O genoma viral codifica dez proteínas traduzidas a partir de diferentes segmentos genômicos. A classificação do ARV é baseada em sorologia e na patogenicidade. Até a atualidade foram descritos em aves 11 patotipos do vírus. Os mais comumente conhecidos são 2408, S1133 e 1733.

Desses, o S1133 está relacionado aos problemas de pernas (artrites e tenossinovites), o 2408 à síndrome da má absorção, e o 1733 a ambos os problemas (Tabela 9)^[3,7,9,12,14].

Tabela 9. Classificação do sorotípo do ARV

Patotípos	Associado	Patogenicidade
S1133	Artrite	Média
2408	Síndrome da má absorção, artrite	Alta
2035	Síndrome da má absorção, artrite	Média
2177	-	Não patogênico
1733	Síndrome da má absorção, artrite	Alta
C08	-	Não caracterizada
3005	Fragilidade óssea	Média

Os reovírus aviários não são limitados em suas lesões, sendo capaz de induzir a severas manifestações, além de tenossinovite e artrite, como distúrbios entéricos e respiratórios, hepatite, hidropericárdio, miocardite, pericardite e pancreatite^[19].

Inicialmente, o ARV multiplica-se na mucosa do trato digestivo. Após a viremia, o vírus replica-se nos tendões, nos tecidos linfoides, no oviduto, e persiste nas tonsilas cecais e nas articulações. O ARV apresenta tropismo e multiplica-se nos fibroblastos. A eliminação do vírus ocorre pelas fezes, sendo uma forma importante de disseminação. Uma vez introduzido em uma granja, pode persistir por um longo período. O vírus pode permanecer por períodos prolongados nas tonsilas cecais, nos tendões e nas articulações tibiotársicas. Os pintos recém-nascidos vão apresentar o vírus em diferentes órgãos, principalmente no fígado e no intestino, e vão transmitir, via fezes, para outras aves suscetíveis já na incubadora^[11,13].

As lesões entéricas, hepáticas e pancreáticas levam ao decréscimo das enzimas pancreáticas e a alterações no metabolismo no fígado, que, por sua vez, ocasionam má utilização dos nutrientes, podendo levar a doenças nutricionais secundárias e, quando somadas à infecção nos tendões, podem levar à osteoporose. Na tireoide ocorre um decréscimo na produção de tiroxina, pois já no 4º dia pós-infecção ocorre decréscimo na conversão de T4 para T3 no fígado, levando ao problema de crescimento. Nos ossos pode ocorrer diminuição da tibia, osteoporose e necrose da cabeça do fêmur pela menor deposição dos minerais. A tenossinovite é uma enfermidade típica de frangos de crescimento rápido, embora possa afetar frangas de reposição para postura e pode ser potencializada pela baixa qualidade da bainha de revestimento dos tendões nas aves pesadas^[1,8,12,15,16].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de ARV pode ser feito com base nas lesões, nos sinais clínicos e no histórico do lote. A confirmação do diagnóstico é realizada por isolamento e identificação viral em ovos embrionados ou pela técnica molecular (RT-PCR). Testes sorológicos, como precipitação em ágar gel, virusneutralização ou teste de ELISA, também podem ser usados.

a) Epidemiologia

A transmissão ocorre tanto pela via vertical como pela via horizontal. A transmissão pela via vertical pode ocorrer por um período longo, quando as reprodutoras não possuem imunidade

suficiente ou não são vacinadas. As aves podem ser infectadas na produção e transmitir o vírus à progênie. Essas aves infectadas podem não apresentar sintomas, o que dificulta o diagnóstico. A excreção viral nesse caso pode durar até 3 meses. A transmissão horizontal pode ocorrer de forma direta ou indireta. As aves jovens são mais suscetíveis do que as aves adultas e quando infectadas transmitem horizontalmente o vírus por um período mais prolongado. A susceptibilidade à doença diminui de forma linear conforme a idade aumenta. Entretanto, essa resistência se torna menor quando o vírus é inoculado diretamente no local, através de feridas ou lesões nos coxins plantares (deficiência no manejo da cama)^[2,11,12].

A morbidade pode ser alta, podendo atingir 100%. Já a mortalidade é de 6%, e em alguns casos pode chegar a 10%. O ARV é resistentes ao calor, capaz de resistir a 60°C por 8 a 10 horas, 56°C por 22 a 24 horas, a 37°C por 15 semanas e a -20° por 4 semanas. Também é resistente ao pH 3, à formalina a 3%, entretanto é inativado por etanol a 70%, clorofórmio e iodo orgânico a 0,5%^[15].

b) Sinais clínicos

O período de incubação está diretamente relacionado à porta de entrada do ARV, ao patótipo viral envolvido e à idade da ave, variando de 7 a 11 dias. Quando ocorre inoculação via coxim plantar, o período de incubação pode ser de apenas 1 dia^[13].

Clinicamente, as aves acometidas pelo ARV podem apresentar um aumento no volume dos membros pélvicos unilateral ou bilateralmente, principalmente na articulação tibia-tarso com o metatarso. Com o progresso da doença os frangos acometidos apresentam severa dificuldade de locomoção por conta da inflamação causada pela artrite e pela sinovite. As aves com lesões apoiam-se no tarso, caracterizando um quadro denominado “perda de pernas”. Em casos mais severos, pode de haver ruptura do tendão gastrocnêmico. Observa-se, também, edema do tendão flexor digital. Em frangos de corte pode ocorrer redução no ganho de peso e piora da conversão alimentar.

A infecção por ARV pode ocorrer também na forma subclínica. A presença de outros agentes infecciosos, como *E. coli*, podem agravar o quadro de artrite e aumentar consideravelmente a mortalidade^[1,2,11,18,19].

c) Patologia

Macroscopicamente, observa-se inchaço nos tendões e nas articulações, podendo haver ruptura do tendão gastrocnêmico. A articulação pode conter pequena quantia de exsudato amarelo ou tingido de sangue, e em alguns casos pode ter exsudato purulento. Hemorragias puntiformes (petéquias) podem ser observadas nas membranas sinoviais. Pequenas erosões desenvolvem-se na cartilagem articular distal do tibio-társica^[4,15,18].

No exame histopatológico é possível observar, nas articulações e áreas adjacentes, edema, necrose coagulativa, acúmulo de heterófilos, infiltrados perivasculares de linfócitos e mononucleares. Observa-se formação de projeções vilosas na membrana sinovial devida à hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais, infiltrados de linfócitos e macrófagos na cavidade sinovial. Periostite ocorre pelo desenvolvimento de osteoclastos. Proliferação de tecido conjuntivo, formação de folículos linfoides e hiperplasia das células da membrana sinovial caracterizam a fase de cronização do processo articular. Há invasão de tecido fibroso sobre os tendões, resultando numa fibrose crônica e, consequentemente, instalação de metaplasia óssea e anquilose, além de imobilização do membro afetado.

O tropismo do ARV e sua capacidade de replicação em fibroblastos explicariam a continuidade das lesões observadas nos tendões nas fases crônicas da doença, na qual há intensa fibroplasia com substituição do tecido tendíneo por fibrose. Erosões na cartilagem articular são acompanhadas por um *pannus* de granulação, havendo atividade osteoblástica que produz áreas de oste-

oneogênese. No fígado pode observar-se necrose hepática focal, vacuolização e regeneração de hepatócitos e infiltração linfoide^[11,15,18,19].

d) Diagnóstico laboratorial

A confirmação do diagnóstico pode ser feita pelo isolamento viral em ovos embrionados, provocando morte embrionária entre o terceiro e o quarto dia após a inoculação. Técnicas moleculares, como RT-PCR, atualmente estão sendo utilizadas para diagnóstico definitivo do ARV por ser de resultados mais rápidos. Testes sorológicos como precipitação em ágar gel, virusneutralização ou teste de ELISA também podem ser utilizados para fins de monitoramento. A patogenicidade das amostras pode ser determinada inoculando-se o vírus no coxim plantar de pintos SPF de 1 dia de idade. Amostras mais patogênicas induzem a intensa reação inflamatória 72 horas após a inoculação^[5,7,13].

e) Diagnóstico diferencial

Realizar o diagnóstico diferencial de outros agentes causadores de artrite ou problemas locomotores, como *Mycoplasmas synovirar*, *Staphylococcus* sp., *E. coli*., doença de Marek, erisipela e deformidade de pernas por erros de manejo e nutrição^[1,2].

1.2.14 Síndrome da má absorção

1.2.14.1 Malabsorption syndrome

Conceito e patogenia

A síndrome da má absorção (SMA) ocorre principalmente em frangos de corte e perus causando atraso no crescimento. A SMA ocorre em frangos de corte entre 1 e 3 semanas de idade, podendo ocorrer também em frangas de postura em crescimento.

A multiplicação viral ocorre no trato digestivo, provocando lesões entéricas e no pâncreas, que ocasionam decréscimo das enzimas pancreáticas e alterações no metabolismo no fígado. Essas alterações causam má utilização dos nutrientes. No pâncreas ocorre atrofia e fibrose com decréscimo da produção de enzimas. No intestino ocorre a atrofia das vilosidades com formação de cavidades císticas e infiltração de linfócitos, o que leva a uma má absorção dos nutrientes. No fígado, ocorre necrose hepática focal, vacuolização e regeneração de hepatócitos e infiltração linfoide, alterando o metabolismo. No pró-ventrículo, alargamento com espessamento das paredes, dilatação das glândulas e infiltração linfoide. Na corrente sanguínea se observa menor nível de carotenoides, vitamina A, D e E e aumento da fosfatase alcalina^[1,10].

a) Sinais clínicos

As principais manifestações clínicas apresentadas são: má absorção dos alimentos, redução do crescimento, desuniformidade do lote, despigmentação, alimento não digerido nas fezes, empastamento da cloaca, empenamento anormal, aumento da mortalidade e, em alguns casos, osteoporose. Em alguns casos, os pintinhos podem apresentar diarreia^[13].

b) Patologia

Macroscopicamente, observa-se proventriculite com focos de necrose ou hemorragia, necrose na cabeça do fêmur, fragilidade óssea, enterite catarral, paredes intestinais finas com flacidez, e atrofia do pâncreas e da bolsa de Fabricius. Pode-se apresentar, também, artrite e tenossinovite. As alterações histopatológicas observadas são: atrofia das vilosidades intestinais e da bolsa de Fabricius, proventriculite, miocardite com infiltrados de heterófilos e pancreatite. No fígado se observa degeneração vacuolar e necrose devidas à multiplicação do ARV nos hepatócitos^[17].

c) Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de ARV pode ser feito com base nas lesões, nos sinais clínicos e no histórico do lote. O diagnóstico definitivo é pelo isolamento e identificação do agente ARV, já descrito anteriormente.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais (*Orthoreovirus aviário*)

Para fins de isolamento viral, coletar membrana sinovial, tendões e medula óssea, convenientemente tratados com antibiótico. Para a técnica de RT-PCR, coletar tendões e acondicionar sob congelamento. Para exame histopatológico, coletar articulações, coração, fígado, baço, proventrículo e bolsa de Fabricius, fixados em formalina a 10%. Para exames sorológicos, coletar amostras de sangue/soro, e sempre encaminhar o histórico de vacinação, quando houver^[6,13]

Referências bibliográficas

1. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
2. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
3. CHIU, C.J.; LEE, L.H. Cloning and nucleotide sequencing of the S4 genome segment of avian reovirus S1133. **Archives of Virolog.**, 1997, v. 142, p. 2515-2520.
4. HERENDA, D.C.; FRANCO, D.A. **Poultry Diseases and meat Hygiene**. Ames: Iowa State University Press, 1996. 337p.
5. HUNG, L. et al. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, v. 33, p. 171-180, 2004.
6. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
7. LIU, H.J.; LEE, L.H.; HSU, H.W.; KUO, L.C.; LIAO, M.H. Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. **Virology**, 314, p. 336-349, 2003.
8. LIN, P.Y., LIU, H.J., YU, F.L., HSU, H.Y; LEE, J.W.; SHIH, W.L. Avian reovirus activates a novel proapoptotic signal by linking Src to p53. **Apoptosis**, 11, p. 2179-2193, 2006.
9. KANTA, A.; BALKB, F.; BORNB, L.; VAN ROOZELAARB, D.; HEIJMANSC, J.; GIELKENS, A.; TER HUURNE, A. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the σ C protein, **Vet. Res.**, p. 203-212, 2003.
10. KOUWENHOVEN, B., VERTOMMEN, M; GOREN, E. Investigations into the role of reovirus in the malabsorption syndrome, **Avian Pathology**, p. 879-892, 1988.
11. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Avária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.
12. ROBERTSON, M.D. & WILCOX, G.E. Avian reovirus. **Veterinary Bulletin**, n. 56, p. 155-174. 1986.
13. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
14. SHAPOURI, M.R.S. et al. Characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. **Avian Pathology**, London, v. 25, p. 57-67, 1996.
15. SHARPE, A. H.; FIELDS, B. N. Pathogenesis of viral infections. Basic concepts derived from the reovirus model. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 6, p. 486-497, 1985.
16. VAN DER HEIDE, L. The history of avian Reovirus. **Avian Dis.**, 44, p. 638-641, 2000.
17. VAN DER HEIDE L.; LÜTTICKEN D.; HORZINEK, M. Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis ("brittle bone disease", "femoral head necrosis") in broiler chickens, **Avian Dis.**, p. 847-856, 1981.

18. VASCONCELOS, S.B.S.; BOTTINO, J.A.; GUERRA, J.L.; JEREZ, J. Lesões articulares em frangos de cortes (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo reovírus aviário. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 2, p. 80-83, 2001.
19. VASCONCELOS, S.B.S.; BOTTINO, J.A.; GUERRA, J.L.; JEREZ, J.A. Lesões viscerais induzidas experimentalmente pela inoculação de uma amostra artrotrópica de reovírus em frangos de corte (*Gallus gallus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* São Paulo, v. 38, n. 2, p. 84-87, 2001.

1.3 Doenças fúngicas

1.3.1 Aspergilose

Conceito

A aspergilose é definida como uma doença respiratória micótica, usualmente denominada aspergilose pulmonar ou pneumonia micótica. Ela causa grande impacto econômico para o setor avícola mundial. As principais perdas associadas à doença são a redução no ganho de peso e o aumento no número de aves refugo^[1].

Etiologia e Patogênese

Os dois principais agentes etiológicos da aspergilose em aves são *Aspergillus fumigatus* (mais frequente) e *Aspergillus flavus*. O gênero *Aspergillus* spp. é formado por fungos saprófitas, aeróbios, de rápido crescimento, formadores de colônias. As aves são susceptíveis à infecção em qualquer idade, porém a frequência tem sido maior em aves jovens. As infecções por *A. fumigatus* ocorrem após a inalação dos esporos que, ao atingir as porções terminais da arvore brônquica, germinam e as hifas invadem os tecidos. Os principais fatores de virulência incluem a produção de proteases, como elastase, hemolisinas e gliotoxina, que causam ciliostase e inibem a fagocitose pelos macrófagos^[3,5,9].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo deve levar em consideração os sinais clínicos, a presença de lesões nodulares nos pulmões e o histórico de mortalidade no lote. O diagnóstico definitivo é realizado pelo exame micológico com isolamento e identificação do agente. Entretanto, deve-se considerar a presença de lesões histopatológicas para confirmar o envolvimento do agente no quadro clínico-patológico, haja vista a grande difusão do agente no ambiente pela característica saprofítica^[4].

a) Epidemiologia

Os *Aspergillus* spp. são fungos saprófitos encontrados facilmente no ambiente, na cama, no material vegetal em decomposição e no alimento. Fatores predisponentes como má ventilação, principalmente no inverno, estresse, consumo de cama e ração mofada estão relacionados com o aparecimento de aspergilose. Aparentemente, a cama é a principal fonte de infecção das aves em face da facilidade de disseminação dos esporos pelo ar. No ambiente da incubadora, a proliferação do fungo ocorre por falhas nos programas de limpeza e desinfecção, o que predispõe a multiplicação do fungo e a consequente disseminação dos esporos^[9].

A infecção das aves ocorre pela inalação dos esporos ou fragmentos de hifas tanto no ambiente da incubadora quanto no da granja. A incubadora é uma importante fonte de contaminação, geralmente associada a falhas no programa de biossegurança e contaminação das instalações e equipamentos, principalmente das máquinas de incubação e nascimento. Ovos sujos ou trincados são os maiores responsáveis pela introdução do fungo na incubadora. Os *Aspergillus* spp. podem

atravessar a casca do ovo quando ocorre a retração do conteúdo interno para a formação da câmara de ar. Nesse caso, os esporos presentes nos ninhos ou no ambiente são sugados para dentro do ovo, podendo acarretar morte embrionária aos 15 a 17 dias de incubação, ou o ovo pode trincar e contaminar a máquina de incubação e nascimento. A infecção dos pintinhos também pode ocorrer nos primeiros dias se houver grande contaminação da cama^[1,3,4,6].

Condições ambientais propícias, como temperaturas altas, próximas a 30°C, e umidade na faixa de 70% a 80%, favorecem o crescimento dos *Aspergillus* spp. tanto em granjas como no interior da incubadora^[5,11].

b) Sinais clínicos

O período de incubação da doença é de aproximadamente 48 horas. Em alguns casos as aves podem morrer em 24 horas. A aspergilose caracteriza-se por apresentar duas formas clínicas: uma aguda e uma crônica. A forma aguda é caracterizada por severos surtos com alta morbidade e mortalidade, principalmente em aves jovens. As aves apresentam maior suscetibilidade nas duas primeiras semanas de vida, tornando-se mais resistentes à infecção na idade adulta. A forma crônica é mais rara e é mais comum em aves mais velhas. Nesse caso, a morbidade e a mortalidade são baixas^[2].

A doença pode apresentar-se sob as formas pulmonar, nervosa ou ocular. A forma mais clássica da doença é a aspergilose pulmonar, podendo causar, dependendo do grau de infecção, alta taxa de mortalidade, chegando a mais de 50% do lote no caso de pintinhos nas primeiras semanas^[7]. A dificuldade respiratória é o primeiro e o principal sinal clínico da aspergilose. As aves apresentam sonolência, prostração, inapetência e polidipsia. Uma importante consequência da aspergilose pulmonar em aves que sobrevivem é a ocorrência de ascite devida a lesões pulmonares, com consequente hipertensão pulmonar e falha no ventrículo direito^[11,12].

Na aspergilose nervosa, as aves apresentam encefalite ou meningoencefalite, que se manifesta através de um quadro de incoordenação e torcicolo. Esses sinais podem aparecer posteriormente à aspergilose pulmonar pela disseminação dos fungos via corrente sanguínea^[10]. A aspergilose ocular, ou oftalmite, geralmente é unilateral e caracteriza-se pela presença de exsudato caseoso sobre a conjuntiva e nas áreas externas com a formação de placas na terceira pálpebra. Esse quadro normalmente é consequência da forma respiratória^[4,11]. Aves adultas e, principalmente, perus podem apresentar dificuldade respiratória, perda de apetite, perda de peso e mortalidade^[3,5].

c) Patologia

Os principais achados na necropsia são nódulos caseosos esbranquiçados nos pulmões e sacos aéreos, e em alguns casos existe a presença de exsudato caseoso na traqueia. A presença de nódulos branco-amarelados no cérebro, bem como lesões oculares unilaterais, como leve opacidade até cegueira total, também pode acontecer^[2,3]. Nos casos agudos, principalmente em pintinhos, as lesões normalmente estão ausentes.

No exame histopatológico se observam lesões pulmonares e na traqueia essas lesões são caracterizadas por áreas de necrose, intenso infiltrado linfo-histiocitário com a presença de células gigantes e estruturas fúngicas nas áreas de necrose. No cérebro, podem-se observar centros necróticos com intenso infiltrado heterofílico rodeado por células gigantes^[4,9,12].

d) Diagnóstico laboratorial

Para o cultivo e isolamento do *Aspergillus* spp. pode ser usado ágar Sabouraud, ágar Czapek, ágar sangue ou ágar batata. O cultivo deve ser realizado a 27 e 37°C. O crescimento de colônias características ocorre em 48 horas, e em alguns casos até em 24 horas. Entretanto, devem-se aguardar no mínimo sete dias para descarte de amostras^[5].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve considerar as diferentes doenças respiratória, principalmente a infecção causada pelo *Mycoplasma gallisepticum*.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para isolamento do *Aspergillus* spp. os procedimentos de colheita de material devem ocorrer da forma mais asséptica possível para que não ocorra contaminação com fungos ambientais. Em casos de suspeita de aspergilose em pintinhos, deve-se encaminhar o animal inteiro “eutanasiado”, sob refrigeração, evitando, assim, a contaminação da amostra. Em caso de necropsia, os órgãos de eleição são pulmões e traqueia, que também devem ser acondicionados sob refrigeração a 4 a 8°C.

O exame micológico da cama do aviário e dos ninhos deve contemplar a coleta de amostras, de aproximadamente 200 a 400g, de diversos locais do galpão. Para o monitoramento de incubadoras, fazer exame da casca dos ovos coletando uma média de 20 ovos por lote^[8].

Para exame histopatológico, colher fragmentos de pulmão, traqueia e demais órgãos que apresentarem lesões, devendo estes ser fixados em solução de formalina a 10% tamponada.

Referências bibliográficas

1. ALOISI, G. Aspergilosis, una enfermedad ambiental. **Avicultura Profesional**, Santiago de Chile, Chile, v. 14, n. 2, p. 18-19, 1996.
2. AKAN, M.; HAZIROGLU, R; ILHAN, Z.; SAREYYPOGLU, B.; TUNCA, R. A case of aspergillosis in a breeder flock. **Avian Disease**, v. 46, n. 2, p. 497-501, 2002.
3. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
4. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
5. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
6. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiología Veterinaria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1999, 446p.
7. JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5. ed., London: WB Saunders. 2001.
8. JULIAN, R.J.; GORYO, M. Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. **Avian Pathol.**, v. 19, p. 643-654, 1990.
9. KOERICHH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
10. LIMA JÚNIOR, J.S. et al. Incidência de fungos na produção de pintos de corte de um dia de idade. **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 7 n. 1, p. 73-77, jan-abr, 2001.
11. PEDEN, W.M.; RHOADES, K.R. Pathogenicity Differences of Multiple Isolates of *Aspergillus fumigatus* in Turkeys. **Avian Diseases**. V.36, p. 537-542, 1992.
12. SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.
13. Tessari, E.N.C.; Cardoso, A.L.S.P.; Castro, A.G.M.; Kanashiro, A.M.I.; Zanatta, G.F. PRE-VALÊNCIA DE ASPERGILOSE PULMONAR EM PINTOS DE UM DIA DE IDADE. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 75-77, jan./mar., 2004.

1.3.2 Candidíase

Conceito

A candidíase é uma doença micótica causada por fungos do gênero *Candida* sp. Ela acomete várias espécies de animais, incluindo as aves, principalmente perus, que são mais suscetíveis à infecção do que as galinhas. A doença está associada a fatores pré-disponentes, como estresse e imunossupressão, e caracteriza-se pela formação de pseudomembranas ou placas diftéricas na mucosa do trato digestivo^[1,2].

Etiologia e Patogênese

A candidíase é uma micose que tem como agente etiológico o *Candida albicans*, um fungo que faz parte da microbiota entérica das aves. A *Candida albicans* é um fungo aeróbio obrigatório, que se cora como Gram-positivo e possui a parede celular formada por glicoproteínas, lipídios e quitina. *C. albicans* possui como principal fator de virulência enzimas peptidolíticas que atuam como fatores de patogênese facilitando a colonização dos tecidos. Esse desequilíbrio pode ocorrer por causa da imunossupressão, do estresse, do uso incorreto de antibióticos ou de mudanças no pH intestinal.

Candida albicans é bastante resistente às condições ambientais e à maioria dos desinfetantes à base de cloro e amônio quaternário. É destruído por aquecimento acima de 50°C e luz ultravioleta^[3,4].

Diagnóstico

O diagnóstico de *C. albicans* pode ser realizado com base nos sinais clínicos, nas lesões macroscópicas e na demonstração do agente em esfregaços/suaves da cavidade oral ou nas fezes. A confirmação requer o isolamento e a identificação do agente^[5,7].

a) Epidemiologia

A candidíase acomete principalmente aves jovens e mais raramente aves adultas. A infecção ocorre pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados. Os principais fatores predisponentes são parasitismo, imunossupressão, tratamento prolongado com antibióticos e manejo sanitário deficiente^[3,8].

b) Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos são depressão, anorexia e piora na conversão alimentar. Em alguns casos o inglúvio pode estar dilatado, podendo ocorrer regurgitação devida a lesões presentes no trato digestório.

c) Patologia

Na necropsia se observam espessas placas necróticas esbranquiçadas ou amareladas, áreas de ulceração de intensidade variável e exsudato catarral mucoide ao longo do trato digestivo, mas principalmente no papo, na boca, no proventrículo e no ventrículo^[1,3,6].

Eventualmente, a candidíase pode causar lesões cutâneas, anormalidades no bico, necrose lingual, infecções cloacais e anais, lesões nos pés e infecções respiratórias^[1,3,6]. No exame histopatológico é possível observar estruturas arredondadas e ovaladas compatíveis com *C. albicans*, associadas a infiltrado inflamatório, predominantemente granulocítico^[1,3,6].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento da *C. albicans* pode ser realizado em ágar sangue, ágar Sabouraud com clorfenicol ou em ágar Mycosel. A incubação deve ser realizada a 35°C, e o crescimento acompanhado por um período de até 5 dias. As colônias possuem aspecto cremoso a pastoso^[2].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir tricomoníase,avitaminose A, micotoxicoses e boubavaria, cujas alterações macroscópicas podem ser confundidas com a candidíase³.

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

O isolamento da *C. albicans* pode ser conseguido a partir de lesões diftéricas presentes no trato digestório. A coleta deve ser realizada de forma extremamente asséptica devido ao risco de contaminação. Para minimizar os riscos de contaminação, pode-se fazer a coleta utilizando suabes.

Para o exame histopatológico, coletar fragmentos do trato digestivo que apresentam lesões, como papo, proventrículo e ventrículo. Os tecidos deve ser fixados em solução de formalina 10% tamponada^[6].

Referências bibliográficas

1. ARMISTEAD, W.; HENDERSON, J.A. **Manual Merke de veterinária**. EDITORA RODA, 2008. 2336p.
2. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
3. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
4. DWIGHT C.H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 446p.
5. ETTINGER, S.J; E.C.; **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 5. ed. 501p.
6. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
7. RUPLEY, E.A.; **Manual de Clínica Aviária**, São Paulo: Roca, 1999, 305p.
8. TSAI, S.S.; PARK, J.H.; HIRAI, K.; ITAKURA, C. (1992). Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. **Avian Pathology**, 21, 699-709.

1.4 Doença parasitária

1.4.1 Coccidiose

Conceito

A coccidiose é uma das doenças de maior importância econômica para a avicultura mundial, uma vez que causa severa redução no desempenho produtivo, piora na conversão alimentar pela diminuição na energia metabolizável, digestibilidade dos aminoácidos da dieta, aumento da mortalidade e elevados gastos com tratamentos^[3,14].

Etiologia e Patogênese

A coccidiose é uma doença entérica causada por um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Coccidia, família *Eimeriidae*, gênero *Eimeria*. Existem nove espécies de *Eime-*

ria que infectam galinhas, entretanto apenas *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* e *E. brunetti* são patogênicas^[8].

O protozoário, devido às características de parasito intracelular, invade as células epiteliais do intestino causando a lise celular e consequente comprometimento das funções de digestão e absorção na porção intestinal afetada^[7].

As aves se infectam ao ingerir os oocistos esporulados (forma infectante) presentes no ambiente, principalmente na cama. Esses oocistos são rompidos pela ação mecânica da moela, liberando quatro esporocistos. Por causa da ação da tripsina e de sais biliares, há liberação dos esporozoítos, que infectam os enterócitos. Cada esporozoíto origina um trofozoíto, que se transforma em esquizonte, dando origem ao processo de reprodução esquizogônica e aos gametas chamados merozoítos. Os merozoítos se diferenciam em gametas femininos e masculinos, dando início à fase sexuada, na qual os microgametas (gametas masculinos) se encontram com os macrogametas (gametas femininos) gerando um zigoto ou oocisto, que é liberado para a luz intestinal e eliminado para o meio externo juntamente com as fezes. Esses oocistos liberados com as fezes são chamados de oocistos imaturos e, para se tornar infectantes ao hospedeiro, necessitam sofrer esporulação. A esporulação dependerá de fatores predisponentes como umidade relativa do ar, em torno de 70% a 80%, e da temperatura entre 25 e 30°C. Nas condições adequadas, a esporulação pode ocorrer entre 24 e 48 horas^[4,5,7].

O período pré-patente é de 7 dias, podendo variar conforme a espécie de *Eimeria*. A coccidiose é autolimitante, pois a reprodução assexuada não continua indefinidamente, sendo produzidas duas a três gerações de merozoítos^[3,9].

Uma característica importante do ponto de vista epidemiológico é que não existe proteção cruzada entre as diferentes espécies de *Eimeria*, e, além disso, existe variação antigênica entre amostras da mesma espécie^[13].

Diagnóstico

O diagnóstico da coccidiose deve ser feito com base na combinação de achados de lesões no intestino e identificação de oocistos no raspado da mucosa intestinal ou nas fezes^[4]. Entretanto, a suspeita clínica pode ser levantada com base nos sinais clínicos, no histórico do lote e, principalmente, no escore das lesões, considerando características e localização. A localização das lesões nas diferentes porções intestinais permite presumir a espécie ou espécies de *Eimeria* envolvidas no surto da doença^[2].

a) Epidemiologia

Os protozoários do gênero *Eimeria* necessitam de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, que leva aproximadamente 4 a 6 dias e é constituído por duas fases: assexuada e sexuada^[2,7].

Os oocistos permanecem viáveis no ambiente por muito tempo devido à espessa parede com função de proteção. Os oocistos podem ser carreados de uma granja para outra por pessoas, equipamentos e veículos. Fatores como camas que passaram por vários lotes, alta umidade e calor facilitam a esporulação dos oocistos esporulados, que são a forma infectante do parasito. Devido ao sistema de criação, em poedeiras criadas em gaiolas é mais difícil ocorrer a infecção^[5,9,16].

Os índices de morbidade e mortalidade da doença podem ser extremamente altos dependendo da idade, do estado imunitário das aves, da espécie e do número de oocistos ingeridos^[3].

b) Sinais clínicos e Patologia

A eimeriose causa modificações estruturais nas vilosidades intestinais comprometendo as funções de digestão e absorção. Com a lise dos enterócitos ocorre, além do encurtamento das vi-

losidades, aumento na permeabilidade vascular com exsudação de eletrólitos e proteínas para o lúmen intestinal, desequilíbrio hidroeletrrolítico e, por consequência, má absorção^[4,5]. Devido à descamação e à presença de células imaturas, a função de digestão, dependendo do segmento intestinal afetado, pode estar comprometida. Também podem ocorrer hemorragias, queda no nível de proteínas plasmáticas, anemia e desidratação^[3,7,15].

As manifestações clínicas variam conforme a espécie de *Eimeria*. Em geral, aves infectadas apresentam penas arrepiadas, despigmentação da pele, desidratação, diarreia – que pode ser sanguinolenta –, redução do consumo alimentar, prostração, redução do crescimento, desuniformidade e mortalidade. A severidade da doença está relacionada à espécie de *Eimeria*, ao número de oocistos ingeridos, à idade das aves e à presença de outras doenças^[1,3,8].

A seguir estão descritas as principais características clínicas e lesões associadas à infecção pelas principais espécies patogênicas de *Eimeria* sp. para as aves.

E. acervulina: as lesões tendem a localizar-se no epitélio duodenal da porção anterior (Figura 3). As lesões apresentam características esbranquiçadas em forma de estrias transversais na mucosa intestinal. Dependendo da severidade da infecção, o conteúdo intestinal se torna liquefeito. As aves apresentam grande diminuição na absorção de nutrientes, carotenoides, fazendo com que a ave se torne pálida e tenha uma queda acentuada de desempenho. Raramente causa mortalidade. A *E. acervulina* possui um período pré-patente de 96 horas (4 dias) e é a espécie que mais produz oocistos^[7,17].

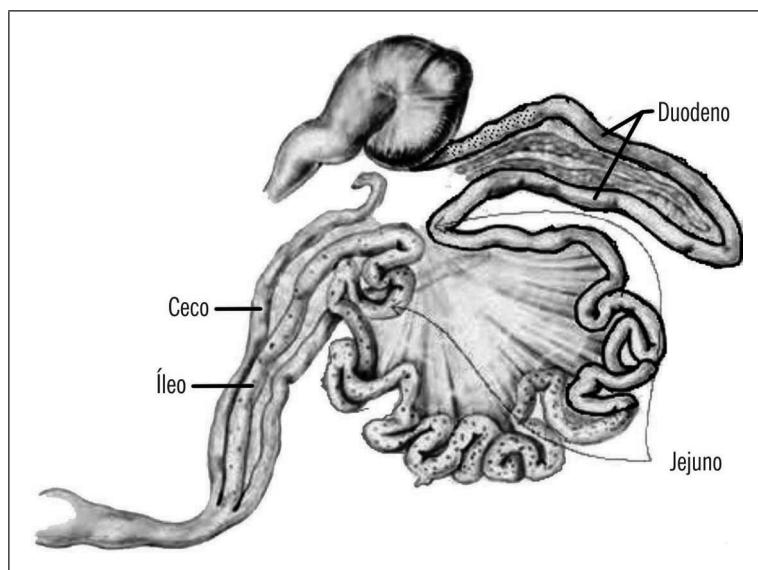


Figura 3. Localização característica das lesões causadas durante a infecção pela *E. acervulina*.

Fonte: Adaptado de Armistead e Henderson (2008)^[16].

E. maxima: atinge principalmente a região média do intestino delgado (jejuno) (Figura 4), podendo também promover lesões no duodeno e no íleo. As lesões se caracterizam por petéquias, espessamento da parede intestinal, descamação da mucosa e presença de conteúdo intestinal alaranjado. Clinicamente, as aves apresentam acentuada perda de peso, fezes de aspecto mucossanguinolento, podendo haver despigmentação das patas, pernas, cristas e barbelas. A presença de ração não digerida nas fezes ocorre devido à má absorção, geralmente mais grave durante a fase aguda da infecção, a qual varia de 4 a 9 dias. O período pré-patente é de 120 a 126 horas (5 dias)^[4,10].

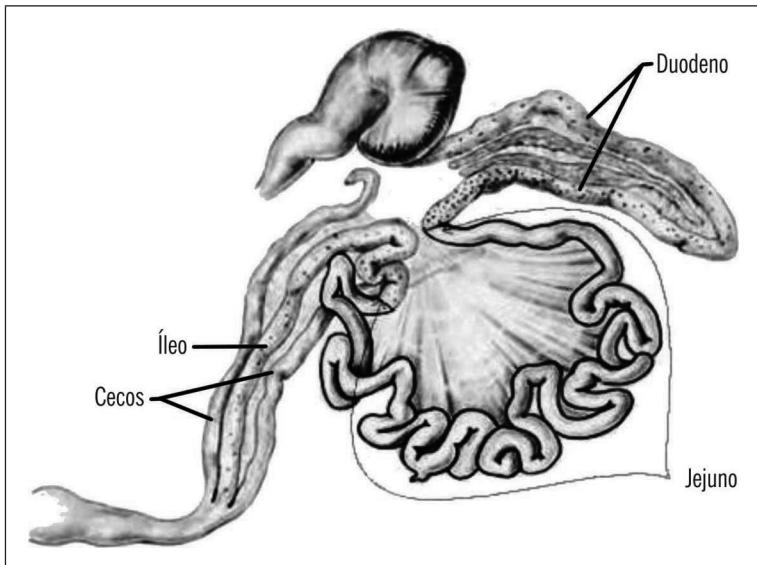


Figura 4. Localização característica das lesões causadas durante a infecção pela *E. maxima*.

Fonte: Adaptado de Armistead e Henderson (2008)^[16].

E. tenella: altamente patogênica, coloniza o ceco e os tecidos adjacentes (Figura 5), causando uma severa enterite, caracterizada por hemorragia, presença de sangue nas fezes, mortalidade e perda de peso. As lesões são caracterizadas por espessamento da parede cecal e presença de petéquias na serosa. Os cecos apresentam conteúdo sanguinolento em toda a extensão e lesões hemorrágicas na serosa. Nos casos avançados, o sangue presente nos cecos está coagulado, formando uma massa caseosa no local. O principal sinal clínico da infecção pela *E. tenella* é a presença de sangue vivo nas fezes. O período pré-patente é de 120 a 128 horas (5 dias)^[1,6,11].

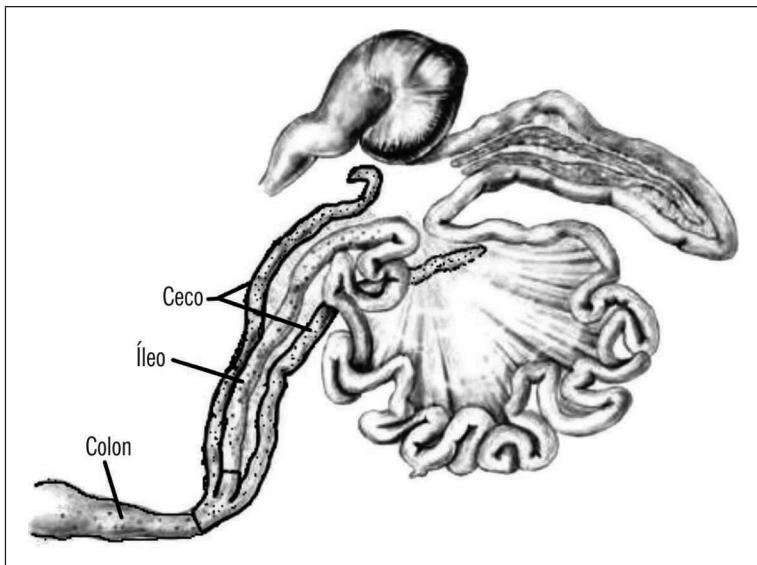


Figura 5. Localização característica das lesões causadas durante a infecção pela *E. tenella*.

Fonte: Adaptado de Armistead e Henderson (2008)^[16].

E. necatrix: é altamente patogênica e invade células do jejunum e do intestino delgado médio (Figura 6). Causa enterite severa, que cursa com alta mortalidade nas aves. Observam-se petéquias e pontos esbranquiçados na serosa intestinal, dando uma aparência salpicada, dilatação intestinal e pontos hemorrágicos na luz do jejunum e do íleo. As fezes podem apresentar-se com

sangue digerido, coloração escura e odor fétido. A *E. necatrix* é a eiméria menos frequente nos plantéis de frangos de corte. Isso provavelmente ocorre devido à migração obrigatória dos merozoítos da segunda geração para o ceco, o que expõe o parasito à ação dos medicamentos coccidioides ou coccidiostáticos^[5,17].

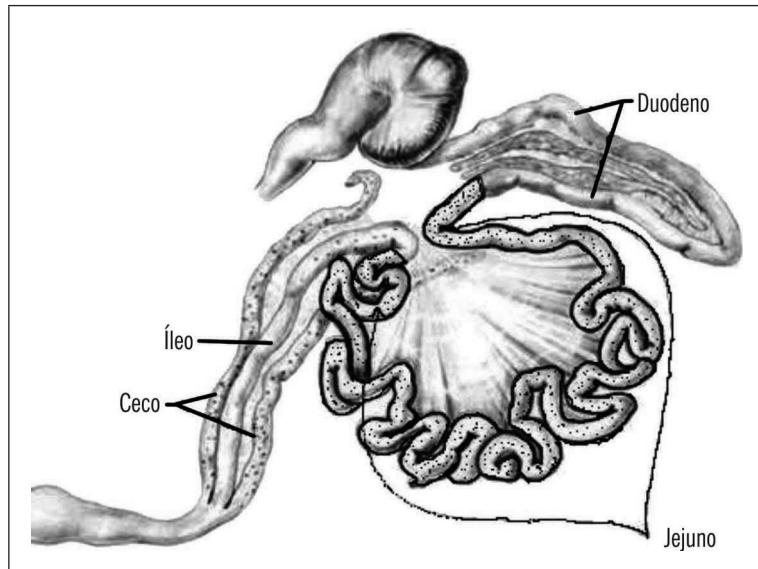


Figura 6. Localização característica das lesões causadas durante a infecção pela *E. necatrix*.

Fonte: Adaptado de Armistead e Henderson (2008)^[16].

E. brunetti: é encontrada na porção posterior do intestino delgado e no intestino grosso (Figura 7). Causa mortalidade moderada, perda de peso e piora na conversão alimentar. As lesões concentram-se principalmente na mucosa do íleo e reto, que apresentam espessamento, petéquias e, em alguns casos, necrose de coagulação. A superfície da mucosa apresenta aspecto difteroide^[17].

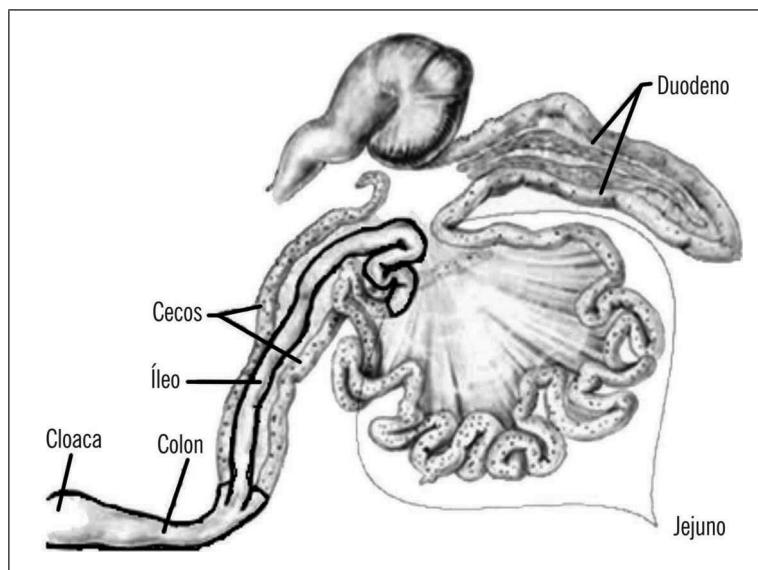


Figura 7. Localização *E. brunetti*.

Fonte: Adaptado de Armistead e Henderson (2008)^[16].

c) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da coccidiase pode ser realizado com o exame parasitológico das fezes, lesões e demonstração da *Eimeria* sp. na mucosa intestinal pelo exame histopatológico^[7].

d) Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial deve-se incluir, além das diferentes espécies de eimérias que acometem as aves, outras doenças que cursam com enterite, como enterite necrótica, enterite ulcerativa, micotoxicose, salmonelose, cólera crônica, helmintoses e intoxicações agudas^[8].

Colheita e remessa de materiais para exames laboratoriais

Para pesquisa de oocisto, coletar amostras de fezes frescas e acondicioná-las sob refrigeração. Para o exame histopatológico, coletar as porções afetadas do intestino e fixar em solução de formalina a 10% tamponada^[12,15].

Referências bibliográficas

1. Al-Sheikhly, F. & Al-Saieg, A. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Diseases**, 24, p. 324-333, 1979.
2. ALLEN P.C., FETTERER R.H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clin Microb Rev**, 15, p. 58-65, 2002.
3. BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.
4. BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.
5. CALNEK, B.W. **Enfermedades de las aves**, Manual Moderno. 2. ed. 2000. 1110p.
6. DANFORTH, H.D.; MCANDREW, S.J. Characterization of stage-specific and stage-cross-reactive antigens of *Eimeria tenella*. **Journal of Parasitology**, 73, p. 985-992, 1987.
7. DONAL P.; CONWAY, M.; MCKENZIE, E. **Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures**. 3. ed., Blackwell Publishing, 2007. 164p.
8. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed., São Paulo: Ícone, 1997. 686p.
9. HOERR, F.J. Pathogenesis of Enteric Diseases. **Poultry Science**, v. 77, p. 1150-1155, 1998.
10. IDRIS, A.B.; BOUNOUS, D.I.; GOODWIN, M.A.; BROWN, J.; KRUSHINSKIE, E.A. Quantitative pathology of small intestinal coccidiosis caused by *Eimeria maxima* in young broilers. **Avian Pathology**, 26, p. 731-747, 1997.
11. KARKHANIS, Y.D.; NOLLSTADT, K.A.; BHOGAL, B.S.; RAVINO, O.; PELLEGRINO, R.; CRANE, M.S.; MURRAY, P.K.; TURNER, M.J. Purification and characterization of a protective antigen from *Eimeria tenella*. **Infection and Immunity**, 59, p. 983-989, 1991.
12. KOERICH, P.K. et al. **Ave - Guia de Coleta e envio de materiais para Diagnóstico laboratorial**. New Print, 2007. 165p.
13. LILLEHOJ, H.S.; TROUT, J.M. **Coccidia**: a review of recent advances on immunity and vaccine development. **Avian Pathology**, 22, p. 3-31, 1993.
14. LILLEHOJ H.S.; LILLEHOJ E.P. **Avian coccidiosis**: a review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. Avian Dis., 44, p. 408-425, 2000.
15. ARMISTEAD, W.; HENDERSON, J.A. **The Merck Veterinary Manual**. Roca, 2008, 2336p.
16. PERMIN, A.; HANSEN, J.W. **Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites**. Roma: Food and Agriculture Organization/United Nations, 1998. 160p.
17. REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.

CAPÍTULO 7

DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS SUÍNOS

Álvaro Menin

Carolina Reck

Celso Pilati

Vagner Miranda Portes

INTRODUÇÃO

A relação parasito-hospedeiro-ambiente se apresenta através de uma interação complexa. Nesse contexto, a suinocultura moderna, fundamentada nos pilares da produção intensiva e do alto *status* sanitário, gerou mudanças na dinâmica dos fluxos e desafios infectoparasitários. O entendimento de como as doenças se manifestam e como as respectivas etiologias flutuam nas diferentes fases de produção é essencial para a implantação das estratégias de prevenção e controle.

O surgimento dos complexos infecciosos e infectoparasitários, decorrentes das adaptações dos patógenos e da ecologia da suinocultura, levara a alterações na expressão clínicopatológica e epidemiológica da maioria das enfermidades. O resultado do processo infeccioso passa a ser decorrente de uma relação multifatorial entre os agentes infectoparasitários e o suíno. A co-infecção ou a interação entre agentes infectoparasitários sempre deve ser considerada.

A manifestação clínicas através de síndromes, sequelas temporárias ou permanentes, flutuações de morbidade, mortalidade e suscetibilidade nas diferentes fases de produção, ou mesmo o silêncio clínico dos complexos patológicos, obrigam o profissional Médico Veterinário a uma constante atualização e formatação definir as melhores estratégias de diagnóstico, vigilância e controle das enfermidades.

Em muitas situações, a interpretação da dinâmica da infecção baseada na expressão clínica e patológica clássica pode gerar erros diagnósticos graves, visto que, não permite nas condições atuais, distinguir e discriminar as etiologias que estão realmente participando do desafio sanitário investigado. Nessas situações, o diagnóstico fidedigno é imprescindível e, como ferramenta, os

métodos laboratoriais têm um papel poderoso no estabelecimento rápido da relação de participação de cada agente no desafio sanitário.

Neste capítulo, abordaremos, de forma prática e dinâmica, as doenças infectoparasitárias mais prevalentes para suinocultura brasileira e as implicações associadas a seu diagnóstico.

1. PRINCIPAIS DOENÇAS BACTERIANAS DOS SUÍNOS

1.1 Brucelose suína

Conceito

A brucelose é uma doença infectocontagiosa, com caráter zoonótico, causada por bactérias intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella* spp. associada geralmente a quadros de abortos, placentite, epididimite e orquite. A brucelose é uma enfermidade de notificação obrigatória, com importante caráter zoonótico^[2,11].

Etiologia e Patogênese

B. suis (família *Brucellaceae*) possui como hospedeiro preferencial os suíno e hospedeiros secundários bovinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos e humanos^[4,8,9]. São bastonetes ou coccobacilos curtos, Gram-negativos, que medem 0,4 a 0,8 x 0,6 a 3µm, imóveis, não possuem flagelos e pseudocápsula. É um agente intracelular facultativo, com metabolismo aeróbio que crescem bem a 37°C em 2 a 7 dias. Todas as espécies e biovaras do gênero *Brucella* sp. produzem colônias de morfologia lisa (L), exceto *B. canis* e *B. ovis*, que possuem morfologia rugosa (R)^[1,7,8].

Os principais fatores de patogênese da *Brucella suis* são: parede celular com ação endotóxica e antifagocítica que, além permitir a evasão ao sistema complemento, induz à liberação de citocinas pró-inflamatórias pela ligação a células CD14; GMP-sintetase [*glutamine-hydrolyzing*], que inibe a fusão fagolisossoma; ligante Toll/NOD e sistema secretório tipo IV, que inibem a apoptose da célula infectada e a produção de TNF-α. Aparentemente o crescimento é estimulado no útero gravídico pelo aumento na produção de hormônios e fatores gestacionais^[7].

Inicialmente *B. suis* penetra no epitélio da mucosa e atinge a submucosa. Liga-se a receptores *Toll-like* (TLR), é internalizada pelos macrófagos e, devido à propriedade de evasão à fagocitose, pode sobreviver e se multiplicar no interior das células fagocíticas, sendo rapidamente transportada aos MALTs (*Mucosal association lymphoid tissue*) e linfonodos regionais^[7,9,11]. Em geral, uma a sete semanas após a infecção, produz a bacteremia, normalmente intermitente, que pode perdurar até 10 semanas. A partir da bacteremia, o agente coloniza o tecido linfoide, o fígado, o baço, os rins, a bexiga, as glândulas mamárias, as articulações e o trato reprodutivo de ambos os sexos. Nas fêmeas, invade placenta (sitio preferencial), retículo endoplasmático do trofoblasto coriônico e fetos, podendo causar aborto. Nos machos, invade testículos, epidídimos, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais.

As lesões nos machos, geralmente, são unilaterais, iniciando com hiperplasia, formação de abscesso e, no estágio final, esclerose e atrofia. A infecção normalmente é persistente por toda a vida, e o macho infectado pode eliminar *Brucella suis* no sêmen sem manifestar alterações na atividade sexual ou anormalidade no trato reprodutivo^[8,9,10]. Em ambos os sexos pode ocorrer migração do agente para articulações, causando artrite e, às vezes, espondilite com ocasional perda de posterior. Uma porção significativa de animais pode se recuperar da infecção em aproximadamente 6 meses. Entretanto, a maioria desenvolve a forma crônica permanente. A soroconversão ocorre em seis a oito semanas^[1,9].

B. suis, em condições de alta umidade, temperaturas baixas, e sem luz solar pode permanecer viável por vários meses, principalmente quando associada a água, fetos abortados, fezes, pa-

lha, feno, equipamentos e roupas^[11]. Pode suportar a dessecação e sobreviver na poeira ou no solo, principalmente quando há altas concentrações de material orgânico^[8].

Diagnóstico

A brucelose suína pode ser difícil de diagnóstico, devendo ser reconhecida como um problema coletivo em vez de uma enfermidade individual, principalmente quando endêmica, em que os sinais clínicos tornam-se sutis.

O diagnóstico definitivo da infecção por *Brucella* sp. pode ser realizado a partir de testes sorológicos, ensaios moleculares ou isolamento.

Considerando a necessidade de manter um nível sanitário controlado nas granjas de reprodutores de suídeos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Plano nacional de Sanidade Suídea (PNSS), que normatiza os programa de vigilância e controle de doenças consideradas de grande impacto, além da regulamentação de Granjas de Reprodutores Suídeos Certificada (GRSC)^[2].

a) Epidemiologia

Brucella suis se divide em 5 biótipos, ou sorovares, divididos de 1 a 5. Os sorovares 1, 2 e 3 afetam suínos. Os sorovares 1 e 3 se distribuem mundialmente e são os mais frequentemente associados à forma clássica de brucelose em suínos (*Sus scrofa domesticus*) e javalis (*Sus scrofa scrofa*). Os sorovares 2, 4 e 5 não são descritos no Brasil. Eventualmente, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis* e *B. neotomae* podem infectar os suínos, entretanto a infecção se mantém restrita aos linfonodos regionais no local de entrada, causando quadro conhecido como “brucelose linfoide”^[7,8,10].

Brucella suis é considerada um agente de importância para a saúde pública, dada a gravidade do quadro clínico em seres humanos e por ser considerada uma doença ocupacional para médicos-veterinários, trabalhadores de frigoríficos e pessoas ligadas aos manejos das granjas.

Nos suínos, *B. suis* está presente na placenta, nos líquidos fetais, nas secreções vaginais após um aborto ou no feto natimorto. A eliminação do agente através das descargas vaginais pode ocorrer por um período de 1 a 30 meses. A eliminação da bactéria através do sêmen também ocorre. Suínos de todas as idades podem infectar-se. A bacteremia inicial pode persistir por até 90 dias.

A transmissão do agente ocorre principalmente pela via venérea, através da cópula, ou por inseminação artificial, quando se utiliza sêmen de macho infectado. A via oral pela ingestão de água, alimentos contaminados por produtos do parto/aborto, excreções/descargas de animais doentes/portadores ou através da ingestão de fetos abortados ou membranas fetais também é importante. A infecção através da inalação, por meio da conjuntiva ou através da pele lesionada é rara.

Os leitões podem ser infectados durante a amamentação através do leite da porca, todavia os animais tornam-se mais suscetíveis a partir do inicio da puberdade (acima de 4 a 6 meses de idade)^[9,10].

A mortalidade é baixa em suínos, sendo considerada insignificante, exceto para fetos e recém-nascidos, mas a morbidade pode chegar a 80%^[9,10].

b) Sinais clínicos

Em suínos, o período de incubação do agente é variável e os sinais clínicos são pouco específicos. Na forma clássica da doença é possível observar sinais como: abortos em qualquer fase da gestação, com ou sem presença de corrimento vaginal purulento, nascimento de filhotes fracos ou natimortos, infertilidade e orquite^[8,9,11]. Em machos, as lesões são geralmente unilaterais. Inicialmente ocorre febre seguida de dor testicular, relutância para acasalar, anormalidades no esperma, epididimite e orquite. Os testículos podem tornar-se atrofiados durante os estágios finais da doença. Outros sinais clínicos menos comuns incluem paralisia posterior, espondilite, metrite e formação de abscessos em vários órgãos.

Após o aborto a fêmea pode adquirir imunidade ativa e restabelecer sua capacidade reprodutiva em dois ou três ciclos estrais^[8,10]. Nos machos a infecção tende a ser mais persistente, podendo levar a infertilidade temporária ou permanente^[1,11].

Em leitões lactentes e recém-desmamados (infectados verticalmente), a brucelose se manifesta clinicamente por espondilite, paralisia de posterior ou arrite. Os sinais clínicos normalmente são temporários, porém os leitões tornam-se portadores e podem transmitir para outros leitões no caso de reagrupamento^[10].

Javalis também podem excretar *B. suis* de forma assintomática no sêmen, e a esterilidade pode ser o único sinal de infecção^[11].

c) Patologia

A patologia da brucelose tende a ser muito variável. Nas fêmeas a característica mais evidente é o aborto. Depois de um aborto, a placenta pode apresentar-se edemaciada e hiperêmica, e o feto, com a presença de líquido hemorrágico no espaço peritoneal e nos tecidos subcutâneos. Às vezes, pode ocorrer metrite. No macho as lesões tendem a ser unilaterais. Inicialmente ocorre hiperplasia, que progride para esclerose seguida de atrofia dos testículos. Nos casos crônicos podem ser observados abscessos purulentos ou lesões inflamatórias nos testículos, no epidídimos e nas vesículas seminais^[9, 11].

No exame histológico frequentemente é possível observar lesão granulomatosa focal no fígado, glândulas uterinas com infiltrado leucocítico, hiperplasia do tecido conectivo periglandular e placentite purulenta com inflamação supurativa difusa^[7,9].

d) Ensaios laboratoriais

O isolamento e cultivo direto da *B. suis* é realizado (feto abortado, placenta, secreções vaginais, linfonodos mandibulares, gastro-hepáticos e ilíaco externo, epidídimos e abscessos)^[11]. A caracterização dos isolados deve levar em consideração as características da colônia, morfotintoriais e bioquímicas (Tabela 1)^[8,11]. A partir do cultivo, pode-se utilizar como teste complementar a prova de aglutinação para os抗ígenos A e M do LPS, permitindo classificar em isolados lisos ou rugosos.

Tabela 1. Principais características diferenciais das espécies do gênero *Brucella* sp.

Espécie/ Biovar	<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. suis</i> bv. 1	<i>B. suis</i> bv. 2	<i>B. suis</i> bv. 3
Hospedeiros preferenciais	Bovinos	Cães	Caprinos e ovinos	Ovinos	Suínos	Suínos	Suínos
Necessidade soro	-a	-	-	+	-	-	-
Tipo de colônia	L	R	L	R	L	L	L
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	-	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanina	+	-	+	v	v	-	v
L-Arabinose	+	-	-	-	+	+	-
L-Arginina	-	+	-	-	+	+	+
L-Asparagina	+	-	+	+	-	v	-

Espécie/ Biovar	<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. suis</i> bv. 1	<i>B. suis</i> bv. 2	<i>B. suis</i> bv. 3
Meso-Eritritol	+	v	+	-	+	+	+
D-Galactose	+	-	-	-	+	+	-
L-Ácido Glutâmico	+	+	+	+	v	+	+
L-Lisina	-	v	-	-	+	v	v
DL-Ornitina	-	+	-	-	+	+	+
D-Ribose	+	+	-	-	+	+	+
D-Xilose	-	-	-	-	+	v	v

Legenda: ^a *Brucella abortus* biótipo 2 requer geralmente soro para crescer no isolamento primário; v variável; (+) positivos; (-) negativo; (L) lisa; (R) rugosa.

Fonte: Adaptado de^[7,8,11].

Testes moleculares (PCR) podem ser aplicados para diferenciar espécies de *Brucella* sp. a partir de amostras puras (de cultivo) ou mesmo tecidos/fluidos^[3]. Entretanto, como limitante, essas técnicas não permitem a diferenciação de biovariedades, que deve ser realizada através da fagotipagem e/ou sorologia (Tabela 2)^[5,11].

Tabela 2. Principais características diferenciais espécies de *Brucella* spp.

Espécies de <i>Brucella</i> spp.	Biotipo	Aglutinação com soros monoespecíficos		
		A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	+	-
	2	+	-	-
	3	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	-	+	-
	5	-	+	-
<i>B. suis</i>	6	+	-	-
	9	-	+	-
	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
<i>B. neotomae</i>	4	+	+	-
	5	-	+	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+

Fonte: Adaptado de^[7,8,11].

As provas sorológicas são praticamente tão sensíveis quanto o isolamento da bactéria^[6,11]. Os testes sorológicos, particularmente aqueles que utilizam suspensão de bactérias totais como antígeno, manifestam seu princípio de atividade através da detecção de anticorpos específicos contra a cadeia lipopolissacarídica O do LPS, visto que a membrana externa das brucelas lisas é composta basicamente de fosfolipídios, proteínas e LPS.

Confome normatização do MAPA (PNSS), para triagem deve ser empregado o teste AAT e para o diagnóstico confirmatório o teste do 2-Mercaptoetanol (2ME) ou, ainda, teste de fixação do complemento (FC)^[5,11,12].

Nenhuma das provas sorológicas convencionais deve ser aplicada para o diagnóstico individual. Além disso, os resultados devem considerar que leitões com 2 a 3 meses de idade já são suscetíveis à infecção por *B. suis*, entretanto apresentam uma resposta imune (anticorpos aglutinantes) muito limitada; a reação cruzada devida à homologia de epítopos entre o antígeno O do LPS (A, M) brucélidos e *Yersinia enterocolitica* O:9 impede a distinção dos anticorpos para as duas infecções. Reações cruzadas com outros organismos, como *Salmonella urbana*, *Escherichia coli* O:116 ou O:157, *Pseudomonas maltophilia* também podem ocorrer^[5,11,12].

e) Diagnóstico diferencial

Outras doenças que causam aborto, orquite, artrite, paralisia posterior e claudicação devem ser consideradas. Em suínos o diagnóstico diferencial deve incluir uma série de outras doenças associadas a problemas reprodutivos, tais como PRRS (Síndrome Respiratória Reprodutiva Suína), leptospirose, parvovirose suína, doença de Aujeszky, peste suína clássica, peste suína africana; circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) e endometrite. Causas não infecciosas como: infertilidade estacional, intoxicação com zearalenona (estrogênica), altas temperaturas ($> 32^{\circ}\text{C}$), sprays à base de cresóis, dicumarol, excesso de nitratos, deficiência de vitamina A e de riboflavina e falhas de manejo também devem ser consideradas^[9,10,11].

Coleta e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os biovaras 1, 3 e 4 de *B. suis* são altamente patogênicos para o ser humano. Sendo assim, as amostras devem ser colhidas e tratadas com todas as precauções.

Uma variedade de amostras pode ser coletada para cultura, exame microscópico ou detecção do antígeno através de testes moleculares (PCR). Nesses casos, colher e remeter ao laboratório, suave vaginal, sêmen e amostras de sangue a partir de animais vivos, testículos após a castração, membranas fetais, suaves de descargas vaginais, placenta, fetos abortados (conteúdo estomacal, baço e pulmões) e leitões natimortos no caso de parto/aborto. Por ocasião da necropsia, colher e enviar para o diagnóstico laboratorial órgãos reprodutivos (útero, testículos, epidídimos, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais), baço, fígado, fragmentos dos gânglios linfáticos (mandibulares, gastro-hepático e ilíaco externo), líquido articular dos higromas, epidídimos, abscessos e útero. O material deve ser mantido sob refrigeração, podendo ser congelado se o tempo entre a coleta e o processamento ultrapassar 24 horas.

Exames sorológicos somente devem ser realizados em laboratórios credenciados pelo MAPA, neste caso enviar ao laboratório 3 a 5ml de soro sob refrigeração, devendo ser congelado se o período entre a coleta e processamento laboratorial ultrapassar 3 dias.

Referências bibliográficas

1. ALTON, G.G.. *Brucella suis*. In: **Animal Brucellosis**. NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds.). Boston: CRC Press, 1990. 267p.

2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1 de março de 2002, Seção 1, p. 3.
3. BRICKER, B.J. et al. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, p. 374-378, 2003.
4. CVETNIC, Z. et al. Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. **Acta Vet. Hung.**, v. 51, p. 465-473, 2003.
5. EWALT, D.R.; BRICKER, B.J. Identification and differentiation of *Brucella abortus* field and vaccine strains by BaSS-PCR. In: SACHES, K.; FREY, J. (Eds). **Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens**. Methods and Protocols. USA: Humana Press, v. 216p. 97-108, 2003.
6. FERRIS, R.A.; SCHOENBAUM, M.A.; CRAWFORD, R.P. Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of brucellosis in swine from naturally infected herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 207, p. 1332-1333, 1995.
7. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004, 456p.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004, 536p.
9. MACMILLAN, A.P. et al. Brucellosis. In: STRAW B.E. et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 603-612, 2006.
10. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs.). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007, 770p.
11. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.
12. WRATHALL, A.E. et al. Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. **Vet. Rec.**, v. 132, p. 449-454, 1983.

1.2 Colibacilose neonatal

Conceito

A colibacilose neonatal é a doença entérica mais frequente que afeta leitões lactentes na primeira semana de vida. Causada por cepas enterotoxigênicas de *Escherichia coli* (ETEC), caracteriza-se por um quadro de diarreia aquosa e profusa com grave desidratação.

Etiologia e Patogênese

E. coli (família *Enterobacteriaceae*) é um cocobacilo Gram-negativo, não esporulado, flagelado (flagelos peritíquios), geralmente móvel, fimbriada, que mede 3 μ m x 0,5 μ m^[5,8]. A caracterização e a tipificação antigênica são baseadas na expressão dos抗ígenos de superfície, como antígeno capsular (K), determinado por polissacarídeos capsulares; somático (O), porção polissacáridica do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana; flagelar (H), constituído por proteínas flagelares (flagelinas); e fimbrial (F), com proteínas fimbriais^[7]. O antígeno F caracterizado em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) está presente exclusivamente em isolados de animal, visto que nas cepas isoladas de humanos os fatores de adesão correlatos são denominados fatores antigênicos de colonização (CFA - *Colonization Factor Antigen*).

O potencial patogênico e a participação de cepas de ETEC na patogênese das infecções entéricas em suínos estão intimamente associados a sua capacidade de expressar fímbrias que pos-

sibilitam a colonização intestinal e uma ou mais enterotoxinas que induzem ao quadro de diarreia secretória.

A patogênese das ETEC nas infecções entéricas em suínos está intimamente associada a expressão de fatores de colonização (fimbrias) e produção de uma ou mais enterotoxinas. As fimbrias possibilitam a adesão/fixação da bactéria na mucosa intestinal mediante a ligação específica a receptores (glicoconjugados), situados na mucosa intestinal, principalmente, no jejun e íleo, evitando a expulsão pelo peristaltismo/trânsito intestinal^[5,7].

Os principais tipos fimbriais associados à ETEC que causam CN incluem F4+ ($F4_{ab}$, $F4_{ac}$ e $F4_{ad}$) F5+, F6+, F42+ (codificadas por plasmídeos) e F41+ (determinante cromossomal). Algumas cepas ainda produzem uma adesina envolvida na aderência difusa (AIDA)^[3,5,8,13]. Estudos realizados no Brasil demonstraram que a diarreia em leitões com até 21 dias de idade foi determinada principalmente por linhagens ETEC F5, F6, F42 e F41, e em leitões acima dos 25 dias, linhagens ETEC F4+^[5,12].

As enterotoxinas, geralmente são proteínas codificadas por plasmídeos. Dentre as principais enterotoxinas descritas estão a toxina termolábil LT (LTp-1), toxina termoestável (ST), e enterotoxina EAST 1. A toxina LTp-1 possui alto peso molecular, é altamente imunogênica, e é composta por duas subunidades, A (unidade ativadora) e B (unidade ligante de gangliosídeos). Essa toxina modula um descontrole do sistema adenilciclase da célula alvo, causando superprodução de AMPc, aumento da secreção de Cl⁻ pelas células para o lúmen intestinal e bloqueio da absorção de NaCl. Como consequência, há acúmulo de eletrólitos (cloro, sódio e bicarbonato) no lúmen intestinal^[5,6,9,11,14]. A toxina ST possui baixo peso molecular, é considerada não imunogênica e pode ser dividida em dois tipos: Sta e Stb.

A Sta afeta o sistema guanilciclase da célula alvo, alterando a síntese de GMPc, bloqueando a absorção de íons Cl⁻ e Na⁺, que passam a se acumular no lúmen. A Stb, por um processo de hipersecreção, também determina acúmulo de fluidos no lúmen. A enterotoxina EAST 1 (*enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1*) possui ação enterotoxigênica funcionalmente similar à toxina Sta, e também pode estar associada a quadros de diarreia em leitões, principalmente naqueles acima de 25 dias de idade. Em animais, tem importância quando é produzida por linhagens *E. coli* ETEC F4+ e F18+ e linhagens *E. coli* enteroagregativa (EAggEC)^[5,6,7,11,13,14,17].

A infecção dos leitões ocorre por via oral. A passagem da bactéria pelo estomago é facilitada pela RpoS (RNA polimerase que codifica proteínas - Fator σ) que conferem tolerância a acidez^[7]. As células bacterianas se ligam a receptores (glicoconjugados) presentes na superfície das células do epitélio intestinal através dos fatores de adesão (fimbrias). As linhagens F4+ colonizam principalmente a região anterior do jejun e, F5, F6, F41 e F42 na região posterior do jejun e íleo^[5]. Durante a multiplicação bacteriana (fase log) ocorre a produção de uma ou mais enterotoxinas (Sta, STb, LT e EAST1). As enterotoxinas alteram o fluxo secretório normal de água e eletrólitos através de um processo de hipersecreção combinado com a redução da absorção. Assim, fluidos e eletrólitos passam a ser transferidos das células das vilosidades para o lúmen intestinal, desencadeando um quadro de diarreia hipersecretória e desidratação. Como consequências ao quadro de diarreia podem ocorrer desidratação, hipovolemia, acidose metabólica e, em casos graves, hipercalemia e morte^[4,15].

No caso de *E. coli* (EAggEC), a fixação no intestino delgado inferior e cólon é mediada por uma intimina (tipo β1)^[13,14]. Nesse caso, a diarreia ocorre por má absorção e pela ação hipersecretória da EAST1^[14]. A adesão e agregação íntima aos enterócitos causam modificações no citoesqueleto e necrose dos enterócitos, retardando no desenvolvimento, fusão das vilosidades e redução da capacidade absortiva. Como consequência à hiperfunção secretória e à má absorção ocorre acúmulo de fluidos e eletrólitos na luz intestinal, causando o quadro de diarreia e desidratação.

No caso das cepas ETEC F4+, liga-se a sialoglicoproteína tipo mucina (IMTGP), e F18+ α1,2 fucosiltransferase (FUT)^[5].

A suscetibilidade dos suínos aos diferentes patotipos de ETEC é variada nas diferentes faixas etárias^[5,12]. Essa configuração de suscetibilidade é um reflexo da presença e disponibilidade de receptores na superfície do epitélio intestinal para os vários tipos de fimbrias. As linhagens de ETEC, F6, F5, F42 e F41 podem estar associadas a quadros entéricos em leitões até a segunda semana de vida. Isso ocorre porque, com o avançar da idade, a concentração de receptores na muco-sa intestinal diminuem ou são bloqueados por ligantes análogos presentes no conteúdo intestinal ou pelo glicocálice^[5,7,16].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo deve considerar, além dos dados clínico-epidemiológicos e da patologia, o isolamento e a caracterização do potencial virulento do isolado de *E. coli* envolvido na infecção. A frequência e gravidade da infecção estão diretamente influenciadas pelo nível de desafio ambiental (higiene, manejo, falta de vazio sanitário) e imunidade das matrizes, sendo mais comum sua ocorrência em leitegadas de primíparas.

a) Epidemiologia

A doença afeta principalmente leitões na primeira semana de vida, entretanto pode afetar leitões com até 21 dias de idade (colibacilose terceira semana)^[4,5]. Os principais fatores de risco ligados à ocorrência da doença são: deficiente imunidade passiva natural, desafio ambiental (contaminação ambiental), deficientes programas de limpeza e desinfecção, condições de ambiência para a matriz e os leitões, ocorrência de MMA ou hipogalaxia, deficiência de imunização das fêmeas e consequente desprovimento de imunidade passiva natural, mão de obra despreparada, baixo reflexo imunitário da fêmea ou dos leitões, baixo peso dos leitões ao nascer, e dificuldade de acesso ao colostro/leite e a água de qualidade^[4,15].

A infecção ocorre através da ingestão de material contaminado, primariamente material fecal da matriz ou presente no ambiente de lotes anteriores.

As taxas de mortalidade e morbidade são altas. Em geral, a mortalidade fica ao redor de 7%, podendo chegar a 100% em leitegadas não tratadas ou quando os fatores predisponentes não forem corrigidos. Infecções secundárias tendem a agravar o quadro e dificultar o diagnóstico e tratamento.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença se caracteriza por diarreia aquosa, profusa e amarelada que, frequentemente, resulta em severa desidratação e acidose metabólica 24 horas após o início dos sinais clínicos^[4]. Em quadros superagudos pode ocorrer a morte dos leitões sem a presença de sinais clínicos de diarreia.

c) Patologia

Apesar de os exames macroscópico e microscópico não revelarem lesões conclusivas da doença, durante a necropsia pode ser observado o intestino delgado com a parede flácida, segmentos repletos de gás e grande quantidade de conteúdo líquido de coloração amarelada. A porção terminal do intestino grosso normalmente se apresenta vazia devido à expulsão peristáltica. O exame histológico pode revelar bastonetes aderidos multifocal ou difusamente à superfície das vilosidades. Em impressões da mucosa do ileo coradas pelo Gram podem ser vistos numerosos bastonetes Gram-negativos aderidos.

d) Diagnóstico laboratorial

O cultivo bacteriológico e o isolamento da bactéria podem ser realizados por meio do isolamento do agente a partir do conteúdo intestinal coletado através de suabe retal (ampoula retal) ou do conteúdo das alças intestinais, principalmente ileo, obtidos a partir da necropsia. Entretanto, o diagnóstico definitivo só é obtido quando o isolada for caracterizado quanto ao seu potencial virulento, pois *E. coli* pode fazer parte da microbiota entérica.

A identificação do potencial patogênico pode ser realizada pela análise fenotípica (identificação de抗ígenos fimbriais) utilizando tipagem sorológica, testes de hidrofobicidade, adesão celular, micro-hemaglutinação e teste de ELISA ou análise genotípica para a detecção dos genes codificadores das fímbrias e enterotoxinas, através da multiplex-PCR, que permite identificar, em um único ensaio, vários determinantes de virulência^[2,6,18].

Quanto ao critério de hemólise, ETECs isoladas de leitões recém-nascidos podem ser hemolíticas ou não hemolíticas (Tabela 3). Em alguns casos, a característica hemolítica de determinadas linhagens pode ser usada para caracterizar potencial de virulência, pois, geralmente, o gene responsável pela expressão da F4+ está localizado no mesmo plasmídeo que alberga o gene determinante da hemólise. Entretanto, as linhagens de ETEC, F5, F6, F42 e F41 raramente são hemolíticas. Além disso, trabalhos recentes isolaram, de leitões recém-nascidos, com diarreia, linhagens de *E. coli* hemolíticas, mas sem patótipo definido.

Tabela 3. Características de isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) mais frequentemente associados com infecções em leitões de diferentes faixas etárias.

Patótipo	Característica			Idade do grupo afetado	
	Virotipo (Toxinas: fímbrias)	Sorogrupo O	Produção de hemolisinas	Neonatal	Desmamados
ETEC	STa:F5	8	—	Sim	Não
	STa:F5:F6	9	—	Sim	Não
	STa:F6	20	—	Sim	Não
	STa:F5	101	—	Sim	Não
	STa:F6	141	—	Sim	Não
	Sta: F5: F41	8,9,20,45,64	-	Sim	Não
	Sta F41	45,64	-	Sim	Não
	Sta: F 41	101,138	-	Sim	Não
	LT: STb: EAST1: F4	141,147	+	Sim	Não
	LT: STb: Sta: EAST:F4	149,157	+	Sim	Sim
	STb: EAST1: AIDA		-	Sim	Sim
	LT, STb ± STa:F4	8	+	Sim	Sim
	LT, STb ± STa:F4	149	+	Sim	Sim
	LT, STb ± STa:F4	157	+	Sim	Sim
	STa, STb ± Stx2e: F18ab:F18ac	138	+	Não	Sim
	STa, STb ± Stx2e: F18ab	139	+	Não	Sim
	STa, STb ± Stx2e: F18ac	141	+	Não	Sim
	STa, STb ± Stx2e: F18ac	157	+	Não	Sim

e) Diagnóstico diferencial

Deve-se proceder ao diagnóstico diferencial de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo C, TGE (Gastroenterite transmissível), diarreia por desnutrição (associada à MMA), infecção por *Clostridium difficile*, rotavirose e coccidiose suína (Tabela 4).

Tabela 4. Principais causas associadas à ocorrência de diarreia em leitões de acordo com a faixa etária e características de mortalidade.

Causa	Faixa etária (dias após o nascimento)				Taxa de mortalidade ^a
	Até 3	4 a 7	8 a 14	15 a 21	
MMA	X	X	X	X	Moderada
Clostridiose	X	X	X	-	Alta
Coccidiose suína	-	X	X	X	Baixa
Colibacilose neonatal	X	X	X	X	Moderada
Rotavirose	-	-	X	X	Baixa

^a As taxas de mortalidade podem variar de acordo com a presença de fatores predisponentes e situações específicas da situação clínica.

Coleta e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o exame bacteriológico, as amostras clínicas devem ser oriundas de leitões com sinais clínicos típicos da doença e que não tenham sido medicados com antimicrobianos. Em se tratando de animais vivos, deve-se colher material fecal do reto. Nesse caso, introduzir um suave na ampola retal, aproximadamente 2 a 5cm, procurando atritar na superfície da mucosa, garantindo que o algodão fique com a superfície recoberta por material fecal. Após a colheta, o suave deve ser novamente colocado no envelope.

No caso de necropsia, coletar fragmentos do jejun, íleo e cólon com aproximadamente 3 a 5cm. Nesse caso, é conveniente fazer ligaduras duplas (amarra) no segmento de interesse, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou “bolsa”). Em seguida, realizar incisões entre os pontos ligados, preservando o conteúdo intestinal.

Os segmentos intestinais ou os suaves destinados ao isolamento bacteriológico e detecção através da PCR devem ser armazenados e transportados refrigerados a uma temperatura de 2-8°C. No caso de amostras clínicas (fragmentos das alças intestinais) destinadas ao exame histopatológico ou técnicas de imuno-histoquímica, devem ser fixados em solução tamponada de formol a 10%.

Referências bibliográficas

- AN, H. et al. Distribution of a novel locus called *paa* (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 473, p. 179-184, 1999.
- BEAUDRY, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, 1996.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M.A. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol. Microbiol.*, v. 6, 1992.
- FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infections. In: STRAW B. E., et al. (Eds). *Diseases of Swine*. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 639-674, 2006.

5. FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **J. Swine Health Prod.**, v. 10, 2002.
6. FURRER, B.; CANDRIAN, U.; LU, J. Detection and identification of *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a DNA fragment. **Lett Appl Microbiol.**, v. 10, 1990.
7. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
8. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed., Blackwell Publishing, 2004. 536p.
9. IMBERECHTS, H. et al. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, **A. Infect. Immun.**, v. 60, 1992.
10. LECLERC, M. et al. Paa, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic E.coli. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 97-104, 2007.
11. LORTIE, L.A.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 3, 1991.
12. MENIN, Á. et al. Fenotipia de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia nas fases de maternidade, creche, crescimento e terminação. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 255-261. 2008.
13. NGELEKA, M., et al. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, 2003.
14. SAVARINO, S.J. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, 1993.
15. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs.). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.
16. OSEK, J. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. **Vet. Microbiol.**, v. 68, 1999.
17. SO, M.; MCCARTHY, B.J., Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, 1980.
18. WOODWARD, M.J.; CARROL, P.J.; WRAY, C. Detection of entero and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v. 31, 1992.

1.3 Colibacilose da terceira semana

Conceito

A colibacilose da terceira semana é uma enterite associada à infecção intestinal por cepas enterotoxigênicas de *Escherichia coli* (ETEC) e ocasionalmente cepas não enterotoxigênicas. A doença afeta leitões com idades entre 8 e 28 dias e cursa com diarreia de consistência cremosa a pastosa, de coloração amarelada, geralmente de pouca gravidade e com prognóstico favorável. A doença adquire maior gravidade quando há a presença de agentes ou condições secundárias ou concomitantes que podem agravar o quadro clínico.

Etiologia e Patogênese

A etiologia primária são isolados de ETEC F4+[^{2,3}], entretanto, a etiologia pode tornar-se complexa na medida em que outros agentes infecciosos, como *Isospora suis*, *Cryptosporidium parvum*, vírus da TGE, *Rotavírus* e PCV-2 podem estar associados, agravando o quadro e, principalmente, dificultando o diagnóstico e o tratamento^[5].

A infecção ocorre por via oral, podendo os leitões se infectar ainda no período de amamentação. Após a infecção, isolados de *ETEC* que expressam fatores de adesão (F4+) se ligam à mucina ou à sialoglicoproteína tipo mucina (IMTGP), podendo colonizar o intestino delgado, expressar suas toxinas, LT ou LT/EASTI e causar uma enterite^[2].

Diagnóstico

A diarreia da terceira semana, por ser uma doença que geralmente cursa com baixa a moderada gravidade, muitas vezes é negligenciada, acarretando perdas quase sempre não contabilizadas, mas com importante impacto no ganho de peso do leitão, na taxa de mortalidade e, consequentemente, no custo de produção. Nessas circunstâncias é imprescindível um monitoramento contínuo.

a) Epidemiologia

Em geral, a enfermidade cursa com significativa morbidade e baixa mortalidade. Entretanto, esse problema entérico tem aumentado muito nos últimos anos e sua ocorrência está diretamente associada a fatores como: estresse do desmame, desafio ambiental, manejo nutricional (rações de baixa qualidade/baixa digestibilidade, que podem gerar substratos não digeridos), maturidade fisiológica do trato gastrintestinal, adaptação à alimentação seca ou semisseca, desmame precoce, e presença de outros co-fatores infecciosos^[1,2,5].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, os animais manifestam diarreia amarelada de consistência pastosa a cremosa, abatimento, aderência de fezes na região do períneo e diferentes níveis de desidratação. A gravidade da doença e a morbidade são variáveis de acordo com a presença e intensidade dos fatores predisponentes^[1,4]. A mortalidade tende a ser baixa, não superior a 4%.

c) Patologia

As alterações anatomo-histopatológicas não são conclusivas para o diagnóstico da doença, entretanto é muito importante a realização do exame histopatológico pois auxilia no diagnóstico diferencial.

d) Diagnóstico laboratorial

Culturas puras ou praticamente puras podem ser obtidas a partir do exame bacteriológico de fezes retais, do conteúdo intestinal ou de segmentos intestinais, principalmente do íleo de leitões doentes conforme descrito em *Colibacilose neonatal*.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir outras causas infecciosas, como os agentes *Clostridium perfringens*, *Isospora suis*, *Cryptosporidium parvum* e *Rotavírus*. Fatores não infecciosos como estresse (flutuações bruscas de temperatura), práticas alimentares (má qualidade da alimentação seca), má higiene ou instalações inadequadas podem estar envolvidos.

Coleta e remessa amostras clínicas para exames laboratoriais

Os procedimentos de coleta são similares aos descritos para colibacilose neonatal.

Referências bibliográficas

1. FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infections. In: STRAW B. E., et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 639-674, 2006.
2. FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal Swine Health Production**, v. 10, n. 4, p. 171-175, 2002.
3. NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, EUA, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
4. ROMERO, A.M. et al. Bacteriano y parasitário de las diarreas en transición en Francia. **Anaporc. Revista de Porcinocultura**, n. 180, p. 5-30, 2001.
5. THOMSON, J. Etiología y control de las principales infecciones entéricas porcinas. **Información Veterinaria**, Espanha, v. 1, n. 224, p. 34-39, 2001.

1.4 Colibacilose pós-desmame

Conceito

A colibacilose pós-desmame se apresenta através de uma síndrome diarreica que afeta leitões desmamados. Em geral, as taxas de morbidade e mortalidade são elevadas, acima de 10%, tendendo a aumentar se os animais não são tratados adequadamente ou se não são corrigidos os fatores predisponentes.

Etiologia e Patogênese

A diarreia pós-demame é associada à infecção por cepas ETEC de *E. coli*, principalmente F4+ e F18+, produtoras de toxinas, LT (LTI e LTII), ST (STa ou STb)^[1,9]. Recentemente foi descrito outro patotípico de *E. coli* potencialmente patogênica denominado DAEC (diffusely adhering *E. coli*), que também pode estar associada a quadros de colibacilose pós-desmame. Essas cepas DAEC apresentam potencial genético para expressar fatores de adesão denominados AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*) e uma toxina EASTI^[1,2,3,4,6,8]. Normalmente, as cepas associadas aos quadros de colibacilose pós-desmame são hemolíticas e pertencem aos sorogrupos O: O8, O138, O141 e O157^[2,5,9].

A infecção dos leitões ocorre pela via oral, geralmente durante o período de amamentação. Entretanto, somente passam a desempenhar o caráter patogênico à medida que conseguem fazer adesão a receptores específicos do glicocálice (F4+ se adere a sialoglicoproteína tipo mucina - IMTGP) e F18+ a receptores α1,2 fucosiltransferase - FUT), que o animal passa a expressar, geralmente, após 25 dias de idade^[2,7]. Nessas condições, as cepas ETEC colonizam o intestino delgado e expressam toxinas como ST, LT ou LT/EASTI ou Stx2e^[1,2].

Diagnóstico

As lesões e sequelas determinadas pela doença podem ser temporárias ou permanentes, contudo as perdas associadas sempre impactam de forma grave sobre o desenvolvimento do leitão. O diagnóstico, apesar de obrigatoriamente considerar a avaliação epidemiológica e clínico-patológica, deve incluir exames laboratoriais confirmatórios.

a) Epidemiologia

Os principais fatores associados a colibacilose pós-desmame são o estresse da desmama, troca de alimentação, diminuição da imunidade passiva, baixa eficiência da imunidade ativa, rações de baixa digestibilidade, estresse térmico e desafio ambiental^[1,9]. É importante considerar, nessa fase, devido ao momento crítico da vida do leitão, a ocorrência de outras infecções associadas, que podem agravar o quadro clínico e determinar um aumento nas taxas de mortalidade e morbidade.

Dependendo da intensidade dos fatores de risco, sensibilidade do animal e virulência das cepas, a morbidade pode variar de 20% a 50%, e a mortalidade pode ser de 10%. Nesses casos, é de suma importância o diagnóstico definitivo da doença, a identificação e a correção dos fatores predisponentes e a instituição de um tratamento eficiente para os leitões doentes.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença caracteriza-se por diarreia aquosa a pastosa com coloração amarelo-acinzentada a amarelo-esverdeada e com pH alcalino, geralmente transitória^[1]. Os animais doentes apresentam perda de peso, abatimento, desidratação, refugagem^[2,9]. Nos casos mais graves, a morte pode ocorrer em menos de 24 horas. Nesse caso, observa-se desidratação grave e os animais podem apresentar as extremidades levemente cianóticas.

c) Patologia

Na necropsia não são identificadas lesões que possibilitem um diagnóstico conclusivo da doença. Em geral, observa-se desidratação grave, leve cianose das extremidades e congestão da mucosa do intestino delgado^[1,9]. No exame histológico podem ser observadas lesões de enterite catarral com hiperplasia das criptas e bastonetes aderidos de forma multifocal ou difusamente à superfície das vilosidades.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo deve considerar, além dos dados clínico-epidemiológicos e patológicos, o isolamento e a caracterização do potencial virulento do isolado de *E. coli*^[5]. Culturas puras ou praticamente puras são obtidas a partir de suabes retais ou do conteúdo de alças intestinais, preferencialmente do íleo.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial, devido a ampla faixa etária, deve contemplar infecção por *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*.

Coleta e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Preferencialmente, enviar amostras de leitões no início do quadro clínico não medicados, ver *colibacilose neonatal*.

Referências bibliográficas

1. FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infection. In: STRAW B. E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 639-674, 2006.
2. FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **J Swine Health Prod.**, v. 10, n4, 2002.

3. LAARMANN, S.; SCHMIDT, S.M. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. **Microbiology**, v. 149, p. 1871-1882, 2003.
4. LECLERC, M. et al. paa, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 97-104, 2007.
5. MENIN, Á. et al. Fenotipia de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia nas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n. 3, 2008.
6. NGELEKA, M. et al. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, 2003.
7. OSEK, J. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. **Vet. Microbiol.**, v. 68, 1999.
8. SAVARINO, S.J. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, 1993.
9. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs.). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.

1.5 Doença do edema

Conceito

A doença do edema (DE) é uma toxemia superaguda, de caráter infeccioso, causada por cepas toxigênicas de *Escherichia coli*. A DE manifesta-se na forma de surtos, com alta taxa de mortalidade, geralmente acometendo leitões uma a quatro semanas após a desmama ou com cinco a oito semanas de idade.

Etiologia e Patogênese

A doença do edema é causada por cepas de *E. coli* do patótipo EDEC (*Edema disease E. coli*). Vários virotipos e sorogrupos podem ser associados ao quadro de doença do edema ou diarreia pós-desmame (Tabela 5). As cepas de EDEC normalmente expressam fimbria F18, que, sorologicamente, podem ser divididas em F18ab (mais frequente) e F18ac. Além da capacidade de produção de hemolisinas (hemolíticas), as cepas EDEC produzem a toxina *Shiga-Like Toxin 2e* (Stx2e) (anteriormente denominada Verotoxina-2e [VT2e] devido à atividade citotóxica para células Vero)^[3,6,10,11]. A Stx2e é uma exotoxina, neurovasotoxina, bioativa, que causa lesões no endotélio vascular e, consequentemente, edema em tecidos.

Essa toxina é composta por duas subunidades: a subunidade B, responsável pela adesão às células do endotélio, e a subunidade A, bioativa, responsável pela inibição da síntese proteica eucariótica pela interação com a subunidade 60S ribossomal^[2,6,7]. A doença pode ser acompanhada de surtos de diarreia ou não^[1,4,11]. No caso de ocorrência de diarreia, frequentemente estão envolvidas de forma concomitante as cepas ETEC St2e⁺:F18⁺(ab;ac), cepas ETEC EASTI⁺:AINDA⁺, ou cepas ETEC ST/LT⁺:F4^{+[1,5,8,12]}. Os principais sorogrupos capazes de causar DE estão descrito na (Tabela 5)^[1,3].

Tabela 5. Principais patotipos, virotipos e sorogrupo O de isolados de *E. coli* associados a infecções em leitões no pós-desmame.

Doença	Patotipos	Virotipos	Sorogrupo O
Diarreia pós-desmame	ETEC	LT:STb:EAST1:F4	
		LT: STa:STb:EAST1:F4	
		STa:STb	
		STa:STb:Stx2e:F18ac	08; 038; 0139; 0141;
		STa:F18ac	0147; 0149; 0157
		LT: STb	
		STb:EAST1:AIDA	
Diarreia pós-desmame	EPEC	LT: STa:STb:EAST1:F4:AIDA: Stx2e:F18ac	
		AIDA:F18ac	
Doença do edema	EDEC	Stx2e:F18ab: AIDA	0138; 0139; 0141

A infecção dos animais ocorre através da via oral, pela ingestão de material contaminado, possivelmente ainda na fase da maternidade ou ainda por ocasião de reagrupamento no desmame. Entretanto, a doença somente vem a manifestar-se à medida que a bactéria encontra receptores específicos no glicocálice, que permitam sua adesão e colonização efetiva^[3,4].

O receptor para a fímbria F18+ (F18r) é a α1,2 fucosiltransferase (FUT), expresso principalmente na região do duodeno, por volta dos 28 dias de idade^[4,6]. Nessas condições, as cepas EDEC colonizam o intestino delgado e expressam exotoxinas como Stx2e e LT ou LT/EAST1. A toxina Stx2e é produzida na fase log da multiplicação bacteriana, absorvida pelos enterócitos, atinge a corrente sanguínea e causa danos à parede do endotélio vascular por ação degenerativa. Como consequência, ocorre edema perivascular. As lesões edematosas tendem a localizar-se em regiões definidas, principalmente submucosa do estômago, mesocolon, tecido subcutâneo e cérebro, possivelmente devido à presença de receptores para a respectiva toxina nesses tecidos^[1,2,5,7].

Diagnóstico

Devido ao caráter toxêmico agudo da doença é imprescindível um diagnóstico rápido e conclusivo da doença, considerando no diagnóstico diferencial de outras doenças que também cursam com toxemia, sinais nervosos graves e mortalidade.

a) Epidemiologia

A DE afeta primariamente leitões da fase de creche, com 5 a 12 semanas de idade, podendo, eventualmente afetar leitões mais velhos, da fase de crescimento e início da terminação, causando alta taxa de mortalidade, principalmente em animais com coinfeções virais imunossupressoras concomitantes, como circovírus suíno (PCV-2).

Os fatores de risco, a ocorrência e a gravidade da doença estão associados às condições que favorecem a colonização e a multiplicação das cepas ETEC, F18+ de *E. coli*, e incluem: estresse pelo desmame, troca de alimentação, rações de baixa digestibilidade ou hiperproteicas, estresse térmico, desmame precoce, baixa da imunidade passiva e ativa, co-infecções, superlotação, estresse social e expressão dos receptores F18r^[13].

A infecção ocorre por via oral, associada a fômites, alimentos e água contaminados, instalações deficientemente descontaminadas, contato com excreções de leitões portadores no reagrupamento^[1,6,14]. De modo geral, a morbidade varia de 10% a 40%, e a mortalidade de 8% a 100%, dependendo da rapidez do diagnóstico, dos manejos de correção dos fatores predisponentes e da eficiência do esquema de tratamento adotado.

b) Sinais clínicos

A doença tende a manifestar-se na forma de surtos, causando alta mortalidade. Os animais afetados apresentam apatia, anorexia, edema de pálpebras, orelhas, tecido subcutâneo frontal, lábios e nariz, dando aspecto de sonolento. Os animais passam a apresentar sinais nervosos, como incoordenação motora, paralisia, tremores, decúbito lateral, convulsões, movimentos de pedalagem que pode variar de dias a semanas, associados a um quadro de angiopatia cerebroespinhal degenerativa^[1,6].

Nas formas mais graves o quadro clínico evolui para coma e morte, que pode ocorrer de forma aguda ou mesmo súbita. Nesses casos, observa-se dispneia e respiração ruidosa devido ao edema do pulmão e da laringe. Nos quadros agudos a temperatura corporal tende a manter-se normal. Os animais podem recuperar-se lentamente em duas a três semanas, entretanto, geralmente tornam-se refugos. Os quadros de diarreia concomitante não são uma característica consistente, podendo ocorrer ou não, sendo geralmente associados a cepas do patótipo ETEC, produtoras de enterotoxinas (ST/LT/EAST1)^[3,4,11]. Neste caso a diarreia tende a ser aquosa, amarelada e fétida. Eventualmente, em estágios terminais, pode apresentar coágulos de sangue^[1].

c) Patologia

Na necropsia é possível observar edema subcutâneo nas pálpebras, no focinho, na região da frente, nas orelhas, nos lábios e na área inguinal; edema serogelatinoso na submucosa do estômago ao longo da curvatura maior e na região fúndica, no mesocôlon, no mesentério, linfonodos, na laringe (vocalização ruidosa), no pulmão, na cápsula renal e no rim^[1]. Em algumas áreas o edema pode assumir características sanguinolentas. Nas cavidades pleural, pericárdica e peritoneal frequentemente ocorre acúmulo de exsudato seroso^[9,14].

No exame histopatológico em geral é possível observar angiopatia degenerativa nas artérias e arteríolas, caracterizada por necrose fibrinoide; tumefação; e vacuolização endotelial. Pode ser observado ainda depósito de material fibrinoide na parede endotelial e edema perivasicular principalmente na submucosa do mesocôlon, estômago e encéfalo. Em casos mais graves é possível identificar encefalomacia focal, infiltrado eosinofílico^[1,6,14]. Nos casos superagudos, as lesões podem não ser evidentes.

d) Diagnóstico laboratorial

Culturas puras ou praticamente puras de *E. coli* hemolíticas são obtidas a partir alças intestinais (duodeno, jejuno e íleo) de leitões com sinais clínicos da doença^[10]. Porém em casos com curso ou recuperação mais demorado, o resultado negativo do exame bacteriológico não exclui o diagnóstico da doença do edema. O exame bacteriológico deve sempre contemplar também o sistema nervoso central para eliminar a participação de agentes causadores de encefalites e meningoencefalites.

A análise genotípica realizada através da multiplex-PCR permite amplificar e, consequentemente, identificar, em um único ensaio, os genes codificadores da fimbria F18 e da toxina Stx2e, identificando rapidamente cepas EDEC.

e) Diagnóstico diferencial

É fundamental incluir no diagnóstico diferencial microangiopatia dietética (deficiência de vitamina E/Se), encefalite viral (polioencefalomielite enteroviral), doença de Aujeszky, meningoencefalite (*Streptococcus suis*), doença de Glässer (*Haemophilus parasuis*), intoxicação arsenical, cloreto de sódio ou privação de água.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exame bacteriológico, no caso de necropsia, coletar amostras clínicas (fragmentos ou conteúdo do jejuno e íleo) na fase inicial da doença de leitões que não tenham sido medicados com antimicrobianos. Nesse caso, fazer ligaduras duplas (amarra) no segmento de interesse mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou “bolsa”). Em seguida, realizar incisões entre os pontos ligados, preservando o conteúdo da luz.

Paralelamente é importante que sejam coletados fragmentos de diferentes órgãos e tecidos para exame histopatológico para o diagnóstico diferencial. Nesses casos, o material deve ser conservado em solução tamponada de formol a 10%.

Referências bibliográficas

1. FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infection. In: STRAW B. E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 639-674, 2006.
2. FEKETE, P.Z. et al. Replicon typing of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhea and oedema disease. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 275-284, 2002.
3. FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal Swine Health Production**, v. 10, n. 4, p. 171-175, 2002.
4. GAASTRA, W.; GRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 129-161, 1982.
5. GRANGE, P.A. et al. Characterization of the carbohydrate moiety of intestinal mucin-type sialoglycoprotein receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1613-1621, 1998.
6. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 3. ed. Iowa: Blackwell, 2004. 456 p.
7. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
8. IMBERECHTS, H. et al. Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. **Vet. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 219-225, 1994.
9. JACOBSON, M. et al. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. **Research in Veterinary Science**, v. 74, p. 163-169, 2003.
10. LUDWIG, A.; GOEBEL, W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University, p. 281-329, 1997.
11. NATARO, J.P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, EUA, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
12. QUADRI, F. et al. Hemagglutination properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Clinical Microbiology**, EUA, v. 32, n. 2, p. 510-514, 1994.

13. RIPPINGER, P. et al. Designations Fl8ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhea and from oedema disease. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 281-295, 1995.
14. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs.). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.

1.6 Colite espiroquetal

Conceito

A colite espiroquetal (CE) é uma importante infecção do intestino grosso, principalmente do cólon, causada pela *Brachyspira pilosicoli*. A doença cursa com um quadro de diarreia aquosa ou fezes com aspecto de “cimento fresco” que acomete, frequentemente, leitões nas fases de crescimento ou terminação, entre 60 e 85 dias de idade.

Etiologia e Patogênese

B. pilosicoli (família *Spirochaetaceae*) é uma espiroqueta Gram-negativa, anaeróbia, móvel, fracamente hemolítica, com 6 a 11 µm de comprimento e 0,25 a 0,35 µm de largura, levemente espiraladas, com 4 a 7 flagelos periplasmáticos. À microscopia óptica apresentam-se como bastonetes delgados^[3,4,7,8,10].

O agente sobrevive muito bem no ambiente, podendo permanecer viável no solo por aproximadamente 119 dias e até 210 dias desde que na presença de fezes. São muito suscetíveis a desinfetantes comuns, todavia é importante considerar que a atividade da maioria desses princípios desinfetantes é reduzida na presença de matéria orgânica.

A bactéria tem sua atividade patogênica atribuída a fatores como quimiotaxia pela mucina; NADH oxidase, que permite sobreviver ao potencial de O₂; 4 a 7 flagelos periplasmáticos responsáveis por seu característico movimento serpentiforme semelhante a um saca-rolhas durante sua penetração no muco sobre o epitélio colônico; uma citotoxina/hemolisina com atividade citolína-serina protease (Tly) possibilita a invasão do espaço intercelular; o lipopolissacárido estrutural (LPS), que dificulta a ação do sistema complemento e induz a ativação pró-inflamatória pela formação do complexo CD14-LPS utilizando um receptor do tipo *Toll*^[3,4,5, 6,7,8, 16].

A infecção dos suínos ocorre por via oral pela ingestão de água ou ração, contaminadas com material fecal de animais infectados^[3,9]. A colonização depende da capacidade da bactéria de penetrar e se mover através do muco que recobre o glicocálice, presente na superfície apical dos enterócitos da mucosa intestinal, principalmente do cólon^[6,14,18]. A movimentação e a colonização da bactéria são facilitadas pela quimiotaxia desta pela mucina, presente no muco/glicocálice principalmente na mucosa do cólon e sem penetrar na célula, colonizam a superfície epitelial, formando uma falsa borda em escova (*false brush border*) na porção apical dos enterócitos, principalmente na porção apical nas vilosidades.

A adesão íntima à membrana dos enterócitos resulta em reorganização do citoesqueleto celular (membrana celular), perda de microvilosidades e um processo inflamatório focal, induzindo aumento na produção de muco pelas células caliciformes e edema local^[6,7,9]. Além disso, *B. pilosicoli* pode produzir uma citotoxina/subtilisina que possibilita a invasão do espaço intercelular e a diminuição da coesividade dos enterócitos, induzindo à descamação destes. As alterações morfológicas e fisiológicas do epitélio do intestino grosso determinam a perda de função dos enterócitos (diminuição da absorção e líquidos e ácidos graxos) e consequente diarreia por má absorção^[6,9].

Diagnóstico

Cada vez mais as diarreias em suínos tendem a ser resultado de uma dinâmica multifatorial de interação entre agentes enteropatogênicos e a presença de fatores estressores. Os diagnósticos devem considerar de forma cada vez mais frequente tanto a ação de agentes isolados como a associação de agentes ou os “complexos bacterianos enteropatogênicos” na patogênese das enterites em suínos^[15,19].

Devido ao caráter autolimitante ou mesmo subclínico o diagnóstico muitas vezes, é subestimado.

a) Epidemiologia

B. pilosicoli já foi isolada do trato gastrintestinal de humanos, suínos, primatas, cães, roedores, marsupiais e aves aquáticas. Em todas as espécies naturalmente infectadas é eminentemente a presença de lesões de tifocolite^[4,7,8,10]. Em suínos a presença do agente é descrita em rebanhos do mundo todo. Para os rebanhos brasileiros, envolvendo animais de crescimento e terminação, estima-se que a prevalência do agente seja acima de 40%^[15,18,19].

A doença afeta principalmente leitões nas fases de crescimento e terminação e, esporadicamente, fêmeas de reposição, causando redução na taxa de crescimento e na eficiência alimentar^[3,19]. A introdução do agente nas unidades de produção se dá basicamente pela introdução de animais portadores assintomáticos. A transmissão da *B. pilosicoli* entre os animais parece ocorrer, principalmente, pela via fecal-oral (de leitão para leitão pela ingestão de fezes, alimentos ou água contaminados) e o período de incubação da *B. pilosicoli* é de aproximadamente 3 a 20 dias^[7,9,17].

A mortalidade é baixa, contudo a morbidade pode ser alta, variando de 5% a 50%, dependendo da eficiência com que são realizadas as correções dos fatores predisponentes, e da rapidez e da eficiência de implantação do programa de antibioticoterapia.

Entre os principais fatores predisponentes que podem influenciar no aparecimento e na gravidade da doença destacam-se: desafio sanitário, troca brusca de dieta, formulações de dietas com altos índices de energia e proteína (14,5MJ ED/kg, 21% proteína), rações peletizadas, formulações com fontes de energia baseadas em gorduras/óleo; rações que contenham grande quantidade de cevada. Dietas ricas em polissacarídeos não amiláceos resultam em substratos no intestino grosso, que, aparentemente, facilita ou favorece a colonização pela *B. pilosicoli*^[6,14,17,19].

b) Sinais clínicos

Casos da doença são comumente observados imediatamente após o agrupamento dos animais na fase de crescimento^[15,19]. Clinicamente, os animais acometidos apresentam inapetência e diminuição no desempenho de crescimento, adquirem aparência esgalgada e, eventualmente, podem apresentar picos febris. As fezes apresentam-se pastosas, com aspecto mucoide, de cor acinzentada a esverdeada, com aspecto de “cimento fresco”, raramente com a presença de sangue. Com a evolução do quadro, as fezes tornam-se líquidas, com características de diarreia, que tende a ser transitória e autolimitante, cessando em 2 a 14 dias. Não menos importante, uma forma sub-clínica da doença também pode ocorrer. Nesse caso, o maior impacto está associado à perda do desempenho de crescimento dos animais^[9,17]. Infecções secundárias por *Salmonella* spp., e *Lawsonia intracellularis* podem agravar o quadro clínico e dificultar o diagnóstico.

c) Patologia

As lesões geralmente são limitadas ao ceco e ao cólon. Na necropsia, observa-se o ceco, flácido repleto de fluido, presença de edema na serosa e com a luz repleta por fluido esverdeado ou amarelado. A mucosa apresenta-se congestionada e hiperêmica, com a presença de muco re-

cobrindo a superfície e, ocasionalmente, focos de erosão e necrose. Os linfonodos mesentéricos e colônicos geralmente estão aumentados. Com a evolução da doença é possível observar erosões/ulcerações multifocais, caracterizando um quadro de colite erosiva ou ulcerativa. Nos casos crônicos, aderem-se às áreas de erosões/ulcerações exsudato fibrinoso ou fibrinonecrótico e partículas de ração dando aspecto de “paralelepípedos”, formando uma pseudomembrana, que pode ser facilmente depreendida^[3,6,9].

No exame histopatológico observa-se colite catarral multifocal, ulcerativa ou erosiva, restrita à mucosa e à submucosa, eventualmente comprometendo a *muscularis*; hiperplasia das células e alongamento das criptas, que se tornam repletas de muco; ademais, células imaturas, cuboides ou epitélio escamoso podem estar presente devido ao aumento da taxa mitótica nas criptas; hiperplasia de células caliciformes; infiltrados mononucleares na lâmina própria. Uma camada de células bacterianas intimamente aderida à região apical dos enterócitos do cólon formando uma borda em “escova” ou *false brush border* pode ser detectada através de técnicas histoquímicas (coloração pela prata e imuno-histoquímica)^[6,7,9,17,18,20].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo da infecção por *B. pilosicoli* requer o isolamento seguido da caracterização bacteriológica ou detecção pela PCR^[12,13]. Tanto o isolamento quanto a detecção podem ser realizados a partir de amostras de conteúdo retal, colhidas com o auxílio de suave ou conteúdo do ceco e cólon obtido por ocasião da necropsia.

No caso do exame bacteriológico, o diagnóstico definitivo requer a caracterização morfotintorial e fenotípica do isolado. Vários testes moleculares, baseados na PCR, como ensaios de multiplex-PCR que contempla em uma única reação à detecção de *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* e *Salmonella* spp. tem sido usado nas rotinas de diagnóstico laboratorial^[1,2,11,12,13,16].

O diagnóstico *post mortem* deve considerar os achados de necropsia e avaliação histológica e imuno-histológica, possibilitam identificar, com bastante segurança, a localização de grande quantidade de espiroquetas aderidas à superfície de enterócitos e no lúmen de criptas do intestino grosso. Entretanto, essa característica não é sempre visível em todas as fases e casos da doença^[5,9].

Testes sorológicos como aglutinação microscópica, ELISA e imunodifusão permitem o diagnóstico da doença ou infecção, mas apenas indicam a positividade do rebanho, não devendo ser considerados como ferramenta para o diagnóstico de um indivíduo infectado.

e) Diagnóstico diferencial

Vários agentes, de forma isolada ou associada, podem estar envolvidos na causa de transtornos entéricos em suínos nas fases de crescimento e terminação. Devem ser consideradas, cada vez mais, infecções entéricas mistas, voltadas a uma dinâmica de interação multifatorial em que os “complexos enteropatogênicos” exercem um papel fundamental.

No diagnóstico diferencial deve considerar a forma crônica ou subclínica da enteropatia proliferativa suína, fases iniciais da disenteria suína, tricúriase, salmonelose, colibacilose, *Clostridium perfringens* tipo A, coccidioses, diarreia por hipersensibilidade à soja e colite inespecífica^[9,15,17].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras clínicas devem ser coletadas de animais com sinais clínicos da doença.

Visando ao isolamento bacteriológico ou à detecção do agente através de técnicas moleculares (PCR), pode-se fazer a colheita de conteúdo intestinal ou mesmo de segmentos intestinais. Para colher material retal, pode-se utilizar o procedimento da mão enluvada, introduzindo os de-

dos médio e indicador no ânus do animal, recolhendo uma amostra de 10 a 15g ou simplesmente utilizando um suave. Nos casos de monitoramento sanitário de rebanho, amostrar cerca de 10 a 20 animais com sinais clínicos.

Em caso de necropsia, o procedimento mais indicado é colher segmentos intestinais, de 5 a 10cm (intestino grosso, de preferência com lesões macroscópicas sugestivas). Para colher corretamente o segmento intestinal é conveniente fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou “bolsa”) realizando os cortes entre elas.

Quando se desejar coletar amostras do conteúdo intestinal durante a necropsia, utilizando suave, deve-se abrir um pequeno orifício no segmento intestinal alvo e introduzir o suave, girando-o suavemente para recolher uma quantidade satisfatória de conteúdo intestinal.

Todos os materiais destinados ao isolamento bacteriológico ou de detecção da *B. pilosicoli* atraes de ensaios moleculares (PCR) devem ser mantidos sob refrigeração, entre 4 e 8°C, desde a colheita até o processamento laboratorial.

Para a realização dos exames histopatológicos e de imuno-histoquímica, colher fragmentos dos diferentes órgãos e tecidos, incluindo linfonodos mesentéricos e fragmentos intestinais. O material deve ser fixado em solução tamponada de formol a 10%.

As amostras de soro, aproximadamente 3 a 5mL, destinadas aos testes sorológicos (aglutinação microscópica, imunofluorescência indireta, ELISA e imunodifusão) podem ser enviadas refrigeradas ou congeladas. É importante amostrar grupos de animais de diferentes idades (diferença de pelo menos três semanas de idade), para então poder definir a fase mais provável de infecção..

Referências bibliográficas

1. ATYEO, R.F. et al. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. **Letters in Applied Microbiology**, n. 26, p. 126-130, 1998.
2. BARCELLOS, D.E.S.N. et al. Rapid identification and typing of porcine intestinal spirochetes by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 189-198, 2000.
3. DUHAMEL, G.E. Colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*. **Large Animal Practice**, v. 19, p. 14-22, 1998.
4. DUHAMEL, G.E. et al. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated “*Serpulina canis*” sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2264-2270, 1998.
5. FISHER, L.N. et al. Immunoblot reactivity of polyclonal and monoclonal antibodies with periplasmic flagellar proteins FlaA1 and FlaB of porcine *Serpulina* species. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 4, p. 400-404, 1997.
6. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
7. HAMPSON, D.J.; Trott, D.J. A review - Intestinal spirochetal infections of pigs: an overview with an Australian perspective. In: **Manipulating Pig Production** V, Hennessy, D.P.; Cranwell, P.D (Eds.), Werribee, p. 139-169, 1995.
8. HAMPSON, D.J.; OXBERRY, S.L.; LA, T. Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 869-870, 2006.
9. HAMPSON, D.J.; DUHAMEL, G.E. Porcine colonic spirochetosis/intestinal spirochetosis. In: STRAW B. E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 755-768, 2006.

10. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
11. KADER, I.T.A.; DUHAMEL, G. Rapid identification and typing of porcine intestinal spirochetes by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 189-198, 2000.
12. LA, T. et al. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3372-3375, 2003.
13. LA, T. et al. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 42, p. 284-288, 2006.
14. LINDECRONA, R.H.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K. Influence of diet on the experimental infection of pigs with *Brachyspira pilosicoli*. **Veterinary Record**, v. 154, n. 9, p. 264-267, 2004.
15. MENIN, Á. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6 p. 281-286, 2008.
16. NYREE, D.P. et al. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 134, n. 3, p. 294-299, 2009.
17. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.
18. THOMSON, J.R.; SMITH, W.J.; MURRAY, B.P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. **Veterinary Record**, v. 142, p. 235-239, 1998.
19. THOMSON, J. Etiología y control de las principales infecciones entéricas porcinas. **Información Veterinaria**. Espanha, v. 1, n. 224, p. 34-39, abr. 2001.
20. TRIVETT, N.L. et al. Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetalosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 261-265, 1998.

1.7 Disenteria suína

Conceito

A disenteria suína é uma doença infecciosa, causada pela espiroqueta *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*), que acomete, principalmente, animais nas fases de crescimento, terminação e, ocasionalmente, fêmeas de reposição, caracterizada por enterite fibrino-hemorrágicas e grave diarreia muco-hemorrágica.

Etiologia e Patogênese

Brachyspira hyodysenteriae (família *Spirochaetaceae*), mede 6 a 8,5µm de comprimento e 0,32 a 0,38µm de diâmetro, são levemente espiraladas e, à microscopia, apresentam-se como bastonetes delgados. É uma bactéria citoquimicamente Gram-negativa, móvel, anaeróbia, que produz potentes hemolisinas^[6,10].

A quimiotaxia da bactéria pelo muco intestinal e a motilidade são as duas principais condições associadas à patogênese de *B. hyodysenteriae*, pois permitem a eficiente e específica colonização da mucosa do intestino grosso. A motilidade é baseada na atividade de 7 a 14 flagelos

periplasmáticos, já a quimiotaxia pela glicose, galactose e mucina é atribuída a uma proteína de superfície (lipoproteína glicose-galactose)^[3,6].

Além disso, NADH-oxidase permite tolerar a ação tóxica do oxigênio. O LOS, além de determinar as características sorológicas, possui atividade citotóxica e induz à produção de citocinas IL-1, TNF, IL-6. As hemolisinas TlyA, TlyB, TlyC e HlyA, são responsáveis pela atividade β -hemolítica *in vitro*, atividade citotóxica, essenciais na patogênese da doença^[3,5,6].

Mesmo sendo considerada o agente primário da disenteria suína, a bactéria *B. hyodysenteriae*, parece depender da interação com outros constituintes da microbiota intestinal para que ocorra o desenvolvimento da doença clínica.

A infecção dos animais ocorre principalmente pela ingestão de fezes (infecção oral-fecal) ou materiais contaminados. *B. hyodysenteriae* resiste ao pH ácido do estômago e alcança o intestino grosso (ceco e cólon), onde se associa sinergicamente a outros microrganismos da microbiota colônica (*Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Campylobacter coli*, *Clostridium* spp. e *Listeria denitrificans* e um protozoário, *Balantidium coli*). Sua capacidade de movimento permite atravessar a camada de muco e invadir o interior das criptas da mucosa, principalmente do ceco e do cólon, nas quais se multiplica, dando origem ao quadro clínico-lesional^[11,13]. Durante a infecção podem ser observadas espiroquetas na camada de muco, nas células caliciformes, nos espaços intercelulares, no citoplasma das células epiteliais degeneradas e, às vezes, na lâmina própria^[9,12].

Durante sua multiplicação (fase log) a bactéria produz citotoxina/hemolisina e, à medida que atinge a fase estacionária e morre, libera lipo-oligossacarídeos (LOS) presentes na superfície bacteriana^[3,6]. Esses fatores atuam sobre o complexo juncional, diminuem a coesividade dos enterócitos, principalmente no fundo das criptas, e, juntamente com a microbiota, invade o espaço intercelular e atingem a lâmina própria. Inicialmente, devido ao processo inflamatório, ocorre hiperplasia das células caliciformes, aumento na produção de muco, necrose coagulativa superficial e erosões dos enterócitos da mucosa do cólon^[3]. Na mucosa e na submucosa ocorrem alterações circulatórias locais, edema, hiperemia, infiltração de polimorfonucleares (leucócitos/neutrófilos), hemorragia petequial ou equimótica, formação de placas fibrinosas e consequente necrose superficial da mucosa^[5]. A degeneração epitelial e a necrose adjacente são devidas aos efeitos tóxicos do LOS, que induz à liberação de TNF e IL-1 β , e à ação tóxica das hemolisinas. Com relação ao quadro clínico, a diarreia observada é causada pela falha da capacidade absortiva de água e eletrólitos do cólon. Apesar de a função do intestino delgado se manter sem maiores alterações nos suínos infectados, no intestino grosso há uma perda massiva de Na^+ , Cl^- , HCO_3^- e água como resultado de falha na absorção^[4]. Como consequência, há diminuição no fluxo de eletrólitos para a corrente circulatória, mas mantém-se a permeabilidade da mucosa e o fluxo da corrente sanguínea para a luz intestinal. Mesmo com a regressão do quadro, sequelas transitórias ou permanentes limitam a fisiologia da mucosa (enterócitos) do cólon.

B. hyodysenteriae é sensível a dessecação, calor, pH ácido, luz solar e desinfetantes comuns, principalmente aqueles à base de compostos fenólicos ou clóricos. Sobrevive mais tempo viável em temperaturas baixas. Em temperatura ambiente (25°C), na presença de fezes, a bactéria se mantém viável por uma semana; já a 10°C pode manter-se viável por até 120 dias^[4,6,7].

Diagnóstico

Com a evolução das metodologias de diagnóstico, monitoramento clínico, monitoramentos epidemiológicos e ecopatológicos (estudos dos fatores de risco), cada vez mais se percebe que a natureza etiológica dos transtornos entéricos tem caráter multifatorial, em que mesmo a identificação da presença de um patógeno entérico não determina o diagnóstico conclusivo.

a) Epidemiologia

A disenteria suína é uma das enfermidades economicamente mais graves da produção suína. A principal fonte de infecção são os suínos portadores, que podem apresentar o quadro clínico clássico ou manter-se assintomáticos. Suínos doentes podem eliminar entre 10^7 a 10^9 UFC/g de fezes. Os suínos curados podem continuar eliminando o agente nas fezes por mais de 70 dias. Rodeiros podem eliminar a bactéria por 6 meses, e cães, por 13 dias. O período de incubação varia de 7 a 14 dias, podendo chegar a 60 dias, e a soroconversão ocorre cerca de 10 a 30 dias após o início dos sinais clínicos e podem persistir por até 120 dias^[4,11,13].

No caso de surtos, a morbidade geralmente é alta, podendo chegar a 90% e a mortalidade pode variar de 20% a 40%, quando não tratada. Tanto a morbidade quanto a mortalidade estão relacionadas às condições de desafio, presença e intensidade dos fatores predisponentes, virulência do agente e *status* imune do rebanho^[7,10,11].

A transmissão entre rebanhos ocorre principalmente por animais portadores assintomáticos, ou de forma mecânica, pelo trânsito de fômites, ração, pessoas e veículos contaminados ou outros vetores, como cães, pássaros, ratos, moscas e mosquitos. No rebanho, *B. hyodysenteriae* é transmitida e se mantém pela excreção de animais doentes ou com infecção subclínica, ou por água, fômites e alimentos contaminados^[4,5].

Os fatores predisponentes para a ocorrência ou gravidade da doença incluem: desafio ambiental (deficiente programa de limpeza e desinfecção), exposição a fatores estressantes (estresse térmico, agrupamento de animais, superpopulação, trocas bruscas de rações), dietas com altos índices de energia e proteína, rações deficientes em vitamina E e, Selênio^[4,8,10,11].

A imunidade natural aparentemente é específica a um sorotipo, determinada pelo lipopolissacarídeo da membrana externa (LOS), apesar de proteção heteróloga limitada entre alguns sorotipos ser sugerida. Esse fato é mais importante para o desenvolvimento de vacinas, haja vista que o normal é que uma granja esteja infectada por apenas um único sorotipo.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a disenteria suína pode manifestar-se nas formas superaguda, aguda e crônica. Na forma superaguda (mais rara) os animais morrem de choque endotóxico em menos de 24 horas. Inicialmente a diarreia é aquosa, marrom-clara, com presença de muco e sangue (muco-hemorrágica) e partículas de ração não digeridas. A cor das fezes varia de cinza-claro a marrom-escura. Progressivamente vão aparecendo estrias de sangue fresco, muco brilhante e material necrótico. Posteriormente a diarreia adquire coloração marrom-chocolate com presença de placas de fibrina (fibrino-hemorrágica). Os animais apresentam rápida e intensa perda da condição corporal, desidratação, perda de apetite, apatia e morrem. A morte ocorre por desidratação, acidose, hipercalemia e nos casos agudos ou graves septicemia^[4,5]. No caso dos animais que se recuperam, o quadro pode evoluir para a forma crônica.

Os animais que a manifestam a forma crônica apresentam diarreia escura persistente ou intermitente, desidratação, perda de peso e refugagem, a morbidade geralmente é alta mas a mortalidade é baixa.

c) Patologia

Na necropsia é possível observar lesões restritas ao intestino grosso (cólon) com demarcação na junção ileocecal. A parede do intestino apresenta-se edematosa, com hiperemia dos vasos mesentéricos e linfonodos mesentéricos aumentados de volume (principalmente nos casos crônicos).

Ao abrir a parede do intestino grosso é possível observar enterite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica, conteúdo mucoso ou fluido com estrias de sangue, material necrótico e parti-

culas de reação não digeridas e, em casos crônicos, membranas fibrinonecróticas. A mucosa apresenta-se edematosas, hiperêmica, hemorrágica (coágulos de sangue), com depósitos de muco, fibrina e tecido necrosado (enterite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica) formando pseudo-membranas mucofibrinosas^[5,11].

No exame histopatológico é possível observar: congestão da mucosa e submucosa, necrose fibrinoide superficial, hiperplasia das células caliciformes, infiltrado inflamatório (neutrofílico) com hiperplasia das células da base e dilatação das criptas. Presença de restos celulares, muco e células inflamatórias no lúmen^[4,10].

d) Diagnóstico laboratorial

No exame bacteriológico, considerando o fato de que podem estar presentes no intestino de suínos tanto espécies patogênicas como apatogênicas de *Brachyspira* spp., o diagnóstico definitivo requer a caracterização morfotintorial e fenotípica do isolado. O diagnóstico bacteriológico, apesar de ser definitivo, requer a demonstração do agente através de cultivo (caracterização das colônias), isolamento, caracterização das propriedades morfotintoriais e bioquímicas do isolados e posterior classificação fenotípica ou genotípica. Considera-se que o isolamento tem baixa sensibilidade, visto que para que ele seja viabilizado são requeridas amostras ricas em *Brachyspira* sp. (10^8 a 10^9 UFC/g fezes). Sendo assim, são mais propícias ao exame bacteriológico amostras provenientes de animais na fase aguda ou no início do quadro de diarreia^[6].

Vários métodos de análise molecular, baseados na PCR, visando amplificar e detectar sequências gênicas específicas de *B. hyodysenteriae*, estão disponíveis. De forma bastante eficiente, um multiplex-PCR que contempla em uma única reação a possibilidade de detecção do DNA de vários microrganismos associados à infecção entérica, como *B. piloscoli*, *B. hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* e *Salmonella* spp, tem sido utilizado. Esses métodos envolvendo a PCR possibilitam a detecção de *B. hyodysenteriae* em amostras clínicas com alta sensibilidade e especificidades^[1,2,14]. Pode representar uma ótima ferramenta para vigilância e monitoramento do agente nas diferentes fases de produção dos rebanhos.

O diagnóstico *post mortem* envolvendo o estudo histopatológico tem como resultado um diagnóstico muito consistente. Entretanto, tem baixa especificidade no que tange à diferenciação entre disenteria suína e espiroquetose suína. Nestes casos, pode-se utilizar técnicas de imunohistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) para proteína flagelar *FlaB* ou *FlaA1*, que possibilita identificar espiroquetas aderidas à superfície de enterócitos e no lúmen das criptas do intestino grosso^[5].

Outra alternativa é a imunofluorescência indireta usando anticorpos monoclonais (mAbs) ou anticorpos policlonais (pAbs), que possibilitam a caracterização e a identificação da *B. hyodysenteriae*. Entretanto, reações falso-positivas são comuns utilizando essa metodologia^[9,11].

Testes sorológicos como microaglutinação (aglutinação microscópica), ELISA e imunodifusão também podem ser utilizados para a positividade do rebanho. A infecção por *B. hyodysenteriae* induz a uma imunidade humoral fraca, com títulos mensuráveis satisfatoriamente em infecções clínicas ou no estado de convalescença, porém indetectáveis na infecção inaparente. Além disso, deve ser considerada a possibilidade de reação cruzada *S. hyodysenteriae* e *S. innocens* e variabilidade imunológica entre os diferentes sorotipos de *B. hyodysenteriae*.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve considerar colite inespecífica, Salmonelose (*S. Choleraesuis*), enteropatia proliferativa suína, tricúriase e colite espiroquetal (Tabela 6).

Tabela 6. Características diferenciais para o diagnóstico entre as principais enfermidades entéricas que afetam suínos nas fases de crescimento e terminação

Característica diferencial	Disenteria suína	Colite espiroquetal	Enteropatia proliferativa	Salmonelose	Tricuríase
Diarreia	Muco-hemorrágica	Não	Em casos agudos	Variável	Variável
Lesões no intestino delgado	Não	Não	Proliferação	Hemorragia, necrose e úlcera	Sim
Colite ou tiflite (muco-hemorrágicas)	Sim	Sim	Não	Variável	Variável
Lesões sistêmicas (órgãos parenquimatosos)	Não	Não	Não	Hemorragia e necrose	Não
Lesão microscópica	Presuntivo	Presuntivo	Presuntivo	Presuntivo	Confirmatório
Cultivo	Confirmativo	Confirmativo	Não aplicável	Presuntivo	Não aplicável

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A confiabilidade do diagnóstico depende fundamentalmente da representatividade e da qualidade das amostras remetidas ao laboratório. Nesse caso, preconiza-se uma amostragem mínima de 10 a 20 animais, preferencialmente de leitões das fases de crescimento e terminação, com sinais clínicos sugestivos da doença e que não tenham sido medicados. É importante amostrar grupos de animais de diferentes idades (diferença de pelo menos três semanas de idade), para então poder definir a fase mais provável de infecção.

Para o exame bacteriológico e para a detecção do agente através de técnicas moleculares baseadas na PCR, colher e enviar para o laboratório conteúdo retal. A coleta da amostra clínica pode ser realizada utilizando a técnica da mão enluvada; nesse caso, deve-se introduzir o dedo médio ou indicador na ampola retal e recolher uma amostra de 10 a 15g. No caso de utilizar um suabe, deve-se procurar atritar firmemente a superfície da mucosa, garantindo que o algodão fique com a superfície de coleta coberta por material fecal.

Por ocasião da necropsia, o procedimento mais indicado é colher segmentos intestinais de 5 a 10 cm (intestino grosso, preferência com lesões macroscópicas sugestivas). Para colher o segmento intestinal é conveniente fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou “bolsa”), realizando os cortes entre as ligaduras, preservando o conteúdo intestinal na luz. Durante a necropsia, pode ser desejado apenas colher amostras do conteúdo intestinal. Nesse caso, deve-se abrir um pequeno orifício no segmento intestinal alvo (colon, próximo a válvula íleo cecal) e introduzir um suabe, girando-o suavemente para recolher uma quantidade satisfatória de conteúdo intestinal.

Os segmentos intestinais ou os suabes retais destinados ao isolamento bacteriológico ou análise genotípica (PCR) devem ser mantidos sob refrigeração desde a colheita até o exame para melhorar a viabilidade do isolamento, mas não congelados (entre 2 e 8°C).

Para a realização dos exames histopatológicos e imunohistológicos, coletar diferentes fragmentos dos diferentes órgãos e tecidos com atenção especial a fragmentos intestinais, contemplando 5 a 10cm do jejun, íleo, ceco e cólon com lesões macroscópicas sugestivas. Além disso, incluir, para rotina diferencial, fragmentos dos diferentes órgãos e tecidos. As amostras devem ser fixadas em solução tamponada de formol a 10%.

As amostras de soro, de aproximadamente 3 a 5mL, destinadas aos testes sorológicos podem ser enviadas ao laboratório de diagnóstico sob refrigeração a 4°C ou congeladas.

Referências bibliográficas

1. ATYEO, R.F. et al. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. **Vet. Microbiol.**, v. 67, p. 47-60, 1999.
2. LA, T. et al. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 42, p. 284-288, 2006.
3. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
4. HARRIS, D.L.; GLOCK, R.D. Swine dysentery. **Veterinary Scope**, v. 17, p. 2-7, 1973.
5. HAMPSON, D.J.; FELLSTROM, C.; THOMSON, J.R. Swine Dysentery. In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 784-806. 2006.
6. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
7. HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 345-375, 1990.
8. MENIN, Á. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 281-286, 2008.
9. NYREE, D.P. et al. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 294-302, 2009.
10. OCHIAI, S.; ADACHI, Y; MORI, K. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. Nov., *Brachyspira innocens* comb. Nov. And *Brachyspira pilosicoli* comb. Nov. **Microbiol Immunol**. v. 41, n. 6, p. 445-452, 1997.
11. THOMSON, J.R.; SMITH, W.J.; MURRAY, B.P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. **Veterinary Record**, v. 142, p. 235-239, 1998.
12. TRIVETT-MOORE, N.L. et al. Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 261-265, 1998.
13. TROTT, D.J.; HUXTABLE, C.R.; HAMPSON, D.J. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4648-4654, 1996.
14. ŹMUDZKI, J. et al. Rapid detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in swine faecal and mucosal specimens by multiplex PCR. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**. v. 48, p. 207-214, 2004.

1.8 Doença de Glässer

Conceito

A doença de Glässer é uma doença infecciosa septicêmica classicamente caracterizada por polisserosites fibrinosa, broncopneumonia catarral-purulenta aguda, septicemia e morte súbita causada pela bactéria *Haemophilus parasuis*.

Etiologia e Patogênese

H. parasuis (família *Pasteurellaceae*) é um bastonete Gram-negativo pequeno, medindo 1 a 7 µm de comprimento por 0,2 a 2 µm de largura, pleomórfico, imóvel, anaeróbio facultativo, não hemolítico e dependente de NAD (nicotinamida-adenina dinucleotídeo) que infecta exclusivamente suínos^[2].

Atualmente, 15 sorotipos de *H. parasuis* estão descritos. Entretanto, amostras não tipificáveis ainda são isoladas com frequência, demonstrando grande variabilidade fenotípica, sendo possível isolar mais de um sorotipo no mesmo rebanho ou no mesmo animal^[4,7]. A gravidade da doença e a virulência entre os sorotipos de *H. parasuis* podem variar dependendo da imunidade do rebanho e da diversidade genética dos isolados. De maneira geral, os sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 são considerados altamente virulentos, os sorotipos 2, 4 e 15 moderadamente virulentos, e os sorotipos 3, 6, 7, 8, 9 e 11 de baixa virulência (Tabela 7). No Brasil, os sorotipos mais prevalentes são: 1, 4, 5, 12 e 13^[8,9,10].

Tabela 7. Classificação dos sorotipos de *H. parasuis* segundo o nível de virulência e prevalência no Brasil.

Nível de virulência	Sorotipo
Intensa	1, 5, 10, 12, 13 e 14
Variável	2, 4 e 15
Baixa	8
Ausência de virulência	3, 6, 7, 9 e 11
Sorotipos prevalentes no Brasil	1, 4, 5, 12 e 13

A partir da análise usando PAGE, foi proposta uma classificação mais simples das cepas de *H. parasuis*. Essa classificação é baseada em biótipos, determinados pela expressão de抗ígenos proteicos, não compartilhados de forma homóloga entre os sorotipos. Sendo assim, a classificação considera: *Biotipo I*: cepas procedentes da cavidade nasal de suínos saudáveis; e *Biotipo II*: cepas isoladas de casos da doença de Glässer^[5].

Até o presente momento, pouco é conhecido sobre a patogenia, os fatores de virulência e a imunogenicidade de *H. parasuis*, o que dificulta o controle de infecções sistêmicas causadas por esse organismo. Apesar de os mecanismos de patogênese não estarem totalmente elucidados, os principais fatores de virulência envolvidos na patogenia da doença incluem: cápsula, fimbrias, lipo-oligossacarídeos (LOS), proteínas da membrana (OMP_I e OMP_{II}), neuraminidase (sialidase produzida na fase log, que diminui a viscosidade da mucina)^[1,3,5].

A infecção ocorre através de aerossóis. *H. parasuis* coloniza inicialmente a mucosa da cavidade nasal, a partir da qual parece expressar tropismo para as membranas serosas, sinoviais e meníngeas e também para o parênquima pulmonar. O estudo clínico-patológico revela a capacidade do agente de expressar mecanismos (OMP e fimbrias) que permitem colonizar o trato respi-

ratório superior, alcançar o pulmão, vencer as barreiras de defesa do sistema mucociliar e macrófagos alveolares, chegar à corrente sanguínea e então adquirir a característica septicêmica, evadindo-se dos fatores de defesa como sistema complemento. A partir dessa etapa, atinge distintos órgãos e tecidos, onde se multiplica e desencadeia uma resposta inflamatória serofibrinosa severa (polisserosites, poliartrites) e, em alguns casos, ultrapassa a barreira hematoencefálica, através da ligação com – e penetração de – células do endotélio microvascular cerebral (PBMEC) (*porcine brain microvascular endothelial cells*), causando meningite^[1,5,9].

Os principais fatores associados a ocorrência e a gravidade da doença são status imune, virulência do agente e fatores predisponentes como desmame, transporte ou presença de outros patógenos respiratórios. Provavelmente a coinfeção com agentes virais, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (não diagnosticada no Brasil) e o circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), estão associados com a maior ocorrência e gravidade da doença^[10].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da infecção por *H. parasuis* requer a demonstração do agente nos tecidos através do isolamento e da caracterização bacteriológica ou da detecção através da PCR. Sinais clínico como morte súbita de leitões jovens e lesões na necropsia de polyserosite, poliartrite e meningite fibrinosa permitem um diagnóstico presuntivo.

a) Epidemiologia

A infecção por *H. parasuis* ocorre em todos os países com suinocultura intensiva, causando grandes perdas econômicas por mortalidade e atraso no crescimento dos animais cronicamente afetados.

H. parasuis é um organismo comensal do trato respiratório superior de suínos, sendo uma das primeiras bactérias a compor a microbiota do trato respiratório superior do leitão. Essa bactéria, normalmente, pode ser isolada da cavidade nasal, tonsila e traqueia de animais saudáveis. Sendo assim, somente amostras de sítios não respiratórios devem ser submetidas a isolamento e diagnóstico e produção de vacinas autógenas para *H. parasuis*^[2,4].

A transmissão (aerossóis) ocorre pelo contato com animais colonizados ou infectados. Os leitões geralmente se infectam com o agente na fase de maternidade, a partir de suas mães. Em consequência dessas características epidemiológicas, praticamente 100% das granjas convencionais são positivas para o *H. parasuis*, podendo ser isolado mais de um sorotipo em uma unidade de produção ou mesmo de um único animal, sadio ou enfermo^[5,7].

A ocorrência da doença de Glässer tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, provavelmente associada com a coinfeção com agentes virais como o circovírus (PCV-2), que afeta diretamente a imunidade inata do trato respiratório. *H. parasuis* afeta principalmente leitões entre uma e 12 semanas de idade, com maior frequência entre quatro e seis semanas de idade ou logo após o desmame. A imunidade passiva natural (anticorpos colostrais) pode estar presentes e protegendo o leitão da infecção até seis a oito semanas de idade^[3,6,10].

As principais perdas econômicas determinadas pela doença estão associadas à alta mortalidade de leitões nas fases de creche, recria e, eventualmente, elevado número de refugos entre os sobreviventes.

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos e as lesões variam dependendo do estado imune do rebanho, da virulência da cepa, do estágio da infecção e do local das lesões. A doença pode manifestar-se em diferentes formas clínicas (Tabela 8), afetando com maior frequência e intensidade leitões entre 30 e 42 dias de idade, concomitantemente à queda da imunidade passiva.

Tabela 8. Sinais clínicos de acordo com a forma clínica de apresentação da Doença de Glässer.

Forma super-aguda	Forma aguda	Forma crônica	Forma pneumônica	Outras formas
Morte súbita, associada a uma septicemia sem polisserosite	<ul style="list-style-type: none"> • Febre ($> 40^{\circ}\text{C}$) • Anorexia, dispneia e dor • Inchaço das articulações • Lombo arqueado • Cianose e conjuntivite • Paralisia, incoordenação, tremores e opistotônio • Alta mortalidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Depressão • Tosse • Dispneia • Apatia • Paralisia • Cerdas eriçadas 	Pneumonia hemorrágica sem efeito sistêmico ou septicêmico, caracterizada por dispneia e tosse	Apesar de mais rara, pode ser associada à rinite purulenta, à miosite aguda (músculo masseter), à fascite e à panículite auricular

A **forma superaguda** é caracterizada por morte súbita, associada a uma septicemia sem polisserosite. Na necropsia é possível observar petequias, equimoses e lesões microscópicas de dano vascular na região subcapsular renal e no fígado. Esse quadro é típico em situações em que os leitões têm baixa imunidade passiva e são desafiados com cepas altamente virulentas.

Na **forma aguda**, apresentação clássica da DG, observa-se polisserosite e poliartrite fibrinosa, os animais afetados adoecem subitamente. Inicialmente apresentam hipertermia, inapetência, letargia, inchaço nas articulações, tosse, respiração abdominal, tremores, incoordenação motora, decúbito lateral, movimento de pedalar, seguido por decúbito. Esses sinais clínicos podem apresentar-se de maneira independente ou associada^[10].

Os leitões afetados que sobrevivem, em geral, desenvolvem a **forma crônica**, que cursa com poliartrite e serosite. Na necropsia é possível observar a presença de exsudato fibrinoso no pericárdio, na pleura, no peritônio, nas meninges e nas articulações. O exame histopatológico revela inflamação fibrinopurulenta com infiltrado neutrofílico com poucos mononucleares nas serosas afetadas^[7,9].

A forma crônica é frequente em animais que se recuperam do quadro agudo, apresentam quadro grave de refugagem. Na necropsia os animais apresentam um quadro de polisserosites, principalmente pericardite fibrinosa, poliartrite fibrinopurulenta e aderências das serosas (Tabela 9).

Tabela 9. Diagnóstico diferencial de artrites bacterianas baseado nas características lesionais da artrite (tipo de artrite).

Característica lesional da artrite (tipo de artrite)	Possível agente envolvido
Artrite purulenta	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
	<i>Streptococcus suis</i>
	<i>Streptococcus equisimilis</i>
	<i>Staphylococcus</i> sp.
Artrite serofibrinosa	<i>Haemophilus parasuis</i>
	<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>

Na **forma pneumônica**, o agente causa pneumonia hemorrágica sem efeito sistêmico ou septicêmico. O quadro se caracteriza por dispneia e tosse. Na necropsia se observa consolidação das

secções anteroventrais do pulmão e broncopneumonia catarral-purulenta ou supurativa. Nesse caso, a bactéria está frequentemente associada a co-infecções pelo PCV-2 ou vírus da ou influenza^[3,9,10].

c) Patologia

Na forma clássica da doença, durante o exame *post mortem*, é possível observar exsudato serofibrinoso ou fibrinopurulento na superfície do peritônio, no pericárdio, na pleura, nas meninges e nas articulações, caracterizando um quadro de polisserosite (peritonite, pericardite, pleurite, meningite e poliartrite), e às vezes áreas de pneumonia hemorrágica^[3]. Essas lesões podem apresentar-se em várias combinações ou isoladamente (Tabela 10).

Tabela 10. Características diferenciais entre *H. parasuis* e seus respectivos sorotipos de doenças associadas, considerando a forma clínica e o quadro clínico-patológico.

Forma clínica	Quadro clínico-patológico	Sorotipos envolvidos	Diagnóstico Diferencial
Superaguda	Morte súbita	1, 5, 10, 12, 13, 14	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Escherichia coli</i> Deficiência vit. E e selênio; doença de Aujeszky
Aguda/ crônica (sinais clássicos de DG)	Polisserosite, poliartrite e meningite serofibrinosa	2, 4, 15	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Actinobacillus suis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus suis</i> ; <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Mycoplasma hyorhinis</i> , <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
Pneumônica	Broncopneumonia catarral-purulenta ou supurativa	2, 4, 5, 7, 12, 13	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Actinobacillus suis</i> , <i>Streptococcus suis</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Mycoplasma hyorhinis</i> , <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e <i>Influenzavirus</i>
Sem sinais clínicos / lesões	Ausente	3, 6, 8, 9, 11	Infecções primárias (virais ou bacterianas) por outros agentes patogênicos

Na histopatologia observa-se exsudato fibrinopurulento com infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) e mononucleares (macrófagos) nas serosas afetadas; nos casos mais graves também se observa meningite, meningoencefalite trombocítica, aumento do fluido cerebroespinal e artrite^[9,10]. No caso de septicemia é possível observar petéquias e equimoses, principalmente no fígado, nos rins e no sistema nervoso central. À medida que aumentam os níveis de endotoxina na corrente sanguínea, ocorre deposição de fibrina em vários órgãos^[1,4].

No caso de doença sistêmica o diagnóstico diferencial deve incluir *S. suis*; já nos quadros envolvendo pleurite fibrinosa deve-se investigar o envolvimento do *A. pleuropneumoniae*^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

Para a caracterização e identificação das cepas prevalentes em um rebanho deve-se fazer o isolamento de *H. parasuis* a partir de um número significativo de animais. Em geral, considera-se uma amostragem mínima de 10 animais para, a partir do isolamento e sorotipificação ou genotipificação, definir os grupos de cepas prevalentes no rebanho. A caracterização bioquímica deve incluir outras bactérias que apresentam padrões similares de crescimento e de morfologia, como *Actinobacillus indolicus*, *A. porcinus* e *A. minor*. Os isolados devem, obrigatoriamente, ser genotipificados ou sorotipificados. A genotipagem pode ser realizada através das técnicas de Rep-PCR e ERIC-PCR^[8]. Já a sorotipificação dos isolados pode ser realizada por meio do teste de precipitação em gel de ágar (IDGA), aglutinação ou teste de ELISA^[5].

Devido às limitações do isolamento, técnicas que possibilitam a identificação do agente sem a necessidade de isolamento devem ser preconizadas. Entre as metodologias propostas estão as técnicas moleculares baseadas na PCR, que possibilitam a amplificação e detecção de segmentos do RNA ribossomal 16S (GenBank M75065), a partir das amostras de tecidos, fluidos ou suabes. Essa ferramenta apresenta inúmeras vantagens no diagnóstico de *H. parasuis* ante o fato que se trata de um agente de difícil cultivo, crescimento lento e extremamente sensível às condições de transporte^[5,8].

Testes sorológicos, como fixação de complemento, hemaglutinação indireta e teste de ELISA, constituem uma importante ferramenta diagnóstica. O teste de fixação de complemento é capaz de detectar anticorpos ante *H. parasuis* a partir de 10 dias após a infecção, atingindo títulos máximos (1:640 a 1:1280) entre uma e duas semanas após.

Em granjas onde a infecção por *H. parasuis* é enzoótica, a maioria dos animais apresenta títulos moderados (1:10 a 1:80). Em geral, considera-se que títulos superiores a 1:80 indicam a infecção do rebanho. Estas técnicas expressam maior utilidade quando são usadas para determinar o título de anticorpos, para mediar a imunidade passiva (anticorpos maternais) e a resposta imuneativa artificial, medindo a eficiência da vacinação, no mínimo 5 dias após a aplicação.

A técnica de ELISA tem-se mostrado bastante sensível e permite identificar granjas negativas, suspeitas e positivas. De qualquer modo, é importante prever que em animais sadios é possível encontrar títulos de anticorpos de *H. parasuis*; sendo assim, qualquer tentativa de diagnóstico deve considerar a amostragem mínima e, de preferência, considerar o fenômeno de soroconversão, mais bem caracterizado em amostragens pareadas.

e) Diagnóstico diferencial

Os principais agentes infecciosos que devem ser incluídos no diagnóstico diferencial são: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Salmonella cholereasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Influenzavirus* (Tabela 11).

Tabela 11. Diagnóstico diferencial baseado no quadro lesional de várias enfermidades bacterianas dos suínos.

Agente	Quadro lesional				
	Artrite	Pleurite	Peritonite	Pneumonia	Meningite
<i>H. parasuis</i>	+	+	+	+	+
<i>S. suis</i>	+	+/-	+/-	+	+
<i>M. hyorhinis</i>	+	+	+	+	+/-
<i>M. hyosynoviae</i>	+	-	-	+/-	-
<i>P. multocida</i>	-	+/-	-	+	-
<i>B. bronchiseptica</i>	-	-	-	+	-
<i>A. pyogenes</i>	+	-	-	+	-
<i>E. rhusiopathiae</i>	+	-	-	-	-
<i>A. pleuropneumoniae</i>	-	+	-	+	-
<i>E. coli</i> (doença do edema)	-	-	-	-	-*

* Causa encefalite.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o sucesso do isolamento ou detecção do *H. parasuis* é imprescindível selecionar animais que estão apresentando sinais clínicos da forma aguda (inchaço nas articulações, tosse ou sinais nervosos), que estejam em estágios iniciais da infecção e que não tenham recebido tratamentos com antibióticos há pelo menos uma semana. Após selecionar uma amostra representativa, “eutanasiar”, necropsiar e colher fragmentos das membranas serosas inflamadas, exsudatos pericárdico, torácico e abdominal, sangue cardíaco e líquido cefalorraquidiano. Com auxilio de suabe pode-se amostrar lesões sistêmicas, colhendo o exsudato fibrinoso presente na superfície do pericárdio, da pleura, do peritônio, e das articulações e fluido cerebroespinal.

A amostragem de animais mortos reduz significativamente as chances do isolamento de *H. parasuis*. Amostras pulmonares somente devem ser coletadas nos casos da forma pneumônica, pois o *H. parasuis* é comensal do trato respiratório superior, podendo ser isolado ou encontrado na cavidade nasal, nas tonsilas e na traqueia de animais sadios ou enfermos. Portanto, suabes nasais não devem ser incluídos, visto que as fossas nasais são colonizadas basicamente por cepas não patogênicas, o que pode comprometer a confiabilidade do diagnóstico. Sendo assim, somente os isolados provenientes de órgãos sistêmicos (sítios não respiratórios), como cérebro, pericárdio, pleura, peritônio e articulações, devem ser submetidos a isolamento e diagnóstico de *H. parasuis* ou inclusão em vacinas autógenas.

No caso de se optar por líquido sinovial e fluidos das cavidades peritoneal, pericárdica e torácica, pode ser colhido com seringas estéreis. *H. parasuis* permanece viável mais tempo em tecidos quando comparado com suabes.

As amostras colhidas (suabes, tecidos e fluidos) devem ser refrigeradas imediatamente a 4°C, visto que *H. parasuis* é extremamente sensível à temperatura, tendo em conta que o tempo de sobrevivência do *H. parasuis* em PBS é de uma hora a 42°C, duas horas a 37°C e 8 horas a 25°C. O tempo entre a coleta e o processamento não pode exceder a 24 horas^[2,5].

No caso de sorologia, destinar ao laboratório 3 a 5mL de soro. Se o período entre a coleta e o processamento laboratorial do soro ocorrer em até 48 horas, o soro pode ser armazenado e transportado sob refrigeração (2-4°C); caso contrário, deve ser congelado (-20°C). É importante salientar que o diagnóstico sorológico tem valor limitado, dada a possibilidade de o agente ser parte da microbiota.

Para exame histopatológico, enviar para o laboratório de diagnóstico fragmentos de diferentes órgãos/tecidos, que possam ser utilizados tanto na pesquisa de lesões clássicas da doença de Glässer quanto para o estudo diferencial. As amostras de tecidos/órgãos devem ser fixadas em solução tamponada de formalina a 10%.

Referências bibliográficas

1. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. 456p.
2. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
3. MENIN, Á.; GAVA, D.; VAZ, E.K. General points about the infection by *Haemophilus parasuis* in swine. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 4, n. 2, p. 148-156, 2005.
4. OLIVEIRA, S. *Haemophilus parasuis* diagnostics: diagnostic notes. **J Swine Health Prod.** v. 15, n. 2, p. 99-103. 2007.

5. OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: New trends on diagnosis, epidemiology and control. **Veterinary Microbiology**. v. 99, p. 1-12. 2004.
6. OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates based on Rep-PCR fingerprinting. In: ANNUAL MEETING OF THE CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES, 83, 2002, Saint Louis, EUA. **Proceedings...** Saint Louis, 2002. p. 150.
7. OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. **Journal of Swine Health and Production**. v. 10, p. 221-225, 2002.
8. OLIVEIRA, S.; GALINA, L.; PIJOAN, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 13, n. 6, p. 495-501. 2001.
9. RAPP-GABRIELSON, V.J.; OLIVEIRA, S.R.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*. In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 681-690, 2006.
10. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs.). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.

1.9 Clostridiose neonatal dos suínos

Conceito

A clostridiose neonatal dos suínos, causada pelo *Clostridium perfringens* Tipo C, geralmente afeta leitões com menos de uma semana de vida, onde a partir da colonização e multiplicação da bactéria, principalmente na região do duodeno, leva a quadro graves de enterite necrótica, destruição massiva das vilosidades, diarreia e toxemia que pode se apresentar de forma superaguda, aguda ou crônica.

Etiologia e Patogênese

Clostridium perfringens é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, imóvel, esporulado (com esporo central), capsulado, que mede 1 a 1,5µm de diâmetro por 4,8µm de comprimento. Cresce em 24 horas em ágar sangue (5% v/v ovino ou equino ou bovino) e produz uma zona variável de β-hemólise^[2]. Os principais fatores de virulência expressos pelo *C. perfringens* são as adesinas, a cápsula, α-toxina ou fosfolipase C (ação lecitinase sobre a membrana celular), beta-toxina (uma poro-toxina que age sobre enterócitos e células endoteliais), enterotoxina e a β2-toxina, descrita recentemente^[1].

C. perfringens Tipo C pode ser o agente primário da enterite ou atuar como coinfecção associada aos casos de colibacilose e/ou rotavirose, aumentando significativamente a taxa de mortalidade. Os clostrídios, por serem esporulados, possuem fácil disseminação e persistência no ambiente.

O leitão ingere a bactéria logo após o nascimento^[4]. A bactéria se fixa no ápice das vilosidades, principalmente do jejuno, por adesinas ou receptores proteicos que se ligam à fibronectina ou ao colágeno, o que favorece a multiplicação e a colonização bacteriana. Quando há baixa imunidade passiva (IgA), a multiplicação bacteriana tende a ser mais intensa, podendo ocorrer a invasão e a multiplicação no epitélio da mucosa e na lâmina própria^[5]. Durante a multiplicação e colonização bacteriana ocorre a produção de diferentes toxinas^[1] (Tabela 12).

Tabela 12. Toxinas do *Clostridium perfringens*, mecanismos de ação e suas principais características de efeito no organismo do animal.

Toxina	Propriedade	Mecanismo de ação	Efeito no organismo
Alfa - α (CPA)	Fosfolipase (lecitinase)	Hidrolisa lecitina (fosfolipídio), membrana celular do endotélio vascular e mitocôndria das células alvo	Hemolítica, leucotóxica causa aumento da permeabilidade vascular e degeneração das células musculares
Beta - β (CPB)	Efeito citotóxico necrosante, letal	Lise celular (enterócitos)	Lise dos enterócitos e necrose da mucosa; é tripsina lável
Épsilon - ϵ (ETX)	Pró-toxina, letal, necrotizante e neurotóxica e fator de edema	Aumento da permeabilidade vascular, citotóxica e citolítica (enterócitos/células do endotélio vascular)	Necrose liquefativa do tecido cerebral, córtex renal; edema perivasicular no cérebro e meninges e aumento da permeabilidade da mucosa intestinal
Iota - ι (ITX)	Pró-toxina, necrotizante	Efeito citotóxico necrosante	Lise dos enterócitos e necrose da mucosa

A α -toxina tem ação lecitinase sobre a membrana celular de eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e enterócitos causando necrose. A β -toxina possui efeito citotóxico necrosante e letal, e a enterotoxina liberada durante a esporulação tem efeito citotóxico, causado a lise dos enterócitos^[3]. A ação conjunta das toxinas causa descamação do epitélio, lesões vasculares intensas, necrose das vilosidades, criptas e lámina própria, levando a um quadro de hemorragia^[4,6]. A morte do animal é decorrente das lesões intestinais e de septicemia^[5]. A ocorrência da doença em neonatos, aparentemente, está associada à presença de fatores antitripsina no colostro, que impedem a degradação da β -toxina pela tripsina^[3]. Quanto menor a intensidade dos fatores imunes atuantes (por exemplo, diminuição da imunidade passiva), mais intenso o quadro clínico.

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da clostridiose neonatal requer a caracterização das lesões histológicas, isolamento bacteriológico e detecção da β -toxina no conteúdo intestinal. Outra possibilidade é a detecção de genes codificadores de toxinas, β -toxina (*cpb*) ou enterotoxina (*cpe*) através da PCR diretamente no contúdo intestinal.

a) Epidemiologia

A doença afeta principalmente leitões nos primeiros dias de vida. Entretanto, são descritos casos em animais de até quatro semanas de idade^[6]. A morbidade pode variar de 9% a 100% e a mortalidade de 4% a 29%, sendo bem inferiores em rebanhos nos quais as fêmeas são vacinadas.

O agente é introduzido nos rebanhos por reprodutores portadores, e a principal fonte de infecção dos leitões recém-nascidos e manutenção do agente no rebanho parecem ser as fezes da matriz^[4]. A transmissão de leitão para leitão envolvendo a forma vegetativa da bactéria também é muito importante. Esporos do clostrídio podem ser encontrados e persistir no ambiente com facilidade, principalmente quando associados à presença de matéria orgânica.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença pode manifestar-se na forma hiperaguda, aguda ou subaguda, de acordo com a idade e o grau de imunidade dos leitões. Na **forma hiperaguda** os leitões desenvolvem, na maioria das vezes, diarreia sanguinolenta e são encontrados mortos 12 a 36 horas após o

inicio dos sinais. A **forma aguda** é caracterizada por um quadro de diarreia marrom-avermelhada com presença de material necrótico acinzentado e intensa desidratação^[4]. Geralmente, a morte ocorre dois dias após o início dos sinais clínicos. Na **forma subaguda** da doença os leitões apresentam diarreia persistente com material necrótico não hemorrágico^[6]. Nesse caso, os leitões morrem com 3 a 5 dias após o inicio dos sinais clínicos ou desenvolvem quadro de refugagem grave.

Na **forma crônica**, os leitões apresentam diarreia intermitente ou persistente, que pode durar uma semana ou mais. Nesse caso, as fezes se apresentam líquidas ou diarreicas, com aspecto amarelo-acinzentado, com ou sem material necrótico e sangue, podendo os quadros de diarreia ser intercalados por fezes escuras e secas^[4,6]. Os leitões apresentam desidratação grave e morrem. Os animais que sobrevivem normalmente desenvolvem quadro de refugagem.

c) Patologia

Na necropsia é possível observar, lesões restritas ao jejuno, que se apresenta com aspecto avermelhado e congesto. Ao abrir a alça intestinal, pode-se observar enterite hemorrágica grave com ulceração intensa da mucosa. Além disso, pode haver a presença de conteúdo hemorrágico que pode estender-se até o íleo. Geralmente são lesões envolvendo grandes extensões do intestino^[4]. Nos casos agudos, subagudos e crônicos a parede do intestino (jejuno) pode estar engrossada^[5,6].

O exame histopatológico revela enterite necrótica grave, necrose com perda das vilosidades, lesão vascular com hemorragia intensa na mucosa e submucosa e algumas vezes enfisema^[3,4,6]. Paralelamente, é possível observar a presença de grande quantidade de bacilos Gram-positivos aderidos à mucosa.

d) Ensaios laboratoriais

O diagnóstico definitivo é obtido através do exame histológico dos tecidos, isolamento e caracterização do agente através do exame bacteriológico ou detecção das toxinas ou respectivos genes codificadores, respectivamente. A detecção da β-toxina no conteúdo intestinal pode ser realizada através da técnica de ELISA. É importante salientar que a presença da toxina não indica que ela esteja em quantidades suficientes para causar lesões^[3]. Já a amplificação de sequências específicas dos genes codificadores da β-toxina (*cpb*) e enterotoxina (*cpe*), em isolados ou no conteúdo intestinal, é realizada através de técnicas baseadas na PCR.

O isolamento do agente deve ser realizado a partir conteúdo intestinal, da porção afetada, obtido pela necropsia, visto que o agente pode fazer parte da microbiota entérica do animal. O exame bacteriológico requer a demonstração do agente através do cultivo em anaerobiose, isolamento, caracterização das propriedades morfotintoriais e bioquímicas dos isolados e posterior classificação genotípica através da detecção de genes de interesse codificadores de toxinas, β-toxina (*cpb*) ou enterotoxina (*cpe*).

Atualmente estão disponíveis para a rotina diagnóstica técnicas moleculares baseadas na PCR, como multiplex-PCR, que permite a identificação de genes codificadores das toxinas, β-toxina (*cpb*) e enterotoxina (*cpe*) na mesma reação, a partir de amostras fecais. Essa mesma metodologia pode ser aplicada aos isolados.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir coccidiose (*Isospora suis*), rotavirose (*Rotavírus*), *C. perfringens* tipo A, *E. coli* e gastroenterite transmissível (*Coronavírus*), que também podem provocar destruição de vilosidades.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para isolamento, multiplex-PCR e imunoensaios, coletar amostras de conteúdo e segmentos do intestino delgado (jejuno, íleo e ceco), com conteúdo intestinal.

No caso de animais vivos, colher e enviar para o laboratório conteúdo retal utilizando um suave. Nesse caso, atritar firmemente a superfície da mucosa, garantindo que o algodão fique com a superfície de coleta coberta por material intestinal. Após a coleta, os suabes (reto/intestino) devem ser novamente colocados no envelope.

Em caso de necropsia, o procedimento mais indicado é a colheita de segmentos intestinais, de 5 a 10cm (preferencialmente com lesões macroscópicas sugestivas). Para colher corretamente o segmento intestinal é conveniente fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado, realizando os cortes entre as ligaduras, preservando o conteúdo intestinal na luz. Durante a necropsia, pode ser desejado apenas colher amostras do conteúdo intestinal. Nesse caso, deve-se abrir um pequeno orifício no segmento intestinal alvo e introduzir um suave, girando-o suavemente para recolher uma quantidade satisfatória de conteúdo intestinal. A coleta deve ser realizada imediatamente após a morte do animal, não devendo exceder a 2 horas.

Os segmentos intestinais e suabes retais destinados a isolamento bacteriológico ou análise genotípica (PCR) devem ser enviados sob refrigeração entre 4 e 8°C desde a colheita até o exame para melhorar a viabilidade do isolamento. As amostras não devem ser congeladas. Por se tratar de uma bactéria anaeróbica, é de extrema importância que o tempo entre a coleta e o processamento laboratorial, no caso de exame bacteriológico, não ultrapasse 24 horas.

Para a realização dos exames histopatológicos e imunohistológicos, colher, além dos fragmentos intestinais (com lesões macroscópicas sugestivas) para rotina diferencial, fragmentos de outros segmentos intestinais, bem como de outros órgãos e tecidos, como fígado, linfonodos mesentéricos, baço, rim, sistema nervoso e coração. O material deve ser fixado em solução tampizada de formol a 10%.

Referências bibliográficas

1. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. 456p.
2. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
3. ROOD, J.I.; COLE, S.T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 621-648, 1991.
4. SONGER, G.J.; TAYLOR, D.J. Clostridial infections. In: STRAW B.E. et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 613-628. 2006.
5. SONGER, J.G.; UZAL, F.Z. Clostridial enteric infections in pigs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 528-536, 2005.
6. SONGER, J.G.; GLOCK, R.D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. **Swine Health and Production**, v. 6, n. 5, p. 223-225, 1998.

1.10 Epidermite exsudativa

Conceito

A epidermite exsudativa, ou eczema úmido, é uma doença infecciosa altamente contagiosa, caracterizada por separação das células do estrato granuloso e espinhoso da epiderme, esfoliação

da pele, eritema e séria exsudação que pode levar os animais a desidratação e subsequente morte. A enfermidade é causada pelo *S. hyicus* e afeta, principalmente, leitões entre 5 e 60 dias de idade.

Etiologia e Patogênese

Staphylococcus hyicus subsp. *hyicus* (*S. hyicus*) é um coco, Gram-positivo, imóvel, anaeróbico facultativo, não esporulado, que mede 0,8µm de diâmetro e apresenta-se em arranjos irregulares. Bioquimicamente, é positivo à catalase, negativo à oxidase e variável à coagulase^[6,11]. É considerado químio-organotrófico, com metabolismo respiratório e fermentativo^[11].

S. hyicus é comensal da pele e das mucosas dos suínos. Por se tratar de uma bactéria oportunista, não invasiva, necessita de uma lesão previamente estabelecida (solução de continuidade) para que possa penetrar, como lesões de castração cirúrgica, mossa, infestação por *Haematopinus suis* ou *Sarcoptes* sp., caudotomia, corte de dentes, corte do umbigo, lesões decorrentes e abrasividades de pisos, brigas e mordidas^[6,10].

Inicialmente, *S. hyicus* multiplica-se na lesão pré-existente, atinge a epiderme, adere-se a receptores e passa a formar microcolônias, ocupando grandes áreas^[12,14]. Durante o processo de colonização, a bactéria passa a expressar vários fatores de patogênese. O mais importante fator determinante da virulência são as toxinas esfoliativas. As toxinas esfoliativas identificadas e caracterizadas até o momento são: ExhA, ExhB, ExhC, ExhD, SHETA e SHETB. Essas toxinas se caracterizam por ser específicas a proteases glutamato-serinas que degradam estruturas constituintes dos desmossomas, como a desmogleína1 (Dsg-1), resultando em perda da camada superior da pele (esfoliação)^[4,7,10,12]. Outro importante fator de patogênese produzido pelo *S. hyicus* é a lipoase, hidrolase de éster-glicerol que catalisa a hidrólise de ligações éster em acilgliceróis de cadeia longa. A ação da lipoase de *S. hyicus* está associada a lesões no tecido epitelial e lesões hepáticas e renais, e frequentemente está envolvida em surtos de epidermite exsudativa que cursam com alta mortalidade^[9,13].

A ação citolítica dos fatores de patogênese e a ação antigênica da bactéria induzem a um processo inflamatório, aumento da espessura da epiderme, exacerbão da produção de secreção sebácea e de exsudado seroso^[8,10].

Outros estafilococos também podem causar essa doença, como é o caso do *S. chromogenes*, que causa dermatite pustulada com exsudação, formação de crostas, erosão, hiperqueratose, acantose e infiltrado perivascular na derme, e de *S. sciuri*, altamente patogênico, associado a casos de epidermite fatal.

Diagnóstico

De modo geral, os sinais clínicos e as lesões clássicas na pele possibilitam um diagnóstico bastante seguro. Entretanto, a confirmação deve ser realizada através de exame bacteriológico e isolamento de *S. hyicus*.

a) Epidemiologia

S. hyicus é altamente contagioso e facilmente difunde-se de um rebanho para outro, sendo a introdução de animais portadores o principal fator de difusão da doença. *S. hyicus*, além de ser comensal da pele e da mucosa dos suínos, pode multiplicar-se no trato reprodutivo da fêmea e infectar os leitões durante ou imediatamente após o parto^[6,14].

O período de incubação da bactéria é de aproximadamente 15 dias e afeta principalmente leitões de uma a sete semanas de idade^[10,11]. Em geral, a frequência e a gravidade da doença estão associadas às deficientes condições de higiene, à ocorrência de infecções secundárias e à baixa eficácia do tratamento. A morbidade pode variar de 10% a 90%, e a mortalidade de 5% a 90%^[2,12].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a epidermite exsudativa pode manifestar-se na forma aguda, mais frequente em leitões lactentes, na forma subaguda, ou na forma crônica, principalmente em animais da fase de creche.

A **forma clínica aguda** é a mais frequente. Os leitões apresentam, inicialmente, apatia, depressão, amontoamento. Nas fases iniciais da doença aparecem máculas marrom-avermelhadas nas regiões com poucas (ou sem) cerdas, como nas regiões ventro-abdominal, inguinal, ao redor dos olhos, focinho, bandas coronarianas e orelhas. As lesões não são acompanhadas de prurido.

Com o evoluir do quadro clínico surgem vesículas que se alastram por todo o corpo, com aparência pustulada ou vesicular de 3 a 5cm de diâmetro que, ao romperem, resultam em exsudação serosa amarelada^[8,14]. Rapidamente, a pele dos animais é coberta por uma camada de exsudato úmido gorduroso (sero-seboso), formando uma crosta escura e tornando a pele enrugada. A exsudação favorece a aderência de matéria orgânica, expansão e crescimento bacteriano autóctone, que passa a causar, além de necrose, odor desagradável.

Os animais acometidos apresentam abatimento, perda de peso, diminuição do crescimento associada à anorexia, desidratação grave. A morte ocorre geralmente em 3 a 5 dias decorrente da desidratação grave^[14]. Além disso, as toxinas esfolitivas (ExhA, ExhB, ExhC, ExhD, SHETA, e SHETB) e a lípase, produzidas pelo *S. hyicus*, à medida que atingem a corrente sanguínea, podem causar lesões hepáticas e renais, o que contribui para aumentar as taxas de mortalidade^[2,3,7,9,13].

De maneira geral, nem todos os leitões da mesma leitegada são afetados, sendo a intensidade das lesões variável de animal para animal. A recuperação dos animais afetados, quando ocorre, é lenta e normalmente permanecem sequelas associadas ao retardo do crescimento. A presença de infecções secundárias pode causar o agravamento do quadro clínico, aumentar os índices de mortalidade e influenciar diretamente no sucesso do tratamento.

A **forma clínica crônica** afeta principalmente leitões de creche e crescimento e, eventualmente, leitoas e porcas. Caracteriza-se por pequenas lesões cutâneas crostosas circunscritas, discretas, de aproximadamente 5 a 10mm, que não coalescem, são recobertas por crostas escamosas de coloração marrom-acinzentada, localizadas principalmente nas regiões dorsal e lateral do pescoço. Dependendo das condições de manejo e ambiência da granja e imunidade dos leitões, o estado geral dos animais nesses casos pode não ser afetado de forma significativa, e a ocorrência da doença pode passar despercebida.

Em animais adultos, a infecção por *S. hyicus* ocorre por ocasião de lesões na pele decorrentes de abrasões pelo piso, queimaduras pelo sol ou cal virgem, infestações por ectoparasitos (por exemplo, sarna) podendo causar lesões focais, concentradas principalmente na região do aparelho mamário. Eventualmente, a bactéria pode estar associada a casos de metrite e abortos.

c) Patologia

Na necropsia, os leitões apresentam desidratação intensa, a pele se apresenta enrugada, recoberta por um exsudato úmido seroso/seboso formando lesões crostosas marrom-acinzentadas que se iniciam em torno dos olhos, no focinho, na base das orelhas, nas regiões ventral e escapular e tornam-se generalizadas^[10,11]. Adicionalmente, é possível observar congestão pulmonar e aumento de volume dos linfonodos superficiais. Nos casos agudos e superagudos, observa-se com frequência aumento dos rins, formação de cistos (rim policístico), distensão, dilatação e engrossamento dos ureteres decorrentes do acúmulo de detritos, desbridamento celular, e consequente bloqueio do fluxo urinário. Não obstante, podem ser encontrados cristais de uratos na medula dos rins e acúmulo de líquido mucoide na pelve renal^[8,14]. Abscessos subcutâneos e artrite também podem ocorrer.

O exame histológico de pele da região da epiderme revela acantose, espongílose grave e paraqueratose, com formação de vesículas que evoluem para pústulas, nas quais podem ser encontradas grandes quantidades de cocos^[8,11]. Na derme, é possível observar acúmulo de material proteico, hiperemia na camada papilar e infiltrado inflamatório leucocítico. No sistema urinário, é possível observar ureterite, hidronefrose e pielonefrite, possivelmente associadas à toxina esfoliativa e à lipase^[10,12,13].

d) Diagnóstico laboratorial

O exame bacteriológico é confirmatório. Os isolados podem ser submetidos ao testes moleculares baseados na PCR para detecção de sequências gênicas específicas que caracterizam o *S. hyicus* e seu potencial patogênico.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir sarna sarcóptica (presença de prurido e presença de ácaros no exame de raspado de pele), deficiência nutricional de zinco (paraqueratose), *tiña* (lesão cutânea circular progressiva), ptiríase rósea, varíola suína (lesões sempre localizadas e raramente fatais), síndrome de dermatite e nefropatia suína (SDNS) (reação de hipersensibilidade tipo III, que causa uma vasculite necrotizante sistêmica por depósito de imunocomplexos nas paredes dos vasos dérmicos e nos capilares glomerulares, lesões focais definidas que iniciam na região posterior e nas orelhas). É importante diferenciar as infecções por outros estafilococos, como *S. aureus*, *S. chromogenes* e *S. sciuri*^[1,5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Preferencialmente, coletar amostras de pele ou suaves das lesões cutâneas. No caso de suave, remover cuidadosamente a área escura correspondente à área da lesão crostosa, utilizando uma lâmina de bisturi estéril (desinfetar com álcool iodado, se necessário) deixando limpa a área a ser coletada (coloração rosada). Se necessário higienizar a área superficial. Friccionar firmemente um suave estéril a área da lesão. Não congelar as amostras; elas devem ser armazenadas sob refrigeração a 2-8°C até o processamento laboratorial.

Referências bibliográficas

1. ANDRESEN, L.O. et al. Exudative epidermitis in pigs caused by toxicogenic *Staphylococcus chromogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 291-300, 2005.
2. ANDRESEN, L.O. et al. Production of exfoliative toxin by isolates of *Staphylococcus hyicus* from different countries. **Vet. Rec.**, v. 157, p. 376-378, 2005.
3. ANDRESEN, L.O. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. **F.E.M.S. Immunol. Med. Microbiol.** v. 20, p. 301-310, 1998.
4. AHRENS, P.; ANDRESEN, L.O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 1833-1837, 2004.
5. CHEN, S. et al. A highly pathogenic strain of *Staphylococcus sciuri* caused fatal exudative epidermitis in piglets. **PLoS ONE**, v. 2, n. 1, e147, 2007.
6. DEVRIESE, L.A. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p. 787-792, 1977.
7. FUDABA, Y. et al. *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein-1. **Microb. Pathog.**, v. 39, n. (5-6), p. 171-176, 2005.

8. OBEL, A.L. Epithelial changes in porcine exudative epidermitis. *Path. Vet.*, v. 5, p. 253-269, 1968.
9. ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, v. 82, p. 1005-1014, 2000.
10. SATO, H., et al. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* and its exfoliative activity in the piglet. *Vet. Microbiol.*, v. 27, p. 263-275, 1991.
11. SATO, H., et al. Isolation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs affected with exudative epidermitis and experimental infection of piglets with isolates. *Arch. Exp. Med.*, v. 63, p. 119-130, 1990.
12. TANABE, T. et al. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microb.*, v. 48, n. 1-2, p. 9-17, 1996.
13. TIESINGA, J.J.W. et al. Structural basis of phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *J. Mol. Biol.*, v. 371, p. 447-456, 2007.
14. WEGENER, H.C.; ANDRESEN, L.O.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. *Can. J. Vet. Res.*, v. 57, p. 119-125, 1993.

1.11 Enterite por *Clostridium perfringens* Tipo A

Conceito

A enterite por *Clostridium perfringens* Tipo A é uma doença infecciosa que afeta principalmente leitões não imunes na primeira semana de vida ou leitões desmamados com baixa imunidade passiva caracterizada por diarreia cremosa a pastosa, de cor amarelada.

Etiologia e Patogênese

Clostridium perfringens Tipo A é um bastonete Gram-positivo que possui como principais fatores de virulência: desinas, cápsula e principalmente as toxinas como α-toxina, β-toxina e enterotoxina^[3]. A α-toxina, ou fosfolipase C, possui ação lecitinase sobre a membrana celular, provoca lise de eritrócitos, plaquetas, células endoteliais, enterócitos e consequente necrose. A β-toxina tem sua ação pouco estudada na patogênese, sugerindo ação citotóxica necrotizante. Já a enterotoxina, produzida durante a esporulação, tem efeito citotóxico e causa lise dos enterócitos. Alguns autores sugerem que essa enterotoxina produzida pelo *C. perfringens* Tipo A não tem papel na virulência do agente, estando a patogenia associada à toxina β2-toxina^[2,4,7].

O leitão se infecta poucas horas após o nascimento pela ingestão da bactéria, geralmente presente nas fezes maternas. *C. perfringens* Tipo A faz adesão à parede intestinal mediada por adesinas e se multiplica, colonizando principalmente o jejuno e íleo^[4,6,7]. Em leitões não imunes (com baixa imunidade passiva), ocorre a invasão do epitélio da mucosa, podendo chegar à submucosa. A forma vegetativa produz a α-toxina (lecitinase) e durante a esporulação ocorre a produção da enterotoxina, ou para alguns autores, a β2-toxina, que, devido à atividade citotóxica, causa necrose das vilosidades e, consequente, baixa a absorção de líquidos^[4,7]. Devido à ação da toxina, o leitão desenvolve um quadro de diarreia que pode apresentar-se com diferentes graus de intensidade e gravidade^[2,4]. A morte raramente ocorre, e quando ocorre é decorrente de danos intestinais, desidratação, toxemia ou, principalmente, coinfeções.

Diagnóstico

O diagnóstico conclusivo da infecção por *C. perfringens* Tipo A requer a caracterização das lesões histológicas e a detecção das toxinas ou genes codificadores das toxinas, β2-toxina (cpb2) ou α-toxina (cpa), seja a partir do conteúdo intestinal, seja de cultura pura.

a) Epidemiologia

A doença afeta principalmente leitões não imunes (filhos de porcas não imunizadas) na primeira semana de vida, geralmente 48 horas após o nascimento, podendo os sinais clínicos perdurar 5 a 7 dias^[1,6]. Leitões desmamados e na fase de crescimento, quando sob condições de estresse ou imunossupressão, também podem vir a desenvolver a doença, entretanto esta tende a ter baixa gravidade.

Pode-se encontrar *C. perfringens* como um membro da microbiota entérica dos suínos e, geralmente, é introduzido nos rebanhos por reprodutores portadores.

A principal fonte de infecção dos leitões e a manutenção do agente no rebanho parecem estar associadas ao contato com as fezes contaminadas da matriz na maternidade^[6].

b) Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados são apatia, cerdas eriçadas e sem brilho; desidratação; diarreia cremosa a pastosa, com aspecto amarelado ou às vezes de coloração rosada com presença de muco, normalmente aderida na região do períneo^[5]. O quadro afeta principalmente leitões não imunes na primeira semana após o nascimento. Os sinais clínicos aparecem, geralmente, 48 horas após o nascimento e podem perdurar 4 a 7 dias. Leitões desmamados já com baixa imunidade passiva (cinco a sete semanas) também podem desenvolver a doença^[1,7]. Apesar de a doença causar baixa mortalidade, os leitões que desenvolvem a doença tornam-se refugos e tendem a desenvolver coinfeções.

c) Patologia

Durante a necropsia é possível observar áreas de enterite necrótica hemorrágica principalmente no intestino delgado. A porção intestinal afetada apresenta parede flácida, adelgaçada e com a presença de conteúdo pastoso/aquoso, sem sangue, na luz. A mucosa pode estar levemente inflamada e com a presença de material necrótico aderido^[4,7]. De modo geral, no intestino grosso não são observadas lesões; entretanto, o conteúdo se apresenta pastoso e com aspecto esbranquiçado.

Na histologia é possível observar um quadro de enterite necrótica hemorrágica, com áreas de necrose na mucosa do jejunoo íleo, com grande quantidade de bastonetes aderidos^[5,6].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento da bactéria deve ser realizado a partir do conteúdo intestinal, obtido diretamente das áreas com lesões por ocasião da necropsia. O exame bacteriológico requer a demonstração do agente através do cultivo em anaerobiose (caracterização das colônias), isolamento, caracterização das propriedades morfotintoriais e bioquímicas do isolados e posterior classificação genotípica pela detecção de genes de interesse codificadores de toxinas, β2-toxina (*cpb2*) ou enterotoxina (*cpe*). A detecção da enterotoxina em amostras de fezes possibilita um diagnóstico preciso e pode ser realizada por imunoensaios, como o teste de ELISA.

Atualmente estão disponíveis para a rotina diagnóstica técnicas moleculares baseadas na PCR, como multiplex-PCR, que permite a identificação de genes codificadores das toxinas, α-toxina (*cpa*), β2-toxina (*cpb2*) e enterotoxina (*cpe*) a partir de isolados ou diretamente de amostras fecais.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir coccidiose (*Isospora suis*), rotavirose (*Rotavírus*), *C. perfringens* tipo C e *E. coli*.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para isolamento, testes moleculares (PCR) e teste de ELISA, colher fragmentos intestinais contemplando diferentes segmentos do intestino, como jejunoo íleo e ceco, tendo o cuidado de manter o conteúdo intestinal.

No caso de animais vivos, colher suave retal. Para tal, atritar firmemente a superfície da mucosa, garantindo que o algodão fique com a superfície de coleta coberta por material intestinal. Por ocasião da necropsia, o procedimento mais indicado é a colheita de segmentos intestinais, de 5 a 10cm (preferencialmente com lesões macroscópicas sugestivas). Para colher corretamente o segmento intestinal é conveniente fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado.

Os segmentos intestinais e suaves retais destinados a isolamento bacteriológico ou análise molecular (PCR) devem ser mantidos sob refrigeração (entre 4 e 8°C) desde a colheita até o processamento laboratorial. Não congelar.

Se o objetivo for a realização de exames histopatológicos, coletar fragmentos dos diferentes segmentos intestinais, incluindo obrigatoriamente regiões com lesões macroscópicas sugestivas. Além disso, é importante, visando ao diagnóstico diferencial, coletar outros órgãos/tecidos, como fígado, baço, rins, linfonodos mesentéricos, coração e sistema nervoso central. Todas as amostras clínicas destinadas à histologia devem ser acondicionadas em frasco com solução tamponada de formol a 10%.

Referências bibliográficas

1. COSTA, G.M. et al. Diarreia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. *Arq. bras. med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 3, p. 401-404, 2004.
2. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
3. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
4. ROOD, J.I.; COLE, S.T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, v. 55, p. 621-648, 1991.
5. SONGER, G.J.; TAYLOR, D.J. Clostridial infections. In: STRAW B.E. et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 613-628. 2006.
6. SONGER, J.G.; UZAL, F.Z. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 17, p. 528-536, 2005.
7. WASIŃSKI, B. Contribution of *Clostridium perfringens* type A with β2 toxin gene in aetiology of porcine enteric diseases. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, v. 51, p. 509-513, 2007.

1.12 Infecção por *Clostridium difficile*

Conceito

Doença que afeta leitões na primeira semana de vida, principalmente entre 1 e 5 dias, causando um quadro de diarreia, enterocolite e edema do mesocôlon. É frequentemente associada ao intenso uso de antibióticos, que levam a uma alteração da microbiota entérica e oportuniza a intensa colonização do cólon e mesocôlon pelo *Clostridium difficile*.

Etiologia e Patogênese

C. difficile é um bastonete Gram-positivo, capsulado, móvel, anaeróbico, esporulado, hemólítico. Pode ser encontrado no solo, na água e na microbiota entérica de vários mamíferos, aves e répteis^[3,8].

Os principais fatores de virulência associados à patogênese incluem: adesinas (fímbrias e uma proteína estrutural Cwp66), cápsula e três toxinas: toxina A (TcdA), toxina B (TcdB) e ADP-

ribosiltransferase (Cdt). A TcdA é uma glicosiltransferase com peso molecular de 307kDa. A ação da toxina está baseada nas atividades de enterotoxicidade e citotoxicidade, o que altera a funcionalidade dos enterócitos e resulta na secreção de íons e água para a luz intestinal. Além disso, causa ruptura do citoesqueleto pela ação enzimática nos alvos intracelulares (GTPase Rho - *Ras homolog gene family*), impedindo a síntese proteica e, consequentemente, a divisão celular, levando à esfoliação e morte dos enterócitos (atividade citotóxica). A TcdB é uma glicosiltransferase de 270kDa semelhante à TcdA, com alta atividade citotóxica e baixa função enterotóxica. A Cdt possui duas subunidades: a subunidade Cdtb, que se liga ao enterócito, e a subunidade Cdta, que penetra no citoplasma e causa uma desorganização do citoesqueleto e consequente morte celular^[2,9].

Os leitões se infectam nas primeiras horas de vida, antes do estabelecimento da microbiota definitiva, provavelmente a partir de fezes e da porca ou de esporos presentes no ambiente^[9]. *C. difficile* se adere aos enterócitos através de fatores de adesão (adesinas) e se multiplica (coloniza), preferencialmente no ceco e no cólon^[8]. A germinação dos esporos no intestino grosso geralmente não ocorre de forma significativa, a não ser que haja uma alteração da microbiota entérica, normalmente associada a tratamentos com antimicrobianos. Durante as fases de multiplicação (log) e esporulação da bactéria ocorre a expressão das diferentes toxinas TcdA, TcdB e Cdt (Tabela 13). Essas toxinas, nas regiões do ceco e cólon, atuam sobre os enterócitos e promovem graves modificações no citoesqueleto impedindo a síntese proteica, divisão celular e funcionalidade dos enterócitos. Isso resulta na secreção de íons e água, esfoliação e morte dos enterócitos (necrose), gerando lesões segmentais características^[2,5,6].

Tabela 13. Principais espécies/tipos de *Clostridium* sp., toxinas produzidas, doenças associadas e testes para o diagnóstico presuntivo/definitivo.

Espécie/tipo de <i>Clostridium</i> sp.	Toxina produzida	Doença associada	Teste Diagnóstico
<i>C. perfringens</i> Tipo A	α (CPA) -- lecitinase β2 (CPB2) -- letal necrosante Enterotoxina (CPE) -- citotóxica	Enterocolite necrotizante neonatal suína; toxicose; enterite necrótica em frangos; enterite hemorrágica neonatal bovina e canina	
<i>C. perfringens</i> Tipo B	α (CPA) -- lecitinase β (CPB) -- letal necrosante ε (ETX) -- pró-toxina, letal, aumento da permeabilidade vascular e intestinal	Disenteria em cordeiros; enterite hemorrágica em bezerros e potros	
<i>C. perfringens</i> Tipo C	α (CPA) -- lecitinase β (letal necrosante) Enterotoxina (CPE) -- citotóxica	Morte súbita em caprinos e ovinos; enterite hemorrágica ou enterotoxemia necrótica em leitões recém-nascidos; enterite necrótica em frangos, bezerros, patos e borregos; enterotoxemia em ovinos adultos ("Struck")	Exame histológico Esfregaço Detecção Cultura bacteriológica Detecção de genes codificadores de toxina por PCR
<i>C. perfringens</i> Tipo D	α (CPA) -- lecitinase ε (pró-toxina, letal, aumento da permeabilidade vascular e intestinal)	Doença do rim polposo em ovinos; enterotoxemia em bezerros e enterocolite em caprinos	
<i>C. perfringens</i> Tipo E	α (CPA) -- lecitinase ι (ITX) -- letal	Enterite hemorrágica em bezerros e coelhos	
<i>C. difficile</i>	TcdA (enterotóxica), TcdB (citotóxica), Cdt (lítica)	Enterocolite e diarreia em leitões	

Diagnóstico

O diagnóstico da doença deve ser baseado na observação das lesões, no isolamento ou detecção do *C. difficile* seguido da caracterização do potencial patogênico do isolado ou detecção das toxinas TcdA e TcdB em amostras de conteúdo retal. Todos esses fatores devem ser considerados em conjunto, pois tanto o *C. difficile* quanto as toxinas podem estar presentes em conteúdo intestinal de leitões aparentemente saudáveis.

a) Epidemiologia

C. difficile é frequentemente isolado do ceco e cólon de leitões de 1 a 7 dias de vida, com ou sem sinais clínicos de diarreia^[5,7]. O agente coloniza o trato intestinal antes que a microbiota definitiva se estabeleça, sendo rapidamente eliminado pela microbiota definitiva, provavelmente por competição. Essa característica explica a maior frequência da infecção pelo agente em leitões no período neonatal ou após tratamentos com antibióticos por períodos prolongados ou agentes de largo espectro (penicilinas ou cefalosporinas), que desestabilizam a microbiota autóctone e facilitam a proliferação do *C. difficile*.

A taxa de morbidade varia de 10% a 90% e a de mortalidade é de 50%^[4,5]. Os principais fatores predisponentes para ocorrência e gravidade da doença são: desafio ambiental, tratamentos precoces e em altas dosagens com antimicrobianos de largo espectro, suscetibilidade do hospedeiro e implantação de deficientes programas de limpeza e desinfecção^[9].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, os leitões de 1 a 7 dias de idade podem apresentar diarreia pastosa ou aquosa, amarelada, com aspecto mucoide com ou sem partículas de sangue, desidratação moderada, dispneia moderada, aumento da taxa de mortalidade e morbidade, distensão abdominal, edema escrotal, retardo no crescimento e morte súbita^[5,6] (Tabela 14). O quadro de diarreia pode assumir diferentes intensidades ou mesmo não estar definido de forma característica.

Tabela 14. Critérios e métodos para o diagnóstico da infecção pelo *Clostridium difficile*.

Critério e método para o diagnóstico	Descrição
Dados clínico-epidemiológicos	Leitões de 1 a 7 dias de idade, com diarreia começando logo após o nascimento; diarreia pastosa ou aquosa amarelada, com aspecto mucoide com ou sem partículas de sangue; aumento na taxa de mortalidade; morbidade de 10% a 90% (em média 30%); taxa de mortalidade de 50% (média de 20%); histórico de antibioticoterapia
Lesões macroscópicas	Edema de mesocôlon entre moderado e severo; hidrotórax ou ascite ocasional; conteúdo amarelado de consistência pastosa a fluida no cólon; tifocolite
Lesões microscópicas	Focos supurativos difundidos na lámina própria do cólon; infiltrado linfocitário no mesocôlon; erosões epiteliais da mucosa do cólon; lesões microscópicas em forma de “vulcão” (exsudação de fibrina e neutrófilos para o interior do lúmen do cólon); ausência de lesões perceptíveis no intestino delgado
Bacteriologia e avaliação da presença de toxinas	Detecção das toxinas A e B no conteúdo intestinal e isolamento do <i>C. difficile</i>

c) Patologia

Na necropsia pode ser observado um característico edema de mesocôlon ascendente, ascite, hidrotórax, precipitação de uratos no rim, inflamação e conteúdo pastoso ou aquoso amarelo de consistência pastosa a fluida no ceco e cólon^[4,5,6,8]. Além disso, em alguns casos pode estar presente tifocolite em diferentes graus de intensidade.

No exame histopatológico, a partir de amostras de segmentos intestinais (ceco e cólon), é possível evidenciar edema no cólon ascendente, infiltrado neutrofílico linfocitário e de mononucleares, exsudação multifocal em forma de “vulcão” caracterizado pela exsudação fibrinocatarral para o interior do lúmen do cólon^[6,7]. Além disso, com frequência se pode observar a presença de grande quantidade de bastonetes Gram-positivos aderidos às erosões epiteliais da mucosa do mesocôlon^[8].

d) Diagnóstico laboratorial

Por se tratar de um agente comensal do intestino grosso dos suínos, somente o diagnóstico baseado no isolamento bacteriano, as técnicas moleculares e os imunoensaios têm sua aplicação limitada, sendo necessário realizar o exame histopatológico para confirmar a doença.

Isoladamente, a detecção das toxinas TcdA e TcdB no conteúdo intestinal através do teste de ELISA tem valor diagnóstico questionável, servindo apenas como um dado complementar para confrontar com o quadro clínico-patológico. Ensaios baseados na PCR (multiplex-PCR) e qPCR que possibilitam a detecção de sequências específicas dos genes das toxinas α, β, ε, ι e β2 e o gene da enterotoxina estão sendo utilizados no diagnóstico e na tipificação do *C. perfringens* e do *C. difficile*^[1].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser realizado para excluir a possibilidade de infecções por *Isospora suis*, *C. perfringens* Tipos A e C, rotavírus, *Enterococcus durans*, *Coronavírus* (TGE) ou *E. coli*.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Tanto o exame bacteriológico quanto testes de ELISA podem ser realizados a partir de fragmentos do intestino grosso (ceco e cólon), amostras de conteúdo intestinal ou suabes retais. As amostras devem ser mantidas permanentemente sob refrigeração a uma temperatura de 4 a 8°C. Por se tratar de uma bactéria anaeróbica de crescimento fastidioso, é de extrema importância que o tempo entre a colheita e o processamento laboratorial, no caso de exame bacteriológico, não ultrapasse 24 horas. O material não deve ser congelado.

Para o exame histopatológico, colher fragmentos dos diferentes segmentos intestinais, incluindo obrigatoriamente ceco e cólon, com lesões macroscópicas sugestivas. Além disso, é importante, visando ao diagnóstico diferencial, coletar outros órgãos/tecidos, como fígado, baço, rins, linfonodos mesentéricos, coração e sistema nervoso central. Todas as amostras clínicas destinadas à histologia devem ser imediatamente acondicionadas em frasco contendo solução tamponada de formol a 10%.

Referências bibliográficas

1. BELANGER, S.D. et al. Rapid Detection of *Clostridium difficile* in feces by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 730-734, 2003.
2. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.

3. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
4. MENIN, Á. et al. *Clostridium difficile*: Importante agente associado às enterites neonatais. **Revista Suinocultura Industrial**, p. 63-66, 2005.
5. MENIN, Á.; BOROWSKI, S.M.; KOLLER, F.; BARCELLOS, D.E. Infecção de suínos pelo *Clostridium difficile*. **A hora veterinária**, v. 24, p. 37-40, 2004.
6. SONGER, G.J.; TAYLOR, D.J. Clostridial infections. In: STRAW B.E. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 613-628. 2006.
7. SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 528-536, 2005.
8. SONGER, G.J. et al. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. **Swine Health and Production**, v. 8, p. 185, 2000.
9. YAGER, M.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. A survey of agents associated with neonatal diarrhoea in Iowa swine, including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 281-287, 2002.

1.13 Enteropatia proliferativa suína

Conceito

A enteropatia proliferativa suína, ou ileite, é uma doença infecciosa entérica caracterizada por diarreia muco-hemorrágica e espessamento da mucosa intestinal causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis*. A enfermidade pode apresentar-se na forma de adenomatose intestinal suína (forma crônica), que afeta leitões em crescimento ou na forma de enteropatia proliferativa hemorrágica (forma aguda ou hemorrágica), que acomete animais de terminação e reposição.

Etiologia e Patogênese

Lawsonia intracellularis é um bacilo intracelular obrigatório, Gram-negativo, curvo, microaerófilo e mede 1,25µm por 0,25µm, com flagelo unipolar único, e um genoma que totaliza 1,72 milhão de pb e 1.320 ORFs^[10]. A bactéria não cresce em meios de cultura bacteriológica comuns; necessita, para o crescimento *in vitro*, de cultivos celulares e condições controladas de atmosfera^[4].

A infecção dos animais ocorre pela via oral^[2]. A adesão e a internalização da *L. intracellularis* no enterócito é mediada por uma proteína de superfície (adesina) chamada LsaA (*Lawsonia surface antigen*), que permite a adesão da bactéria a receptores específicos nos enterócitos em atividade mitótica, principalmente da região das criptas do íleo e do cólon^[7]. Nesse contexto, as células M (*Microfold*) parecem ter um papel fundamental para o estabelecimento da bactéria^[10].

Vários fatores de patogênese são produzidos pela bactéria durante a infecção que contribuem de forma decisiva para o desenvolvimento da doença, como a expressão do sistema secretorio tipo III, que facilita a adesão e a colonização por parte da bactéria^[1]. Outro importante fator é o LPS, que, além da atividade endotóxica exercida pelo lipídio A, através de repetições da cadeia O, dificulta a adesão do complexo de ataque do sistema complemento, liga-se a células CD14 através de receptores do tipo *Toll* e induz à liberação de citocinas pró-inflamatórias^[8,10] (Figura 1).

Figura 1. Apresentação esquemática das formas clínicas da Enteropatia proliferativa suína (EPS).

Enteropatia proliferativa suína (EPS)		
Forma clínica		Forma subclínica
Curso agudo	Curso crônico	Curso crônico
Enterite proliferativa hemorrágica	Adenomatose intestinal Enterite necrótica Ileite regional	Redução do desempenho e refugagem

Após a adesão, a bactéria induz a um processo de endocitose e internalização no enteróctito através da polimerização da actina e formação de um vacúolo (fagossoma). Poucas horas após a formação do fagossoma, a bactéria, devido à expressão de toxinas líticas (hemolisinas) ou citolíticas (citolisinas), destrói a membrana do vacúolo fagocítico e evita a fusão fagolisossomal e consequente fagocitose. Depois de ficar livre no citoplasma, a bactéria, por divisão binária, se multiplica e passa a infectar as células adjacentes (células mitóticas das criptas, principalmente do íleo)^[1,3,6].

As células das criptas infectadas entram em permanente mitose, proliferam de forma progressiva, tornam-se hiperplásicas, sem se diferenciar em enterócitos competentes. As criptas assumem formas alongadas/ramificadas caracterizando a enteropatia proliferativa, principal característica patológica da doença^[6,11].

O mecanismo que determina essas transformações celulares ainda não é totalmente conhecido. A proliferação dos enterócitos e a hiperplasia das criptas e vilos (enteropatia proliferativa) não se devem à redução dos níveis de apoptose, mas a fatores induzidos pela multiplicação da bactéria no interior do enteróctito. Os enterócitos afetados expressam baixos níveis de MHCII, o que diminui a apresentação antigenica para o sistema imunológico e proporciona um ambiente seguro para o crescimento da bactéria^[5,6,8]. As lesões degenerativas associadas à tentativa de reestruturação induzem inicialmente a um processo inflamatório, uma reação fibrinosa superficial, seguida de necrose coagulativa extensa e enterite necrótica^[7].

Nos casos crônicos, devido às alterações degenerativas e à imaturidade celular, há perda nos processos enzimáticos de digestão, bloqueio na absorção de nutrientes (aminoácidos e eletrólitos). Consequentemente, ocorre diarreia e perda de peso. Nos casos agudos, a hemorragia é decorrente da degeneração e descamação massiva dos enterócitos e consequente exposição e lesão vascular.

Níveis detectáveis de IgG podem ser observados duas a três semanas após a infecção. A imunidade celular ativa contra *L. intracellularis* é mediada por CD4+ e CD8+ e é evidenciada em animais que se recuperam da infecção. Entretanto, é pouco duradoura, o que reflete a inabilidade do hospedeiro em montar uma resposta imune efetiva contra *L. intracellularis*. Um intenso infiltrado de macrófagos ativados na mucosa intestinal lesionada pode ser observado aproximadamente 14 dias após a infecção, o que parece estar associado com a forma hemorrágica da doença.

Os animais começam a eliminar nas fezes a bactéria aproximadamente 3 dias após a infecção, e isso pode persistir por até 4 meses. *L. intracellularis* sobrevive longos períodos no ambien-

te, principalmente em condições de alta umidade e presença de matéria orgânica. É suscetível à ação de desinfetantes à base de amônia quaternária, iodados, glutaraldeídos e formol^[5].

Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico é realizada através do exame histológico e da detecção do agente através de ensaios moleculares baseados na PCR ou imuno-histoquímica e imunofluorescência direta.

a) Epidemiologia

A enteropatia proliferativa suína manifesta-se como um problema da suinocultura mundial, com expressivo impacto econômico para os países com suinocultura tecnificada. Estudos sorológicos revelam que, em muitos países, 90% das granjas são positivas e, de alguma forma, abrigam o agente.

O principal hospedeiro da *L. intracellularis* é o suíno doméstico, apesar de em raras ocasiões ter sido isolada de cães, coelhos, bovinos e macacos^[2,8]. A doença afeta principalmente leitões em crescimento, terminação e reposição, entre 4 e 12 meses de idade^[6,9]. A transmissão parece estar associada ao compartilhamento de fômites entre baías e instalações, circulação de pessoas no interior da granja, e à presença de reservatórios, como pássaros e roedores, que também poderiam estar associados. A infecção a partir das fezes maternas nos primeiros dias de vida e a transmissão horizontal por animais doentes, portadores, ou com infecção subclínica também parece estar presente^[5,6].

O período de incubação é de duas a três semanas. A morbidade pode ultrapassar 20%, e a mortalidade pode variar de 12% a 50%, na forma aguda. Os principais fatores de risco associados à ocorrência da doença incluem: reagrupamento de animais no caso de múltiplos sítios, oscilações bruscas de temperatura, transporte de animais, trocas de ração, programas de limpeza e desinfecção falhos e falta de vazio sanitário^[6,11].

b) Sinais clínicos

A doença se apresenta sob duas formas clínicas: aguda ou crônica.

Forma aguda (hemorrágica): classicamente, os animais apresentam diarreia escura, com a presença de sangue decorrente da hemorragia intestinal profusa associada ao quadro de enteropatia proliferativa suína^[6,7]. É frequente a ocorrência de morte súbita. Esta forma acomete suíno entre 4 e 12 meses de idade, principalmente animais na fase final da terminação, leitoas de reposição e porcas primíparas^[9]. A mortalidade varia de 12% a 50%, podendo ultrapassar 70% quando medidas de controle não forem implantadas.

Forma crônica: é associada aos quadros de adenomatose intestinal suína (AIS), enterite necrótica (EN) ou ileite regional (IR)^[10]. Os animais apresentam sinais clínicos inespecíficos e nem sempre aparentes, como diarreia intermitente, redução de ganho de peso, desuniformidade e atraso na idade de abate. A forma crônica, afeta principalmente leitões em crescimento entre seis e 20 semanas, nos quais pode passar despercebida ou se apresentar de forma subclínica^[9,11]. A morte nos casos crônicos, quando ocorre, está associada à perfuração da parede do íleo e consequente peritonite^[8].

c) Patologia

Na necropsia é possível observar que as lesões da enteropatia proliferativa suína (EPS) se localizam principalmente na região do íleo. Entretanto, nos casos mais severos, pode estender-se para a porção final do jejuno, íleo, ceco e porção inicial do cólon. Aparentemente, a lesão clássi-

ca da EPS é o engrossamento da parede do íleo, que assume um aspecto cerebroide na superfície serosa, com pregueamento da mucosa, caracterizando o quadro de adenomatose intestinal^[8]. Os demais quadros patológicos que fazem parte do complexo da EPS, como enterite necrótica, ileite regional e enteropatia proliferativa hemorrágica, são condições patológicas/lesões que se sobrepõem à lesão proliferativa básica de adenomatose em uma condição de cronificação da doença^[7].

Na forma aguda as lesões são geralmente restritas à porção terminal do íleo e região proximal do cólon. Nesse caso, são observados congestão, edema do mesentério, edema e engrossamento da parede intestinal, congestão da mucosa e presença de conteúdo fibrino-hemorrágico com coágulos de sangue no lúmen intestinal do íleo e do ceco^[5,8,10]. No reto é possível observar fezes escuras com coágulos de sangue associados a material parcialmente digerido.

O quadro patológico na forma crônica apresenta variações. Classicamente, os segmentos intestinais afetados apresentam serosa com aspecto cerebroide, edema de mesentério próximo à inserção com a alça intestinal lesionada, engrossamento da parede e pregueamento da mucosa do íleo característica da adenomatose intestinal. As lesões tendem a concentrar-se na região do íleo (região ileocecal), cólon e ceco^[7]. Outras lesões podem sobrepor-se à lesão proliferativa básica levando a um quadro de necrose coagulativa fibrinosa superficial e formando uma membrana fibrinonecrótica característica dos casos de enterite necrótica^[8,11]. Apesar de menos frequente, o íleo pode apresentar-se contraído longitudinalmente com “aspecto de mangueira”, com ulerações lineares, fibrosamento e hipertrofia da parede, características de um quadro de ileite regional^[5,7]. Outra característica importante é o aumento dos linfonodos mesentéricos.

Infecções secundárias por agentes como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Actinomyces* spp. ou *Bacteroides* spp. e a presença de agentes imunossupressores, como PCV-2, são frequentes e tendem a agravar a doença^[9,11].

No exame histopatológico, tanto na forma aguda quanto crônica da doença, é possível observar: atrofia de vilosidades; proliferação das células das criptas, que se apresentam alongadas, alargadas, ramificadas, com poucas células caliciformes; e grande número de células epiteliais imaturas mitóticas^[2,7,8]. Nos cortes histológicos, através de ensaios de imuno-histoquímica, imuno-fluorescência ou coloração especial pela prata, é possível observar a presença massiva de bactérias intracelulares curvas, principalmente na porção apical dos enterócitos^[2]. Nos casos mais graves, como na forma aguda, ocorre extensa degeneração e hemorragia da mucosa da região do intestino afetada. É importante considerar que não há presença de infiltrado inflamatório significativo^[10].

d) Diagnóstico laboratorial

Devido às dificuldades de cultivo, a *L. intracellularis* não pode ser isolada em meios de cultura bacteriológica convencionais. Entretanto, exames bacteriológicos ou ensaios moleculares baseados na PCR devem ser realizados para diferenciar das infecções por *Salmonella* spp. e *Brachyspira hyodysenteriae*.

A manutenção em laboratório da *L. intracellularis* é realizada em linhagens celulares como IEC-18 (células intestinais de rato), McCoy (células de camundongo com morfologia semelhante a fibroblasto), INT-407 (linhagem de células de intestino de feto humano) e IPEC-J2 (enterócitos de suínos)^[1,4,8]. As passagens e a manutenção da bactéria em co-cultura requerem atmosfera microaérofila e altos níveis de nitrogênio.

O estudo sorológico envolvendo a detecção de IgG e IgM faz parte da rotina do estudo epidemiológico em muitos países. O exame sorológico é essencial para a determinação da soroconversão e, consequentemente, da fase provável de infecção; daí, o estabelecimento dos programas de vacinação ou programas de tratamento. O exame sorológico, no entanto, tem valor diagnóstico limitado.

A soroconversão em animais na fase de crescimento ocorre três a quatro semanas após o início da eliminação do agente nas fezes. É importante considerar que os animais infectados começam a eliminar a bactéria nas fezes aproximadamente 3 dias após a infecção, podendo persistir por até 4 meses.

Ensaios baseados na PCR possibilitam tanto a identificação do agente em amostras obtidas pela necropsia (segmentos intestinais) quanto em amostras fecais obtidas *in vivo* (1 a 2g de fezes ou suabe retal). Esse tipo de ensaio possibilita determinar a infecção ativa.

O exame histológico de rotina utilizando colorações de hematoxilina e eosina revela morfologia de lesão proliferativa, portanto um diagnóstico sugestivo. Nesse caso, técnicas de coloração pela prata, como Warthin-Starry, podem ser usadas na rotina diagnóstica, pois permitem determinar claramente a presença da bactéria nos cortes histológicos. O diagnóstico imunopatológico baseado em ensaios de imuno-histoquímica e imunofluorescência possibilitam a detecção *in situ* do agente.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir: úlcera gástrica, torção de mesentério, gastrenterite transmissível, peste suína clássica, colite espiroquetal (*Brachyspira pilosicoli*), disenteria suína (*B. hyodysenteriae*), *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* Tipo A, salmonelose (*Salmonella Typhimurium*), colibacilose (*Escherichia coli* enterotoxigênica) e hipersensibilidade à soja.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A colheita de material visando à confirmação do diagnóstico em casos suspeitos de EPS deve, preferencialmente, contemplar leitões com sinais clínicos sugestivos da doença aguda ou crônica.

No caso de animais vivos, colher 1 a 2g de fezes de 10 a 20 animais diretamente do reto utilizando a técnica da mão enluvada ou suave. Quando utilizar o suabe, atritá-lo firmemente à superfície da mucosa, garantindo que o algodão fique com a superfície de coleta coberta por material intestinal.

Por ocasião da necropsia, o procedimento mais indicado é a colheita de fragmentos intestinais de 3 a 5cm (preferencialmente com lesões macroscópicas sugestivas). É conveniente fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado, realizando os cortes entre as ligaduras, preservando o conteúdo intestinal na luz. Para a colheita de amostras do conteúdo intestinal durante a necropsia utilizando um suabe, devem-se abrir pequenos orifícios nos diferentes segmentos intestinais alvos, introduzir um suabe e girar suavemente para recolher uma quantidade satisfatória de conteúdo intestinal.

Com o intuito de assegurar o diagnóstico diferencial, é prudente submeter ao exame bacteriológico fragmentos de fígado, pulmão, linfonodo mesentérico e intestino (jejuno, íleo, ceco e cólon espiral) como medida diagnóstica diferencial para outras enfermidades bacterianas (por exemplo, salmonelose, colibacilose e espiroquetose). Todo material destinado ao diagnóstico bacteriológico ou molecular deve ser conservado sob refrigeração a 4 a 8°C.

Para a realização dos exames histopatológicos e imuno-histopatológicos, tanto na forma aguda quanto na forma crônica da doença colher fragmentos de fígado, de linfonodo mesentérico e de diferentes segmentos intestinais (jejuno, íleo, ceco e cólon) com lesões macroscópicas sugestivas. As amostras clínicas devem ser colocadas em um frascos com solução tamponada de formol a 10%. Para assegurar o diagnóstico diferencial, colher fragmentos de pulmão, linfonodos pulmonares e mesentéricos, rim, fígado, baço, coração e alíquotas representativas do sistema nervoso central e do músculo esquelético.

Para o exame sorológico, coletar amostras de soro, 3 a 5mL. Amostrar grupos de animais de diferentes idades (diferença de pelo menos três semanas de idade), para então poder definir a fase mais provável de infecção.

Referências bibliográficas

1. GEBHART, C.J.; GUEDES, R.M.C. *Lawsonia intracellularis* In: GYLES et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 3. ed. Blackwell Publishing Professional: Ames, Iowa. p. 363-372, 2004.
2. GUEDES, R.M.C. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **Journal of Swine Health and Production**, v. 12, p. 134-138, 2004.
3. GUEDES, R.M.C.; WINKELMAN, N.L.; GEBHART, C.J. Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. **Veterinary Record**. n. 153, p. 432-433, 2003.
4. HIRSH, D.C.; MACLAGAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
5. KROLL, J. et al. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 173-197, 2005.
6. LAWSON, G.H.K.; GEBHART, C.J. Proliferative Enteropathy – Review. **J. of Comparative Pathology**, v. 122, p. 77-100, 2000.
7. McOrist, S. et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 35-45, 1996.
8. MCORIST, S.; GEBHART, C.J. Proliferative Enteropathies. In: STRAW B.E. et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 613-628. 2006.
9. MENIN, Á. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p. 281-286, 2008.
10. SMITH, D.G.E.; LAWSON, G.H.K. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 331-345, 2001.
11. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.

1.14 Erisipela suína

Conceito

Erisipela suína, ou ruiva suína, é uma doença infectocontagiosa do tipo hemorrágica, comum em regiões com suinocultura intensiva, causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Clinicamente, a doença pode estar associada a quadros de septicemia, morte súbita, poliartrites, lesões de pele (*diamond-skin disease*), lesões cardíacas e problemas reprodutivos. Além de ser uma importante zoonose, a erisipela suína faz parte do grupo das “doenças vermelhas”, ou doenças que cursam com lesões hemorrágicas, como peste suína clássica e peste suína africana, sendo, portanto, uma doença de notificação obrigatória.

Etiologia e Patogênese

Erysipelothrix rhusiopathiae (*E. rhusiopathiae*) é um bacilo Gram-positivo curto, com extremidades arredondadas, características filamentosas (forma rugosa) ou de bacilos (forma lisa),

imóvel, anaeróbio facultativo, que mede 0,2 a 0,4 μ m por 0,8 a 2,5 μ m^[1]. A bactéria é muito resistente no ambiente, podendo permanecer até 60 dias no solo e até 6 meses em fezes ou tecidos animais^[2]. Pode ser isolada das tonsilas e do intestino de suínos sadios.

Atualmente, os diferentes fenótipos (sorotipos) de *E. rhusiopathiae* foram reclassificados em quatro diferentes espécies: *E. rhusiopathiae*, única patogênica para o suíno, que compreende os sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N; *Erysipelothrix tonsilarum*, que compreende os sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23; *Erysipelothrix* espécie 1, sorovar 13; e o *Erysipelothrix* espécie 2 sorovar 18^[1,4]. Os sorovares mais frequentemente isolados de casos clínicos em suínos são 1a, 1b, muito virulentos, frequentemente associados a processos septicêmicos agudos e superagudos, e 2, medianamente virulento, associado à forma cutânea, apesar de também poder causar formas subagudas e crônicas^[4,9].

E. rhusiopathiae pode penetrar no organismo por um grande número de rotas, porém a principal via de penetração é a ingestão de água ou alimento contaminados^[7]. A bactéria faz adesão na região das tonsilas ou do tecido linfoide associados à mucosa gastrointestinal (GALTs). A partir do tecido linfoide secundário, ou mesmo através de ferimentos nas mucosas ou na pele, atinge a corrente sanguínea, causa bacteremia/septicemia e passa a localizar-se em diversos órgãos ou tecidos, como coração, baço, rins e articulações^[5,6].

Os principais fatores de virulência da *E. rhusiopathiae* são representados pela cápsula antifagocítica; proteínas de superfície (Spa), responsáveis pela adesão e atividade antifagocítica; neuramidase (sialidase); e hialuronidase, enzima que atua como fator de colonização que facilita a disseminação do agente nos tecidos^[2,9].

Os mecanismos pelos quais *E. rhusiopathiae* determina a patologia ainda não estão bem esclarecidos. A bactéria parece não produzir toxinas, contudo a neuramidase, juntamente com a cápsula, é considerada o principal fator de patogenicidade. A neuramidase é produzida durante a fase *log* de crescimento e exerce papel essencial na adesão celular, na penetração nas células endoteliais, no desencadeamento do dano vascular, na trombose e na hemólise^[2]. À medida que a bactéria atinge a corrente sanguínea, causa bacteremia, septicemia, lesão endotelial, e formação de microtrombos e lesões cutâneas cerca de 24 horas após a infecção^[11]. Durante a migração hematógena, a bactéria pode localizar-se nas válvulas cardíacas e nas articulações, determinando o aparecimento de lesões crônicas de poliartrite e endocardite vegetante^[6].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo é realizado considerando o quadro clínico-patológico e o isolamento bacteriológico ou a detecção do agente através da PCR.

a) Epidemiologia

O reservatório do agente são suínos doentes e portadores, apesar de ter sido isolada de outros animais, como bovinos, ovinos, equinos, aves, anfíbios e peixes. No meio ambiente, a bactéria pode ser encontrada no solo e na água^[2].

Suínos de qualquer idade são suscetíveis, todavia a doença é menos frequente em leitões abaixo de 8 a 12 semanas de idade e lactentes, provavelmente devido à imunidade passiva. Os animais mais suscetíveis são leitões em crescimento, porcas não vacinadas e porcas com mais de quatro partos^[5].

No homem, a bactéria causa uma doença ocupacional chamada erisipeloide, que se caracteriza por um quadro de celulite com aparecimento de lesões no local da inoculação após 2 a 7 dias, podendo a doença progredir para quadros de artrite, poliartrite e endocardite^[1,7].

A doença é considerada enzoótica no Brasil, pois é uma bactéria amplamente distribuída no ambiente e grande número de animais aparentemente sadios mantém a bactéria nas tonsilas, placas de Peyer, válvula ileocecal e no tecido linfático em geral, portanto uma enfermidade de caráter endógeno e exógeno^[1,9].

A principal fonte de infecção são os suínos enfermos e portadores. Mais de 50% dos suínos abrigam *E. rhusiopathiae* no tecido tonsilar pode eliminar a bactéria nas fezes, urina e secreções oronasais, contaminando o solo, a água, a cama, instalações e alimentos, que passam a tornar-se importantes fontes de infecção^[2,3]. No meio ambiente, o principal reservatório para a bactéria são o solo e a água, e o agente pode permanecer viável por mais de 6 meses nas fezes de suínos ou no solo contaminado^[1].

Os índices de morbidade e mortalidade são muito variáveis, de acordo com o *status* imune do rebanho e as condições de manejo. A morbidade varia de 1% a 3% em rebanhos vacinados, podendo chegar a 20% em alguns grupos de animais não vacinados^[1,8].

b) Sinais clínicos

A erisipela suína pode apresentar-se em diferentes formas clínicas, que podem variar desde quadros superagudos, agudos até subclínicos e crônicos^[1,5].

Na **forma superaguda** a bactéria atinge a corrente sanguínea, causa severa septicemia e se distribui de forma sistêmica (articulações, endotélio vascular e endocárdio). Eventualmente, o animal passa a apresentar febre, obnubilação, decúbito e morte^[6]. Frequentemente ocorre morte súbita sem que haja a manifestação de sinais clínicos.

Uma característica importante da **forma aguda** é a febre (41 a 42°C). Os animais manifestam prostração, anorexia, marcha rígida e dolorosa, ataxia, incoordenação, indicando comprometimento articular, cianose em algumas extremidades e alguns animais podem morrer^[1]. A bactéria se multiplica nos vasos sanguíneos causando danos vasculares e obstruindo principalmente capilares cutâneos levando ao aparecimento de lesões cutâneas em forma de eritema e urticária com formato semelhante a um losango (*diamond-skin disease*), em geral 2 dias após a infecção. Essas lesões podem desaparecer em 4 a 10 dias, ou dar origem a áreas de necrose^[5]. Fêmeas prenhas tendem a abortar, e machos desenvolvem disfunções nas células espermiogênicas que determinam infertilidade temporária e pode chegar a cinco a seis semanas^[7]. Os quadros reprodutivos são consequência do estado septicêmico febril, e não porque sejam tais órgãos ou tecidos alvo ou ponto de localização da bactéria.

A **forma subaguda** é mais branda; os animais apresentam inapetência, febre menos intensa (40°C) ou temperatura normal^[1]. As lesões cutâneas aparecem 3 a 4 dias após a infecção e se caracterizam por erupções cutâneas elevadas, quentes e dolorosas. As placas evoluem para crostas, que se desprendem por necrose dérmica (dermatite necrótica)^[6,9].

A **forma crônica** da doença ocorre após a doença aguda ou subaguda e acomete principalmente animais mais velhos^[1]. Os sinais clínicos podem não ser evidentes. A bactéria se instala nas articulações causando artrite crônica (poliartrites) dolorosa, com características típicas de artrite proliferativa, com perda de condição corporal. O curso crônico deriva de uma resposta humorai imune decorrente de uma reação de hipersensibilidade de tipo III^[1,7].

c) Patologia

Nos casos agudos ou septicêmicos é possível observar lesões cutâneas com característica púrpuro-hemorrágica em forma de losango (*diamond-skin lesions*) principalmente na pele do focinho, das orelhas, da mandíbula, do abdômen e das patas^[6]. Também podem ser observados edema e congestão renal, hepática e pulmonar^[1,7].

No exame histológico é possível observar lesões cutâneas com danos no endotélio vascular (arteríolas e vênulas), onde se observa aumento da permeabilidade vascular, congestão, infiltrado perivascular linfocítico e a presença de microtrombos e bactérias em capilares, que ocasionam necrose isquêmica perivascular com coagulopatia generalizada e choque^[1,6]. No fígado, rim, baço, sinovia, sistema nervoso central, músculo cardíaco e esquelético também é possível observar lesões vasculares e intenso infiltrado de linfócitos e macrófagos^[7].

Nos casos crônicos as lesões mais características são endocardite vegetante e poliartrite proliferativa. Nos casos de artrite ocorre espessamento da cápsula sinovial, aumento na quantidade de líquido, que se apresenta serossanguinolento, e proliferação das vilosidades da membrana sinovial, formando o *pannus articular*. Frequentemente pode ocorrer fibrose e anquilose articular^[6]. As lesões histológicas predominantes são artrite proliferativa não supurativa e, ocasionalmente, espondilite^[1,8].

d) Diagnóstico laboratorial

A bactéria é de fácil cultivo, isolamento, caracterização morfotintorial e bioquímica. Tudo isso seguido da sorotipificação, através do teste de imunodifusão em gel, ou genotipificação, através da PCR.

Métodos de diagnóstico molecular para a detecção de *E. rhusiopathiae* no sangue total, baseados na PCR, também tem sido utilizados com sucesso.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da infecção por *E. rhusiopathiae* em suínos deve incluir outras patologias que cursam com septicemia, como peste suína clássica, peste suína africana, actinobacilose, pasteureloses, salmonelose septicêmica e *Streptococcus suis*, patologias que cursam com processos articulares como doença de Glässer, artrites por *Streptococcus* spp., *Mycoplasma synoviae*, *Arcanobacterium pyogenes*, condições assépticas (osteocondrose e artrite traumática) e lesões de pele causadas pelo PCV-2 também devem ser incluídas no diagnóstico diferencial.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material indicado para ser submetido ao exame bacteriológico são amostras de órgãos/tecidos como tonsilas, baço, coração, fígado, rim, articulações, pele e linfonodos.

Para exame bacteriológico e/ou molecular baseado na PCR, coletar sangue e, no caso de coleta em abatedouro ou por ocasião da necropsia, enviar tonsilas (para identificar portadores ou rebanhos positivos), fígado, baço, rim, linfonodos, coração (sangue cardíaco/válvulas cardíacas), articulações (tecido ou líquido sinovial) e amostras de pele. Raramente é obtido êxito no isolamento a partir de lesões de pele ou lesões articulares crônicas. No caso de aborto, enviar fetos abortados.

O exame direto pode ser realizado a partir de sangue periférico ou cardíaco, tonsilas, fígado, baço, rim e pele. Para exame histopatológico, enviar fragmentos de tecido cutâneo, tonsilas, fígado, baço, rim, linfonodos, coração e articulações. O material deve ser fixado em solução tamponada de formalina a 10%.

Para o exame sorológico, coletar amostras de 3 a 5mL de soro, que deve ser mantido refrigerado ou congelado. Amostrar grupos de animais de diferentes idades (diferença de pelo menos três semanas de idade), para então poder definir a fase mais provável de infecção. Deve-se, obrigatoriamente, considerar os animais vacinados e filhos de fêmeas vacinados na interpretação dos resultados.

Referências bibliográficas

1. BROOKE, C.J.; RILEY, T.V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 789-799, 1999.
2. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
3. OLIVEIRA, S. et al. Swine erysipela: culture of *Erysipelothrix* spp. from the tonsils of slaughtered pigs – results of antimicrobial susceptibility tests. **Veterinária em Foco**. v. 3, n. 1, 2005.
4. TAKAHASHI, T. et al. A taxonomic study on erysipelothrrix by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. **Microbiology and immunology**, v. 52, n. 10, p. 469-478, 2008.
5. TAKAHASHI, T. et al. Serotype, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 536-539, 1987.
6. WOOD, R.L.; HENDERSON, L.M. Erysipelas. In: STRAW B.E., et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 629-638. 2006.
7. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.
8. WOOD, R.L. Swine erysipelas – a review of prevalence and research. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 184, p. 944-949, 1984.
9. YAMAMOTO, K. Serovar, pathogenicity and antimicrobial susceptibility of *E. rhusiopathiae* isolates from farmed wild boars (*Sus scrofa*) affected with septicemic erysipelas in Japan. **Res. Vet. Sci.**, v. 67, p. 301-303, 1999.

1.15 Infecção urinária

Conceito

Infecção urinária (IU) pode ser definida como sendo a penetração, multiplicação e colonização de microrganismos patogênicos nas vias urinárias, podendo atingir todo o aparelho urinário, vias urinárias superiores e inferiores, ou somente parte deles. Frequentemente, a infecção é causada por uma flora mista pertencente à microbiota urogenital que se multiplica de forma exacerbada e adquire características próprias, sendo menos comuns infecções causadas por um único agente.

Etiologia e Patogênese

O aparecimento das infecções urinárias depende da interação multifatorial negativa entre variáveis como pressão de contaminação ambiental, manejo, alimentação, instalações e condições fisiológicas e anatômicas do próprio animal. Nessas condições, agentes que em condições normais são constituintes da microbiota urogenital multiplicam-se de forma exacerbada e adquirem características patogênicas ou anfibiônticas na relação com o animal. As bactérias que mais frequentemente estão associadas com a IU são: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Aeromonas hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* e *Actinobaculum suis*^[3].

Os principais mecanismos de defesa do sistema genitourinário são: o fluxo da urina, que promove uma autodepuração do sistema; atividade controladora do pH; microbiota adaptada e controle da microbiota associada; pH; epitélio escamoso; e muco rico em glicosaminoglicanos. Todos os fatores/mecanismos que comprometem os sistemas de defesa ou induzem ao desequilíbrio anfibiônico dos componentes da microbiota favorecem a ocorrência da IU, com incidência e gravidade proporcionais.

Diagnóstico

Apesar de IU em porcas nem sempre induzir a manifestações clínicas evidentes, o diagnóstico deve considerar os sinais clínicos individuais e coletivos, condições epidemiológicas, fatores de risco e estudo patológico no abatedouro ou na necropsia de fêmeas que vêm a óbito. Entretanto, a prevalência da IU, a identificação dos microrganismos envolvidos e a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* para agentes antimicrobianos somente podem ser concretizadas com exames laboratoriais, como exame bacteriológico, imunoensaios e análise físico-química da urina.

a) Epidemiologia

A IU é a principal causa de morte de fêmeas reprodutoras suínas, sendo responsáveis por aproximadamente 50% dos casos de mortes súbitas. Afeta principalmente fêmeas com quatro a cinco ciclos produtivos e acima de 60 dias de gestação^[3].

As perdas associadas às IUs estão relacionadas à mortalidade de fêmeas em diferentes fases do ciclo produtivo e aos problemas reprodutivos e produtivos, como esterilidade, infertilidade, proliferação, taxa de retorno ao cio, síndrome MMA, diminuição na produção de leitões, descarte de fêmeas, taxa de partos, dias não produtivos, além da perda da oportunidade.

A infecção do sistema urinário tem início quando microrganismos componentes da microbiota, em decorrência de fatores predisponentes ou de risco adquirem características anfibiônticas ou quando microrganismos ambientais atingem as vias urinárias superiores e encontram fatores predisponentes ou de risco que favorecem seu estabelecimento e multiplicação. Em ambos os casos, está sujeita a penetração, multiplicação e colonização de forma patogênica das vias urinárias, podendo atingir uma parte do – ou todo o – aparelho urinário, como vias urinárias inferiores (uretra e bexiga) e superiores (ureter e parênquima renal). Sendo assim, todas as medidas que reduzam os níveis de desafio, aumentem a produção de urina e o número de micções diárias, mantenham a estabilidade da microbiota e mantenham a eficiência do sistema imune são benéficas para a prevenção da IU.

Os principais fatores de risco associados com a ocorrência e intensidade dos casos de IU incluem: anatomia do aparelho urinário da fêmea, relação da vulva (rima vulvar) com a fonte de infecção, eficiência dos programas de limpeza e desinfecção das instalações, transtornos locomotores, qualidade e quantidade de água disponível, fatores e situações estressantes (mistura de animais, oscilações térmicas), ginástica funcional, desordens endócrinas, composição da ração e manejo alimentar, manejo de arraçoamento, traumatismos do sistema geniturinário, estado fisiológico da fêmea, idade e ordem de parto, desafio infeccioso nos períodos pré- e pós-parto, e quantidade e qualidade da mão de obra^[5].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença pode manifestar-se de forma aguda ou crônica. Os casos agudos são caracterizados por morte súbita; algumas vezes é possível perceber, no período que antecede o óbito, apatia, inapetência e hipertermia. Nos casos crônicos os animais apresentam oscilações de apetite, relutância em se movimentar, emagrecimento progressivo, anemia, polidipsia, disúria, alteração dos padrões físico-químicos da urina (hematuria, piúria e uremia) (Tabela 15) e descarga vulvar purulenta ou sanguinolenta de consistência mucosa que pode ficar aderida nos lábios vulvares, na cauda e no períneo^[1,5]. Considerando as devidas características e proporções, os principais sinais clínicos que indicam a presença de IU em um rebanho são: aumento na taxa de retorno ao cio, aumento na taxa de mortalidade de fêmeas reprodutoras, alta incidência de inapetência ou oscilações de apetite, perda progressiva de escore corporal, baixo desempenho produtivo e reprodutivo, número significativo de casos de descarga vulvar purulenta.

Tabela 15. Características físico-químicas de referência e em casos de infecção urinária (IU).

Variável a ser observada	Valor / característica referência	Valor em caso de infecção urinária (IU)*	Interpretação dos valores/características
Cor	Incolor, amarelo-citrino	Amarelo escuro, avermelhado	A cor é um indicativo para a concentração da urina; quanto menos água for ingerida, maior a concentração e mais escuro é a urina
Aspecto	Límpido	Turva com ou sem presença de material purulento ou grumos	O aspecto da urina tem relação direta com o número de bactérias na urina; a turvação da urina devida à presença de células, bactérias, cristais, pus ou sangue pode ser indicativo de reação inflamatória no trato urinário, entretanto deve ser diferenciada da turvação de urinas muito concentradas que têm intensa precipitação de sais minerais (fosfatos amorfos) que nem sempre têm significado clínico
Depósito (sedimento espontâneo sem centrifugação)	Ausente	Presente*	Indicativo de IU; pode ser constituído de pus, cristais e sangue, os quais, com exceção dos cristais, são visíveis a olho nu
Sedimento (após centrifugar)	Pequenas quantidades de cristais, células epiteliais, sangue, material purulento (bactérias + células descamadas/ inflamatórias) e sangue	Grandes quantidades de cristais, células epiteliais, sangue, material purulento (bactérias + células descamadas/ inflamatórias) e sangue	O exame do sedimento permite identificar a causa da turvação de urina, que pode ser causada por presença de pus, sangue e, às vezes, sais minerais, como os fosfatos amorfos
Odor	Característico	Amoniacal *	Urinhas com odor fortemente amoniacal, turvas, com pus e sangue, são indicativos de bacteriúria com mais de 10^7 UFC
Nitrito	Ausente	Presente *	A presença indica a ocorrência de bacteriúria severa
Sangue	Ausente	Variável *	A hematúria é um sinal clínico de infecção urinária por <i>A. suis</i> ; a urina, nesses casos, apresenta-se com coloração avermelhada e, às vezes, turva
Proteína	30mg/dl	> 30mg/dl *	A proteinúria sozinha não é indicativa de infecção urinária, pois ela pode ser de origem fisiológica
pH	5,5 a 7,5	6,5 a 9 *	Na avaliação do pH da urina, deve-se considerar a composição da ração; quanto mais alto o teor de proteína de origem animal, maior a tendência da urina de apresentar um pH ácido. pH ≥ 8 é um sinal clínico de infecção urinária por <i>A. suis</i>
Densidade	Água suficiente < 1008 Água insuficiente > 1012	< 1008 e > 1012 *	A densidade não é um indicador direto de IU, porém está diretamente relacionada com a quantidade de água ingerida
Creatinina (mg/L de urina)	Água suficiente < 1100 Água insuficiente > 1500	< 1100 e > 1500	A concentração de creatinina na primeira urina da manhã não é um indicador direto de IU, porém está diretamente relacionada com a quantidade de água ingerida

* Dependendo da etiologia infecciosa.

c) Patologia

Nos casos agudos, na necropsia é possível observar: estado nutricional satisfatório, bexiga repleta de sangue, superfície da mucosa recoberta por exsudato catarral ou muco-catarral, hiperemia, e edema da submucosa^[1]. O exame histopatológico revela degeneração e descamação das células epiteliais, infiltrado de monócitos e linfócitos na mucosa e submucosa e, nos casos mais graves, hemorragias em diferentes graus^[4].

Na forma crônica da doença a necropsia revela diferentes graus de anemia, estado nutricional ruim, na abertura da bexiga é possível observar mucosa espessa, irregular, congesta ou hemorrágica com ou sem exsudato catarral ou muco-catarral^[1]. A parede da bexiga pode atingir 2 a 3cm de espessura. Na histopatologia é possível observar hiperplasia e descamação do epitélio, proliferação de tecido conjuntivo, severa infiltração de células inflamatórias mononucleares na submucosa e hipertrofia das camadas musculares na submucosa^[4,5].

d) Diagnóstico laboratorial

O exame bacteriológico permite o estudo da prevalência de infecções urinárias na granja, a identificação dos microrganismos envolvidos e a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* para agentes antimicrobianos^[2]. O exame físico-químico possibilita o estudo de alterações nas características físico-químicas que indicam uma possível reação inflamatória^[1]. O exame físico-químico deve ser realizado logo após a coleta, visto que, mesmo sob refrigeração, os padrões químicos da amostras sofrem alteração progressiva.

e) Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial devem ser levadas em consideração doenças de origem genital em cuja forma de apresentação podem apresentar sinais clínicos similares à IU, como descarga vulvar e doenças associadas a problemas reprodutivos. As enfermidades que causam transtornos reprodutivos podem ser de caráter infeccioso, parvovírus suíno, PCV-2 e endometrite, ou não infeccioso, como infertilidade estacional, intoxicação com zearalenona (estrogênica), altas temperaturas ($> 32^{\circ}\text{C}$), deficiência de vitamina A e de riboflavina, e falhas de manejo.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A coleta de urina destinada ao exame laboratorial (exame bacteriológico e análise físico-química da urina) deve ser realizada nas granjas durante a micção espontânea das fêmeas, pela manhã, antes do primeiro arraçoamento. A amostra deve ser colhida em frascos limpos, preferencialmente estéreis, descartando-se os primeiros jatos de urina e colhendo-se uma amostra mínima de 50 a 100mL, a partir da segunda metade da micção. As amostras de urina devem ser conservadas sob refrigeração e imediatamente transportadas ao laboratório para realização dos exames físico-químicos. No caso de necropsia da fêmea ou amostras clínicas coletadas em abatedouro destinadas ao exame histopatológico, colher rim, bexiga e ureteres e fixar em solução tamponada de formol a 10%.

Com o intuito de assegurar o diagnóstico diferencial, é prudente realizar um monitoramento sorológico do rebanho para doenças reprodutivas, como parvovirose, leptospirose e erisipela. Nesse caso, enviar amostras com 3 a 5mL de soro. Além disso, à medida que forem realizadas necropsias de animais com suspeita de infecção urinária, é importante realizar exame histopatológico dos diferentes órgãos/tecidos a fim de garantir o diagnóstico diferencial.

Referências bibliográficas

1. DROLET, R.; DEE, S.A. Diseases of the urinary system. In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 199-218. 2006.
2. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
3. MENIN, Á. et al. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 199-206, 2008.
4. PÔRTO, R.N.G. et al. Aspectos histopatológicos do sistema urinário de matrizes suínas descartadas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 109-112, 2004.
5. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Orgs.). **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.

1.16 Leptospirose

Conceito

Leptospirose é uma doença infectocontagiosa sistêmica, de caráter agudo ou crônico, causada por diferentes espécies e sorovares do gênero *Leptospira* spp. A doença é associada a quadros septicêmicos e graves alterações inflamatórias no aparelho geniturinário que levam a distúrbios reprodutivos. É uma zoonose de extrema importância, sendo obrigatório o controle da doença em granjas de reprodutores suídeos certificadas (GRSC)^[1].

Etiologia e Patogênese

As leptospiras patogênicas estão divididas em 23 sorogrupos e aproximadamente 230 sorovares ou sorotipos. Em suínos, a infecção e as perdas reprodutivas estão associadas principalmente à espécie *L. interrogans*, sorovares Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Gryppotyphosa, Bratislava, Kennewicki, Tarassovi, Muenchen e, em menor grau, o sorovar Sejroe, Hardjo e Copenhagenii^[2,12]. Todas as espécies de leptospiras são uniformes quanto aos aspectos morfológico e fisiológico, mas diferem quanto aos aspectos sorológico e epidemiológico^[11].

Leptospira spp. são espiroquetas que se apresentam como células helicoidais ou espiraladas, finas e flexíveis, com 10µm de comprimento por 0,2µm de diâmetro, e as extremidades em forma de ganchos em “S” ou de “C”^[4]. A movimentação ativa é mediada por uma fibrila axial e endoflagelo, que permitem rotações e flexões ao longo de seu próprio eixo e determina movimentos ondulares e de rotação. Sua multiplicação é por fissão transversa^[7].

Apesar de ser considerada Gram-negativa, *Leptospira* sp. não é corada pelo Gram, e quando coradas pelo Giemsa, algumas se coram em vermelho, outras em azul. São visíveis em microscopia de campo escuro ou contraste de fase em aumento de 100 vezes^[3].

As leptospiras são sensíveis a desinfetantes, detergentes, pH ácido e ressecamento. Temperaturas acima de 50°C ou abaixo de 10°C também destroem o agente. A produção da catalase e a capacidade de formação do biofilme possibilita a viabilidade prolongada do agente no ambiente, que pode chegar a 180 dias em solo saturado, neutro ou levemente alcalino^[3,12].

Os principais fatores de patogênese da *Leptospira* sp. incluem a capacidade de motilidade, a quimiotaxia por fatores específicos do hospedeiro, a constituição da parede celular e a produção de uma hemolisina/citotoxina com atividade esfingomielinase C.

L. interrogans possui mais de 80 genes envolvidos na motilidade e na quimiotaxia. A quimiotaxia por fatores como a hemoglobina facilita o processo de disseminação na corrente sanguínea

(leptospiremia)^[7]. Proteínas codificadas pelos genes ligA, ligB, e ligC mimetizam repetições de imunoglobulinas que permitem a adesão a células do hospedeiro e facilitam a invasão dos tecidos^[2,7]. A produção de LPS e a síntese de ácido siálico envolvido na sialização da superfície da célula bacteriana permitem maior interação com a célula do hospedeiro e, consequentemente, facilitam a infecção. Já a expressão de hemolisinas, entre elas as esfingomielinases, encontradas nas leptospires patogênicas, são responsáveis por dano ao endotélio vascular, quadros de hemorragias e isquemia^[9,10].

A infecção pode ocorrer por via oral, intrauterina, venérea, conjuntiva, ou através da pele lesada e das mucosas, necessitando poucos microrganismos para infectar um animal suscetível^[4]. O agente atinge a corrente sanguínea e se multiplica durante 2 a 7 dias, principalmente no fígado, causa leptospiremia, e em seguida atinge outros órgãos e tecidos. No caso de animais prenhes, atinge os ovidutos, transpõe a barreira placentária, infecta o feto, penetra nas cavidades serosas e se estabelece no líquido cerebroespinal e nos túbulos renais proximais. Nesse caso, quando não ocorre aborto, o leitão nasce fraco e pode eliminar o agente nas excreções. Em infecções agudas decorrente a pirexia, ocorre hemoglobinúria, icterícia, anorexia e uremia terminal^[2,10]. Em um período de 5 a 10 dias após a infecção é possível detectar títulos significativos de anticorpos aglutinantes que permanecem em elevação nas três semanas seguintes, estabilizando-se e podendo persistir por mais de 6 meses. Com a produção de anticorpos as leptospires são eliminadas dos tecidos, permanecendo apenas nos túbulos renais, fora do alcance dos fagócitos, sendo eliminada através da urina (leptospirúria) durante um período que pode chegar a 3 meses^[4,7,12].

No caso de infecção por *L. pomona*, a leptospirúria tende a ser mais intensa, eliminando mais de 10^6 UFC/ml de urina. Em infecções por outros sorovares, como Bratislava, a leptospirúria é menos intensa, porém as lesões no fígado e em outras vísceras geralmente são mais graves.

Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose, dada a diversidade epidemiológica, deve obrigatoricamente integrar informes clínico-epidemiológicos e patológicos com exames laboratoriais, visto que a confirmação definitiva da infecção deve compreender a demonstração da presença do microorganismo ou dos anticorpos específicos. Considerando que o suíno é um hospedeiro reservatório para alguns sorotipos, deve-se incluir periodicamente a triagem do rebanho, principalmente nos casos de problemas reprodutivos.

a) Epidemiologia

Quando uma espécie animal é infectada por um sorovar de *Leptospira* sp., desenvolve leptospiremia, não apresenta a doença clínica aguda, mas passa a apresentar um quadro de infecção renal crônica que permite que a leptospira se mantenha nos túbulos renais e seja eliminada através da urina. Considera-se essa espécie animal um hospedeiro reservatório, hospedeiro definitivo ou de manutenção^[7,12]. Os roedores, frequentemente, atuam como portadores, sendo considerados uma das principais fontes de infecção para os suínos, outros animais e o homem. Quando um sorovar infecta um hospedeiro não reservatório, ocorre a manifestação da doença clínica.

Os suínos são considerados hospedeiros reservatórios para os sorovares Pomona, Tarassovi e Bratislava, os quais, após a infecção, podem permanecer nos túbulos renais e ser excretados intermitentemente por até 12 meses^[2].

Na suinocultura moderna, a principal fonte de infecção são os animais portadores (hospedeiros reservatórios), que eliminam o agente através da urina, de fetos abortados ou de descargas uterinas, contaminando água, piso e ração. A transmissão ocorre principalmente por contato direto (urina, fetos abortados ou descargas uterinas), ingestão de água ou alimento contaminado. Há também a transmissão vertical ou venérea^[4,12].

b) Sinais clínicos

A infecção apresenta duas fases: leptospiremia, por aproximadamente 7 dias, e leptospirúria, que pode persistir por até 12 meses. Clinicamente, a leptospirose pode apresentar-se sob as formas subaguda e crônica. A **forma subaguda** é pouco perceptível: o animal apresenta prostração, anorexia e febre. A **forma crônica**, ou reprodutiva, caracteriza-se por sinais de transtornos reprodutivos, como: abortos no terço final da gestação, aumento do número de natimortos, leitões fracos, retorno ao cio, infertilidade, leitegadas pequenas e, em alguns casos, hemoglobinúria^[2,4].

c) Patologia

Na necropsia é possível observar focos branco-acinzentados de 1 a 3mm de diâmetro no córtex renal que podem estar rodeados por uma área congestiva, com ou sem a presença de lesões hemorrágicas petequiais. Os envoltórios fetais geralmente se apresentam edematosos e necrosados. Os fetos abortados e natimortos apresentam edema generalizado e presença de líquido sanguinolento nas cavidades, atribuídos à autólise intrauterina após a morte^[2,5]. Algumas vezes, pode ser observada icterícia, principalmente em casos de infecção por *L. Icterohaemorragiae*, *L. Ballum* e *L. Canicola*.

O exame histopatológico revela infiltrado inflamatório, degeneração do epitélio dos túbulos renais e glomérulos. No caso dos leitões, as lesões mais características se concentram no fígado, que apresenta focos de necrose e infiltrado inflamatório^[2,4,7].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo depende do isolamento (de grande dificuldade) ou da identificação ou visualização da bactéria através de microscopia de campo escuro, imunofluorescência direta e histologia utilizando coloração especial pela prata ou, ainda, detecção da bactéria por ensaios de PCR.

O teste de microaglutinação microscópica (MAT) é o procedimento laboratorial mais amplamente empregado para o diagnóstico etiológico da infecção animal, sendo considerado teste referência para o diagnóstico da enfermidade. A técnica permite a demonstração de aglutininas (IgG e IgM) através da reação de soroaglutinação microscópica ante uma coleção de抗ígenos vivos, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR). A presença de anticorpos no líquido da cavidade torácica de natimortos é considerada um indicativo seguro de infecção.

Não há um título sorológico que seja considerado positivo para todos os casos. O ponto de corte (cut off) é a diluição de 1:100, e os soros que apresentarem reação igual ou superior a esse título devem ser reavaliados ante o sorotipo reagente em diluições seriadas de razão 2, a fim de que seja obtido um título de aglutininas. A leptospirose como causa de transtornos reprodutivos só pode ser considerada mediante testes sorológicos consecutivos (amostras pareadas), com intervalo de 21 a 28 dias para que se possa caracterizar a conversão sorológica e avaliar a oscilação dos títulos sorológicos no grupo. Considera-se que títulos acima de 1:400 ou elevação quadruplicada em testes pareados são significativos para o diagnóstico. Títulos maiores que 1:800 são indicativos de animal com leptospirose ativa^[1,12].

A MAT é específica para cada sorovar e fornece dados sobre a situação do rebanho, mas não é definitiva para casos individuais e não identifica ou diferencia uma infecção ativa, aguda ou crônica, e deve-se considerar a possibilidade de reações cruzadas (*L. bratislava* com *icterohaemorrhagiae* e *autummalis* com *pomona* e *icterohaemorrhagiae* com *copenhagenii*). É importante considerar que a soroconversão não ocorre em todos os suínos infectados, sobretudo nos casos de infecção por leptospiras do sorovar Bratislava, em que os animais podem apresentar teste sorológico negativo^[12].

O diagnóstico sorológico de uma infecção ativa depende da demonstração do aumento do título; entretanto, deve-se ter precaução na interpretação dos resultados, levando em consideração o quadro clínico, individual e do rebanho/grupo, e histórico de vacinação (anticorpos vacinais). A vacina induz à produção de IgM e IgG. No entanto, os títulos vacinais geralmente não ultrapassam 1:400 e tendem a diminuir a níveis não detectáveis em aproximadamente 2 meses.

A técnica de ELISA é uma técnica de valor na detecção de imunoglobulinas específicas da classe IgM, IgG e IgA, possibilitando a distinção da infecção recente da ocorrida no passado, com uma única amostra de soro. Essa técnica é mais sensível e específica que a reação de soroaglutinação^[12].

A detecção do agente no sangue, apesar de sugerir leptospirose aguda e ter valor diagnóstico, não é um exame de eleição, pois, a leptospiremia é passageira e o resultado negativo nesse caso não exclui a infecção. Da mesma forma, a presença de leptospiras no trato genital, rins ou urina, e leptospirúria (até 14 dias após a infecção) somente deve ser considerada quando em conjunto com sinais clínicos e resultados sorológicos, visto que pode tratar-se de um animal portador e não doente. A presença de leptospiras em fluidos corporais ou órgãos internos (rim, fígado, pulmão, cérebro ou glândula ad-renal) de fetos abortados ou nascidos mortos tem valor diagnóstico de leptospirose crônica da fêmea e é uma evidência da infecção ativa do feto.

Testes moleculares baseados na PCR realizados a partir de tecidos e urina permitem a amplificação de regiões específicas do genoma bacteriano e consequente identificação seguida da diferenciação entre as espécies patogênicas e não patogênicas de *Leptospira* sp.; entretanto, não identificam sorovares, devendo essa classificação ser realizada por meio de estudo sorológico.

O estudo histopatológico usando cloração especial pela prata (a partir dos rins) pode ser eficaz para a identificação de leptospiras nos tecidos animais. Técnicas imunoquímicas como imunofluorescência direta e imuno-histoquímica utilizando material *post mortem* (rins, fígado, pulmão, útero e ovidutos) permite a detecção das leptospiras em material patológico fixado, que é inadequado para a realização de cultivos quando se quer um diagnóstico rápido.

O exame direto a partir de esfregaço sanguíneo, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) ou *imprint* de tecidos deve ser realizado utilizando técnicas de coloração como Giemsa, Vermelho Congo ou impregnação pela prata (Levaditi ou Warthin-Starry) e visualização por meio da microscopia de campo escuro ou contraste de fase. Deve-se ter cuidado com essa metodologia, visto que as leptospiras são passíveis de ser confundidas com fibrina e com outras estruturas celulares. A pesquisa de leptospiras na urina por microscopia de campo escuro é de baixa sensibilidade, sendo capaz de detectar aproximadamente 10^5 leptospiras/mL.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir enfermidades associadas a problemas reprodutivos de caráter infeccioso, como parvovírus suíno; doença de Aujeszky, peste suína clássica, PCV-2, peste suína africana e endometrite. Causas não infecciosas, como infertilidade estacional, intoxicação com zearalenona (estrogênica), altas temperaturas ($> 32^\circ\text{C}$), sprays à base de cresóis, dicumarol, excesso de nitratos, deficiência de vitamina A e de riboflavina e falhas de manejo também devem ser consideradas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a colheita de soro aconselha-se amostrar ao menos 15% dos reprodutores machos e fêmeas da granja que está sendo investigada, devendo ser coletadas amostras pareadas com intervalo de 20 a 28 dias. As amostras de soro podem ser enviadas sob refrigeração ou congeladas. Granjas de reprodutores suídeos certificadas (GRSC), como parte do Plano Nacional de Sanidade

Suína (PNSS)^[1], devem proceder monitoramento semestral para leptospirose como requisito para certificação. A colheita de sangue deve ser acompanhada pelo Médico Veterinário oficial, devendo ser fornecidos dados de histórico sobre o uso ou não de vacina para facilitar a interpretação dos resultados de exames sorológicos.

As amostras visando a cultivo, imunofluorescência direta, exame direto ou PCR (urina, rins, fígado, pulmão, útero, ovidutos, e fetos abortados e mumificados) devem ser mantidas refrigeradas a 4 a 8°C. Amostras destinadas exclusivamente para imunofluorescência direta e PCR podem ser congeladas.

Para os exames histopatológico, de imunofluorescência direta e imuno-histoquímico, coletar fragmentos de tecidos, como rins, abrangendo o córtex (de preferência em locais onde haja lesões macroscópicas), fígado, pulmão, útero, ovidutos, e fetos abortados e mumificados). Esse material deve ser mantido em solução formalina a 10% tamponada.

Referências bibliográficas

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01de março de 2002, Seção 1, p. 3.
2. ELLIS, W.A. Leptospirosis. In: STRAW B.E. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 691-700. 2006.
3. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
4. LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 296-326, 2001.
5. MARTÍNEZ, J. et al. Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 92-98, 2005.
6. MOREY, R.E. et al. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3510-3516, 2006.
7. PALANIAPPAN, R.U.M. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.
8. REITSTETTER, R.E. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of Leptospira. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 264, p. 31-39, 2006.
9. SHUKLA, J.; TUTEJA, U.; BATRA, H.V. 16S rRNA PCR for differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospira isolates. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 25-30, 2003.
10. YUNYING, L. et al. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of Leptospira interrogans within vitro cultured mammalian cells. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 196, p. 233-239, 2007.
11. XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 3, p. 328-333, 2009.
12. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE,

1.17 Linfadenite granulomatosa

Conceito

A linfadenite granulomatosa dos suínos é uma doença infecciosa, de caráter zoonótico, caracterizada por lesões granulomatosas nos linfonodos mesentéricos e na cabeça, causada por mi-

cobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium avium* (MAC). A doença tem evolução crônica, progressiva, mas aparentemente não afeta o desempenho dos suínos. Entretanto, as lesões causam depreciação das carcaças, o que pode ser motivo de condenação ou destino condicionado quando detectadas na linha de aate.

Etiologia e Patogênese

M. avium subsp. *hominisuis*, *M. avium* (sorovares 1, 2, 4 e 8 principalmente), *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum* e *M. silvaticum* compõem o grupo das micobactérias não tuberculosas, atípicas ou pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium* (MAC)^[3,11]. As micobactérias do MAC são bacilos retos ou levemente curvos, de crescimento filamentoso ou micelial, com 0,2 a 0,7µm de diâmetro e 1 a 10µm de comprimento, considerados bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), citoquimicamente Gram-positivos, aeróbias, e são quimiorganotróficos^[5].

Considerando a relação parasita-hospedeiro, as micobactérias podem ser agrupadas em parasita obrigatório (*M. leprae* e *M. lepraemurium*), parasita intracelular facultativo (*M. avi*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*) e parasita saprófito (a maioria das espécies *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. butyricum* e *M. gordonaiae*)^[4,11,17].

Entre os fatores de patogênese destacam-se os micosídeos de superfície (glicolipídios e peptidioglicolipídios), sulfolipídios e fosfatidil inositol manosídeo, que, pela atividade antifagocítica, impedem a fusão fagolisossomial. Até o momento, não foi identificada a produção de exotoxinas ou enzimas que causam lesão tecidual direta, sendo as lesões associadas a própria resposta imune do hospedeiro^[4,15,17].

Suínos infectados eliminam as micobactérias através das fezes por um período que pode variar de 16 a 65 dias após a infecção, sendo mais intenso, entre 35 e 42 dias após a infecção. A soroconversão ocorre em 30 dias e o aparecimento das lesões em aproximadamente 90 dias^[7,10].

Diagnóstico

O diagnóstico da doença em animais vivos é bastante limitado, não existindo, até o momento, um teste prático e eficiente para a identificação individual de suínos infectados. Atualmente é utilizado o teste de tuberculinização pareada como teste obrigatório para monitoramento da infecção por micobactérias tuberculosas em reprodutores de granjas GRSC^[2,8,10].

a) Epidemiologia

A parede celular das micobactérias é rica em lipídios; isso torna as bactérias hidrófobas e contribui para a alta resistência delas às condições do meio ambiente, podendo ser isoladas do solo, da vegetação e da água. As micobactérias podem sobreviver anos nas instalações, principalmente quando associadas com matéria orgânica. Entretanto, são sensíveis a desinfetantes à base de hipoclorito de sódio, aldeídos e fenóis^[9,17].

A infecção pelas micobactérias ocorre principalmente pela via oral, através da ingestão de material contaminado, como fezes de suínos infectados, cama (serragem ou maravalha), ração, água e solo contaminados, aves domésticas ou silvestres infectadas e roedores. No entanto, os indícios apontam que ocorre transmissão suíno-suíno quando há a presença de fatores de risco que favorecem a contaminação feco-oral. Entre os principais fatores de risco estão a superlotação, deficientes programas de limpeza e desinfecção, pisos compactos na creche, pássaros nas instalações, tamanho dos rebanhos, lotes contínuos, uso de cama (serragem ou maravalha), caixas d'água com biofilme, agrupamento de animais de diversas origens e biossegurança da unidade de produção^[1,9,12,13].

Outras formas de infecção devem ser consideradas, como a utilização de produtos derivados de leite contaminado, fezes, restos de carne bovina não cozida contendo o bacilo viável (*M. bovis*); restos alimentares não cozidos provenientes de frigoríficos, da alimentação de humanos doentes e contato com pessoas doentes (*M. tuberculosis*); contato com fezes ou resíduos da produção de aves domésticas ou silvestres (*M. avium*)^[12,17].

b) Sinais clínicos

Aparentemente, a linfadenite granulomatosa não se expressa clinicamente; é assintomática, não acarretando prejuízos produtivos aos animais, sendo as principais perdas associadas à depreciação das carcaças^[1014].

c) Patologia

Na necropsia/abate é possível observar comprometimento dos linfonodos do aparelho digestivo (linfonodos cefálicos e mesentéricos, ocasionalmente, linfonodos gástricos, hepáticos e mediastínicos), que se apresentam aumentados de tamanho e de consistência firme, com lesões granulomatosas localizadas (granulomas) revelando um padrão típico de formação de tubérculo, facilmente observáveis ao corte^[7,13]. Os granulomas podem apresentar-se como pequenos nódulos branco-amarelados, capsulados com material caseoso amarelado, às vezes mineralizados no interior^[14]. O tamanho varia desde pequenos focos com poucos milímetros até lesões mais difusas, podendo atingir todo o linfonodo.

Não é possível diferenciar com segurança lesões de linfadenite granulomatosa de tuberculose (*M. bovis* ou *M. tuberculosis*) de *Rodhococcus equi*. Entretanto, podem-se levar em consideração algumas características, como: *M. bovis* causa doença progressiva clássica, com formação de tubérculos típicos nos linfonodos do sistema digestivo (mesentéricos) e da cabeça, com metástases disseminadas em vários órgãos, como fígado, baço e pulmão; a infecção por *M. tuberculosis* fica restrita aos linfonodos regionais; já as micobactérias do MAC ficam limitadas aos linfonodos do sistema gastrintestinal e da cabeça. Eventualmente, *Mycobacterium avium* subespécie *hominisuis* pode ser associada a lesões nas vísceras, nos ossos e nas meninges, formando granulomas com necrose caseosa central, normalmente sem uma organização característica de tubérculo^[10,14,15,17].

No exame histopatológico é possível observar granulomas unicêntricos ou multicêntricos, envoltos por uma cápsula conjuntiva, com necrose caseosa central, proliferação de células epitelioides, células multinucleadas (células gigantes) e necrose de caseificação^[7,14,15].

d) Diagnóstico laboratorial

A linfadenite suína é uma doença normalmente assintomática. Em animais vivos o diagnóstico presuntivo da infecção pode ser realizado através do teste de tuberculinização pareada, baseado na hipersensibilidade tipo IV ou retardada utilizando a tuberculina aviária e a mamífera. O teste apresenta sensibilidade e especificidade baixas para identificar animais infectados, sendo utilizado com o objetivo de detectar rebanhos positivos e não especificamente animais infectados. Outro teste passível de usos é o teste de ELISA para detecção de anticorpos circulantes. Deve ser utilizado como teste complementar à tuberculinização^[17].

O teste de tuberculinização pareada com PPD aviária e bovina permite um diagnóstico diferencial presuntivo entre animais com linfadenite granulomatosa e tuberculose. Apesar de o teste apresentar baixa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico individual de animais infectados, é o teste de eleição para identificar rebanhos positivos para micobacterioses^[8,14,17]. O teste requer os seguintes procedimentos: localizar a área de aplicação intradérmica da tuberculina, que

é na face dorsal da orelha, a cerca de 5cm da base em direção ao centro. Aplicar 0,1mL intradér-mico de tuberculina aviária (0,05mg de PPD) na face dorsal de uma orelha e 0,1mL de tuberculi-na bovina ou mamífera (0,05mg de PPD) na face dorsal da outra orelha.

A leitura das reações às tuberculinas deve ser realizada 48 horas após a aplicação, pela me-dição do maior diâmetro da reação. Reações de edema, eritema, hiperemia, hemorragia ou necro-se no local de aplicação das tuberculinas podem estar presentes. Nesses casos, deve ser con-siderado como resultado positivo ao teste para a determinada PPD (Tabela 1)

Tabela 16. Leitura (48 horas \pm 6 horas após a aplicação) e interpretação do teste de tu-berculínização pareada em suínos com PPD aviária e PPD bovina, pela mição do diâmetro maior da reação com régua milimétrica.

Teste comparativo (TA \neq TB)**	Maior diâmetro da reação	Característica da reação	Interpretação ^a
TA > TB	Menor de 0,5cm	Nenhuma	Negativo
	De 0,51 a 1cm	Edema ou hiperemia	Suspeito
	Maior que 1cm	Edema, hiperemia, hemorragia ou necrose	Positivo para <i>M. do complexo avium</i>
TA < TB	Maior que 2cm	Edema, hiperemia, hemorragia ou necrose	Positivo para <i>M. bovis</i> ou <i>M. tuberculosis</i>

^aToda medida acima de 0,5cm no diâmetro maior da reação deve ser considerada como positiva no cálculo da média.

** TA = 0,1ml de tuberculina aviária (0,05mg de PPD) e TB = 0,1ml de tuberculina bovina ou mamífera (0,05mg de PPD).

Fonte: Adaptado^[8,14,17].

A relação entre a reação ao teste de tuberculínização e a observação de lesões no abatedou-ro depende de alguns fatores, como: período decorrido entre a infecção e a realização dos exames, dada a possibilidade de infecções recentes; regressão das lesões com a permanência da sorocon-versão; dessensibilização; ou lesões causadas por outros microorganismos (Tabela 17). As lesões macroscópicas podem levar mais de 90 dias para aparecerem, enquanto que a reação à tuberculina pode ocorrer a partir de 24 dias após a infecção pelo *M. do complexo avium*.

Tabela 17. Relação entre a reação ao teste de tuberculínização e a observação de lesões a necropsia ou abate e possíveis interpretações.

Reação à tuberculínização	Lesão	Interpretação	
Positiva	Ausente	a) b)	Infecções recentes (intervalo menor que 45 dias) Regressão das lesões e permanência da soroconversão
Negativa	Presente	a) b)	Lesões não progressivas antigas com dessensibilização Lesões causadas por outros agentes (<i>Rhodococcus equi</i>)

Fonte: Adaptado de^[2,7,8,13,14].

O diagnóstico sugestivo de linfadenite pode ser obtido pelo exame macroscópico, por oca-sião do abate ou necropsia, dos linfonodos mesentéricos e da cabeça das lesões, os quais classica-mente apresentam granulomas ou material caseoso/mineralizado^[7,8,13].

O exame histopatológico possibilita a identificação bastante segura das lesões microscópi- cas no tecido^[10,17]. Outras técnicas, como as baseadas na PCR, também possibilitam um diagnós- tico definitivo da infecção^[11,16].

e) Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial devem ser levadas em consideração a infecção pelas diferentes espécies de micobactérias tuberculosas e não tuberculosas e as infecções por *Rodococcus* sp., que, na sua forma de apresentação, podem determinar um quadro lesional similar, tanto do ponto de vista macroscópico quanto microscópico.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para cultivo bacteriológico, ensaios moleculares e exame direto do material caseoso (baci- loscopia), coletar linfonodos com presença de granulomas ou material caseoso/mineralizado. O ma- terial deve ser conservado sob refrigeração a 4°C ou congelado até o processamento laboratorial.

Para o exame histopatológico, colher tecido linfoide com lesões macroscópicas sugestivas (granulomas ou material caseoso/mineralizado) fixado em solução de formol a 10% tamponada.

Para o exame sorológico (teste de ELISA), coletar aproximadamente 3 a 5mL de soro e en- viar ao laboratório sob refrigeração. O soro deve ser mantido sob refrigeração entre 4 e 8°C. Ca- so o tempo entre a coleta e o processamento laboratorial ultrapassar 48 horas, as amostras de soro devem ser congeladas a -20°C.

Referências bibliográficas

1. AMARAL, A.L. et al. Fatores de risco, na fase de crescimento-terminação, associados à ocorrência de linfadenite em suínos. **Comunicado Técnico**, n. 297. Embrapa Suínos e Aves, 2002. 4p.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19, de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de março de 2002, Seção 1, p. 3.
3. BULL, T.J., et al. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. **Mol. Cell. Probes.**, v. 17, p. 157-164, 2003.
4. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Pu- blishing. 2004. 456p.
5. HIRSH, D.C.; MACLAGAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
6. MATLOVA, L. et al. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue sam- ples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. **J. Clin. Mi- crobiol.** v. 43, p. 1261-1268, 2005.
7. MORES, N. et al. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. **Pesq. Vet. Bras.** v. 27, n. 1, p. 13-17, 2007.
8. MORES, N. et al. Execução e interpretação da prova tuberculínica pareada em suínos, com tuberculina aviária e bovina. **Comunicado Técnico**, n. 302, Embrapa Suínos e Aves, 2002. 9p.
9. PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM III, J.O. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, n. 17, p. 98-106, 2004.

10. SÁNCHEZ, J.A. Mycobacteriosis due to members of the *Mycobacterium avium* complex in swine: Significance, diagnosis and identification of possible sources of infection. **Outreach Journal**. Madrid, 2009, 4p.
11. SEMRET, M. et al. Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 881-887, 2006.
12. SILVA, V.S. et al. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 52, n. 6, p. 562-566, 2000.
13. SILVA, V.S. et al. Dinâmica da infecção causada por *Mycobacterium avium* em suínos. Avaliação do critério de julgamento e destino das carcaças acometidas. **Comunicado Técnico**, n. 313, Embrapa Suínos e Aves, 2002. 46p.
14. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.
15. THOEN, C.O. Tuberculosis. In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 807-816. 2006.
16. TURENNE, C.Y. et al. Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. **J. Clin. Microbiol.**, n. 44, p. 433-440, 2006.
17. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

1.18 Meningite estreptocócica

Conceito

A meningite estreptocócica é uma doença infectocontagiosa grave, causada pela bactéria *Streptococcus suis*, que afeta leitões desde a fase da maternidade até terminação. Além do quadro clássico de meningite, a bactéria pode estar associada a quadros de septicemia neonatal, broncopneumonia, artrite, pericardite, miocardite, endocardite, infecção urinária e desordens reprodutivas em fêmeas. A doença é uma importante zoonose, associada a quadros de meningite e septicemia (geralmente fatal), endocardite, amigdalite e otite em humanos.

Etiologia e Patogênese

Streptococcus suis (*S. suis*) são cocos Gram-positivos, com aproximadamente 1µm de diâmetro que se apresentam sozinhos, aos pares ou em arranjos em forma de cadeias na coloração de Gram. Quanto à hemólise, podem ser agrupados em: (i) *Streptococcus* tipo alfa (α) hemolíticos, que não lisam eritrócitos mas causam mudança de hemoglobina para meta-hemoglobina; (ii) gamma (γ) hemolíticos (não causam hemólise); e, mais raramente, (iii) beta (β) hemolíticos. Segundo a classificação de Lancefield, que se baseia nas diferenças antigênicas do carboidrato C parede bacteriana, os *Streptococcus* sp. podem ser classificados de A até E e N^[4].

Até o momento foram descritos 35 sorotipos ou variedades capsulares diferentes de *S. suis*, do 1 ao 34 e o 1/2. O sorotipo 2 é o prevalente em todo o mundo, com taxas de portadores superiores a 90%. Esse sorotipo está associado a quadros de meningite tanto em suínos quanto no homem. Podem ser encontrados diversos sorotipos no mesmo animal ou na mesma propriedade, existindo diversidade genética dentro dos – e entre os – sorotipos de *S. suis*^[1].

Entre os fatores de virulência do *S. suis* destacam-se: (i) cápsula: é o principal fator de virulência, constituída basicamente por ácido hialurônico; confere adesão, principalmente a células CD44, proteção contra fagocitose e especificidade de sorotipo; (ii) suilisina/hemolisina, atua co-

mo toxina que une colesterol com ação lítica sobre os eritrócitos; (iii) MRP: proteína de 136kDa presente na cápsula com atividade imunogênica; (iv) EP, proteína de 110kDa, que é secretada no meio pela célula, positivamente associada a virulência; MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), adesinas que se ligam a células M, fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular, conferindo adesão; e (v) ácido siálico, um polissacarídeo capsular que inibe a via alternativa do complemento e protege a bactéria da fagocitose^[1,2,3,6,12].

A principal via de infecção é a oronasal. Por essa rota *S. suis* adere às tonsilas e as coloniza, constituindo-se a principal porta de entrada para o agente, e atinge os linfonodos mandibulares, podendo tornar-se portador do agente sem manifestar a doença clínica. Entretanto, *S. suis* pode provocar quadro sistêmico, causar septicemia, atingindo articulações, meninges e outros tecidos levando o animal à morte em poucas horas, ou, à medida que o agente é fagocitado, evade-se da fagocitose e multiplica-se no interior dos monócitos circulantes, atinge o líquido cerebroespinal e as meninges, desencadeando o quadro clássico de meningite^[5,6].

Aparentemente, a bactéria, ao ser fagocitada, passa a ser carreada pelo organismo através da corrente circulatória e, consequentemente, atinge diferentes órgãos e tecidos (por exemplo, coração, articulações e sistema nervoso central). No quadro de meningite, *S. suis* movimenta-se na corrente circulatória e, ao alcançar o sistema nervoso central, adere às junções intercelulares das células da barreira hematoencefálica e passa a secretar fatores tóxicos que lesionam as células endoteliais e induzem à liberação de citoquinas. Esses fatores poderiam aumentar a permeabilidade da barreira, causar edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e bloqueio do fluxo sanguíneo, características estas observadas nos quadros de meningite^[1,3,7,12].

O habitat do *S. suis* são as tonsilas e o trato respiratório superior, mas sobrevive semanas em tecidos, fluidos, excreções (fezes por 10⁴ dias a 0°C). A bactéria pode sobreviver duas semanas na água a 4°C. É sensível à dessecção, não sobrevivendo na poeira por mais de 24 horas em temperatura ambiente. Tampouco sobrevive à maioria dos desinfetantes usualmente utilizados na suinocultura, como hipoclorito, iodo, clorexidina, formaldeído, amônia quaternária e fenóis, mas resiste ao álcool 70%^[3].

Diagnóstico

Os sinais clínicos e os dados epidemiológicos permitem orientar o profissional para um diagnóstico sugestivo da doença. Entretanto, o diagnóstico definitivo “padrão ouro” é o isolamento com caracterização e sorotipificação do agente.

a) Epidemiologia

A doença é descrita em todos os países produtores de suínos, e apesar de o suíno ser o principal reservatório do *S. suis*, outras espécies podem infectar-se, inclusive o homem; sendo uma importante zoonose. A doença afeta principalmente pessoas que trabalham em contato direto com suínos ou carcaças em abatedouro e tende a manifestar-se por quadros de meningite e septicemia (geralmente fatal), endocardite, amigdalite e otite^[3,4].

A doença afeta leitões de diferentes faixas etárias, desde a fase de maternidade até o abate, sendo surtos mais comuns em leitões entre quatro e 12 semanas de idade, com pico na sexta semana. Em geral, a suscetibilidade diminui com o aumento da idade, e em rebanhos nos quais o *S. suis* é endêmico sempre há uma proporção grande dos animais que se tornam portadores assintomáticos^[11].

A introdução do agente nos rebanhos ocorre, principalmente, por meio de suínos portadores, clinicamente sadios, que albergam o *S. suis* nas tonsilas ou no trato respiratório superior. Os leitões podem infectar-se a partir da porca, logo após o parto, pela via respiratória, ou ainda du-

rante o parto, no canal vaginal. Na fase de creche, crescimento e terminação a transmissão ocorre, basicamente, por via respiratória^[10].

De maneira geral, a morbidade varia de 1% a 25%. Em situações extremas a morbidade pode ultrapassar 50%. A taxa de mortalidade é alta: em geral varia de 4% a 24%. Quando os animais que ficam doentes não são tratados rapidamente, a mortalidade pode chegar a 100%.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença pode apresentar-se de forma superaguda ou aguda/subaguda^[3]. A forma superaguda, ou septicêmica, é caracterizada por morte súbita. A forma aguda, em lactentes, caracteriza-se por apatia, ocasionalmente curto período de diarreia e vômito, hipertermia, cerdas arrepiadas, anorexia, aparecimento de artrite dolorosa e com rubor intenso, tremores musculares, hipersensibilidade e hiper-reflexia, decúbito lateral, pedalagem, sinais nervosos, agonia (nesta fase os animais iniciam um quadro de hipotermia) e morte.

Leitões desmamados normalmente apresentam um período de incubação que varia de um dia a duas semanas e, clinicamente, manifestam: anorexia, apatia, febre, hiperemia da pele, tremores musculares, incoordenação, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, hipersensibilidade ao tato, opistôtono, convulsões, paralisia seguida de hipotermia e morte poucas horas após o início dos sinais clínicos. Os animais submetidos a tratamento normalmente se recuperam.

c) Patologia

Na necropsia é possível observar hiperemia da carcaça, linfonodos congestos, pneumonia, congestão das meninges e de órgãos parenquimatosos, exsudato serofibrinoso e leves aderências envolvendo as serosas (peritônio, pericárdio, pleura, meninges e sinovias), áreas hemorrágicas ou brancacentas no miocárdio e endocardite vegetativa^[1,10]. Na forma aguda pode apresentar, ainda, hiperemia, meningite fibrinopurulenta e líquido cefalorraquidiano turvo (com a presença de pequenos grumos). Nos casos superagudos podem não ser observadas lesões na necropsia.

O exame histopatológico revela encefalite e meningite com exsudação fibrinosa, infiltrado inicialmente de polimorfonucleares (neutrófilos), sendo gradativamente substituídos por monócitos. Além disso, é possível observar edema e congestão das meninges^[1,3]. Em alguns casos pode ser observada broncopneumonia purulenta crânio-ventral secundária e endocardite.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo é obtido pelo isolamento, caracterização e sorotipificação do agente. O exame bacteriológico pode ser realizado a partir de suaves colhidos da meninge ou líquido cefalorraquidiano dos animais afetados, principalmente, nos casos agudos, que cursam com sinais nervosos e sangue cardíaco nos casos de septicemia.

O diagnóstico e a tipificação podem ser realizados através de ensaios pela PCR utilizando primers para cepas específicas para cada sorotipo^[8,9].

O exame histopatológico de fragmentos das meninges e do encéfalo deve ser realizado, obrigatoriamente, para excluir a possibilidade de contaminação das amostras durante a coleta.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve excluir outras doenças e outras enfermidades que cursam com sinais nervosos, tais como doença de Aujeszky, polioencefalomielite, doença do edema, doença de Glässer, listeriose e intoxicação por cloreto de sódio, que devem ser afastadas. No caso das lesões pulmonares, é importante verificar a presença de outros agentes como, *P. multocida*, *M. haemolytica*, *A. suis*, *A. pleuropneumoniae*, e *S. Cholerasuis*. Quando o quadro de encefali-

te ou meningoencefalite ocorre nas fases de creche e início de recria, as principais doenças que podem confundir o diagnóstico, devido à semelhança dos sinais clínicos, são doença do edema e encefalite por *H. parasuis*.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o exame bacteriológico e detecção baseada na PCR, colher suabes da meninge ou líquido cefalorraquidiano (principalmente nos casos agudos, que cursam com sinais nervosos) e sangue cardíaco (septicemia). Para a colheita do líquido cefalorraquidiano, remover a pele e os músculos que recobrem o crânio e a porção cervical ventral. Seccionar os músculos e ligamentos e promover a extensão da articulação, empurrando o focinho de encontro ao dorso fazendo a desarticulação atlantoccipital. Através do canal medular, introduzir um suave no espaço submeníngeo e colher o líquido cefalorraquidiano.

Para a colheita do sangue cardíaco, seccionar as articulações costocondrais no sentido crânio-caudal, iniciando nas primeiras costelas e retirar o esterno (plastrão esternal), permitindo o exame das vísceras torácicas *in situ*. Puxar o conjunto língua-esôfago-traqueia, previamente liberados, até a entrada anterior da cavidade torácica. Seccionar os ligamentos mediastínicos anteriores e tracionar em direção à cauda o conjunto língua-esôfago-traqueia-pulmão-coração, retirando-os da cavidade torácica como um monobloco (língua, laringe, traqueia, esôfago, coração e pulmão). Nessa etapa, fazer a colheita do sangue cardíaco, com seringa ou suave. O material colhido deve ser mantido sob refrigeração (4°C). Não deve ser congelado.

É prudente submeter tanto ao exame bacteriológico quanto histopatológico fragmentos de meninges, cérebro, fígado, baço, coração, e pulmão, linfonodo mesentérico, segmentos dos intestinos delgado e grosso (jejuno, íleo, ceco e cólon espiral), para proceder ao devido diagnóstico diferencial.

Todas as amostras clínicas destinadas ao exame bacteriológico devem ser mantidas sob refrigeração a 4 a 8°C. No caso do exame histopatológico, os materiais devem ser fixados em solução de formol a 10% tamponada.

Referências bibliográficas

1. GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M. The patogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. **Vet. Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 259-272, 2000.
2. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
3. HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Streptococcal disease. In: STRAW B.E. et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 769-784, 2006.
4. HIRSH, D.C.; MACLAGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
5. JACOBS, A.A.; BERG, A.J.; LOEFFEN, P.L. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. **Vet. Rec.**, v. 139, n. 10, p. 225-228, 1996.
6. JING, H.B. et al. Proteome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2. **Proteomics**. v. 8, n. 2, p. 333-349, 2008.
7. LI, Y. et al. Immunization with recombinant *Sao* protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 8, p. 937-943, 2007.
8. MAROIS, C. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. **J. C. M.**, v. 42, n. 7, p. 3169-3175, 2004.

9. SMITH, H.E. et al. The *cps* Genes of *Streptococcus suis* Serotypes 1, 2, and 9: Development of Rapid Serotype-Specific PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3146-3152, 1999.
10. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.
11. ZHANG, A. et al. Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. **Vaccine**. v. 27, p. 1348-1353, 2009.
12. ZHANG, A. et al. Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. **Proteomics**, v. 8, n. 17, p. 3506-3515, 2008.

1.19 Pneumonia enzoótica

Conceito

A pneumonia enzoótica, causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*), é a enfermidade respiratória suína prevalente no mundo.

Estima-se que o agente está presente em 90% das granjas e em 80% dos suínos produzidos de forma intensiva no mundo. Alguns autores ainda citam a ocorrência de uma síndrome denominada complexo de doenças respiratórias suínas (PCRD), causada pela combinação da *Mhp* com agentes bacterianos como *P. multocida*; *A. pleropneumoniae*; *H. parasuis*; *B. bronchiseptica*; *S. suis* e agentes virais como PRRS, PCV-2 e *Influenzavirus A* (H1N1, H1N2, H3N2 e H1N7).

Etiologia e Patogênese

Os representantes do gênero *Mycoplasma* sp. pertencem à classe dos molicutes (do grego, “pele macia”) [7]. Pleomorfos, possuem genoma pequeno, sendo considerados os menores microrganismos autorreplicantes [5,7,17]. Essas bactérias não possuem parede celular. Assim, a estrutura externa é substituída por uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, que é responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana [7,17]. Entre as espécies de importância para os suínos podem ser citados *Mycoplasma hyopneumoniae*, causador da pneumonia enzoótica, *M. hyorhinis*, responsável por quadros de polisserosite e artrite em leitões, *M. hyosinoviae*, associado a processos de artrite em suínos na fase de terminação, e *M. suis*, hemotrófico (ver Eperitrozoönose) [1,2,7].

O *M. hyopneumoniae* é um agente infeccioso não hemotrófico que, devido à ausência de parede celular, é dependente de um contato íntimo com as células do hospedeiro para que possa ser capaz de suprir suas necessidades nutricionais. Essa característica estrutural o torna resistente aos antimicrobianos que agem na síntese dos componentes da parede bacteriana, como penicilinas, cefalosporinas e bacitracinas [8,12].

Aparentemente, *M. hyopneumoniae* só infecta o trato respiratório de suínos, entretanto apresenta diferenças de patogenicidade entre os diversos isolados de campo. Os principais fatores de patogênese associados à virulência do agente são: (i) adesinas, representadas por proteínas da membrana AAKP (V, E); (ii) peróxidos/superóxidos, responsáveis pela cilostase traqueal e hemólise *in vitro*; (iii) proteínas com configuração de superantígenos, que se ligam a cadeias V-beta dos TCRs (receptores de células T) e MHCII das APCs (células apresentadoras de antígeno); (iv) lipoproteínas da membrana celular que induzem a uma superativação dos macrófagos e liberação de TNF- α , IL-1 e IL-6; e (v) endotoxinas, diferentes e mais potentes que os lipopolissacarídeos (LPS), são moléculas complexas constituídas de vários açúcares neutros, aminoacúcares, glicerol e ácidos graxos [3,5,6,8,10,12].

A principal forma de transmissão da infecção por Mhp é através do contato direto com as secreções respiratórias de animais infectados e contato com aerossóis induzidos pela tosse^[2]. O tempo de incubação parece depender da intensidade da infecção (dose infectante) nas mucosas traqueal e bronquial^[12].

A patogenia é complexa e envolve aderência, colonização, citotoxicidade, competição por substratos utilizados na nutrição bacteriana, evasão e modulação da resposta imune. Com a infecção da mucosa traqueal e dos brônquios, ocorre a perda da atividade do sistema mucociliar, o comprometimento da limpeza normal do trato respiratório e progressão do agente até os bronquíolos e alvéolos. O Mhp se liga à superfície dos cílios das células epiteliais das vias respiratórias (traqueia, brônquios e bronquíolos), cuja intensa colonização leva à cilostase.

Mhp faz uma adesão firme às células do epitélio do trato respiratório, mantendo-se em arranjo extracelular; essa característica permite à bactéria proteção contra as barreiras de defesa do sistema imune e contra a ação de antimicrobianos. Além disso, a capacidade da bactéria de mimetizar抗原s do próprio organismo (fatores de cobertura ou *mimetism factor*), reconfigurar antigenicamente sua superfície (pela ausência de parede celular), produzir proteínas capazes de ligar-se de forma inespecífica ao fragmento Fc dos anticorpos e produzir proteases anti-IgA permite à bactéria evadir-se ou anular importantes mecanismos de defesa imunológica^[5,8].

Nos casos mais graves podem colonizar bronquíolos e alvéolos. A adesão (adesinas) e colonização da superfície dos cílios induz a uma maior produção de mucina, que favorece a colonização por outros agentes. A partir da adesão e colonização do epitélio, o *M. hyopneumoniae* passa a expressar peróxidos/superóxidos, fatores com efeito citotóxico que atuam sobre a fosfolipase C, induzindo a um incremento de íons intracelulares de cálcio e, consequentemente, causando dano ciliar (cilostase) nas células epiteliais do trato respiratório^[3,12].

As lipoproteínas (semelhantes a uma endotoxina) produzidas pelo Mhp induzem uma rápida e exacerbada liberação de citocinas pró-inflamatórias (FNT-α) e interleucinas (IL-1 e IL-6) por parte dos macrófagos (macrófagos alveolares) determinando um processo inflamatório inespecífico que, de forma indireta, causa lesões no parênquima pulmonar. IL-1 e FNT-α são ativadores de linfócitos T (CD8 e CD4), e o FNT faz a mobilização de neutrófilos; juntamente com IL-6 são considerados mediadores tanto da defesa pulmonar quanto da inflamação. A liberação exacerbada das citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e FNT) causa o recrutamento de células inflamatórias em grande quantidade (principalmente neutrófilos e macrófagos), responsáveis pelas lesões mediadas pela imunidade, no parênquima pulmonar^[10,12]. A multiplicação do *M. hyopneumoniae* no pulmão resulta em um quadro de pneumonia com infiltrado broncoalveolar de macrófagos, neutrófilos e linfócitos.

M. hyopneumoniae também expressa proteínas antigênicas inespecíficas (superantígenos mitogênicos) que, devido à capacidade de ligação a receptores de células B (BCR), exerce atividade mitogênica sobre linfócitos B. Esses fatores mitogênicos desencadeiam uma estimulação policlonal de células B (LB), inclusive direcionados contra抗原s do hospedeiro e superativação de macrófagos alveolares, interferindo na fagocitose alveolar^[8,10]. A ação mitogênica das proteínas antigênicas (superantígenos) do Mhp desencadeada pela capacidade de ativar grandes populações de LT, através da exposição a vários epítópos altamente imunogênicos e à hiperplasia celular como tentativa de reparar os danos e perdas teciduais, é responsável pela hiperplasia linfocitária peribronquiolar característica da doença^[12,16].

A supressão do sistema muco-ciliar impede a limpeza das vias aéreas inferiores, atuando como fator para infecções secundárias (pneumonias) por agentes bacterianos (*P. multocida* tipo A, *S. suis*, *A. pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica* e *H. parasuis*) ou agentes virais^[16] (Figura 2).

Figura 2. Dinâmica da pneumonia enzoótica e interação entre agentes bacterianos e virais para formação do complexo respiratório.

Dinâmica da pneumonia enzoótica e formação do complexo respiratório		
Infecção subclínica por <i>M. hyopneumoniae</i>	⇒	Tosse crônica, atraso de crescimento e lesões pulmonares discretas
+		
Infecção por <i>M. hyopneumoniae</i> : fatores de risco e manejo predisponente	⇒	Baixo desempenho de conversão, ganho de peso e casos de pneumonia é pneumonia enzoótica
+		
Infecções secundárias por agentes bacterianos (<i>P. multocida</i> ; <i>A. pleropneumoniae</i> ; <i>H. parasuis</i> ; <i>B. bronchiseptica</i> ; <i>S. suis</i>)	⇒	Baixo desempenho de conversão, ganho de peso e crescimento, casos de pneumonia grave e alta mortalidade
+		
Infecções por agentes virais (PRRSv, PCV-2) ou <i>Influvenzavirus A</i> (H1N1, H1N2, H3N2 e H1N7)	⇒	Complexo respiratório suíno

O período de incubação varia entre 10 e 16 dias, dependendo da dose infectante. *M. hyopneumoniae* pode infectar animais de qualquer idade, principalmente jovens. Entretanto, por ser uma doença de caráter crônico, a manifestação clínica da doença ocorre somente de forma tardia.

Diagnóstico

Os sinais clínicos tosse seca, baixo desempenho do lote, baixa mortalidade e curso lento são sugestivos da doença. Todavia, o diagnóstico definitivo somente é obtido pela somatória do exame macroscópico, histopatológico, sorológico ou PCR, visto que as lesões são inespecíficas e a sorologia permite acompanhar a evolução do problema. O isolamento é extremamente difícil e inviável para o diagnóstico. É importante que os procedimentos diagnósticos sejam estabelecidos em conjunto a fim de entender a dinâmica da infecção e, consequentemente, estabelecer as estratégias de controle adequadas ao desafio nas diferentes condições da unidade de produção.

a) Epidemiologia

Suínos de todas as idades são suscetíveis, entretanto a forma clínica da doença é mais comum nos animais em crescimento e terminação. Em rebanhos sem imunidade a expressão clínica pode ocorrer em animais acima de duas semanas de idade. A taxa de morbidade é alta, podendo chegar a 85% entre 4 e 6 meses de idade; a mortalidade, normalmente baixa, não passa de 7%^[14,15].

Os únicos reservatórios do *M. hyopneumoniae* são os próprios suínos. As fontes de infecção são essencialmente suínos portadores ou doentes, e adquirem importância o contágio vertical a partir da fêmea, e os leitões como fonte para seus pares. Quando a fonte de infecção é a porca, a transmissão ocorre durante a lactação, logo após o parto. Mesmo com essa infecção precoce a

doença clínica não se manifesta antes de seis semanas de idade ou no período de crescimento e terminação. Esse fato sugere que a transmissão vertical é pouco eficiente por um destes fatores: pequena eliminação do agente pela fêmea, imunidade passiva, disseminação lenta, e longo período de incubação^[14,16].

A principal forma de transmissão da infecção por *M. hyopneumoniae* é o contato direto com as secreções respiratórias de animais infectados, os perdigotos. A transmissão por aerossóis pode ocorrer entre granjas a grandes distâncias, podendo chegar a 3km. A transmissão passiva, ou indireta, do agente por fômites, roupas, pessoas e veículos, apesar de ser eventual, também deve ser considerada. No caso de leitões, aparentemente as matrizes são a fonte de infecção^[4,16].

O período de incubação depende da suscetibilidade dos animais, da dose infectante e da virulência da cepa envolvida, podendo oscilar entre 1 dia e 30 meses, ficando geralmente entre 10 dias e 6 semanas^[4].

b) Sinais clínicos

A pneumonia enzoótica caracteriza-se por uma doença crônica com alta morbidade e baixa mortalidade, tendo como principal característica clínica a tosse crônica não produtiva. Em função de complicações secundárias, pode ocorrer dispneia, perda do apetite, febre, prostração, cerdas eriçadas, baixo ganho de peso diário e refugagem.

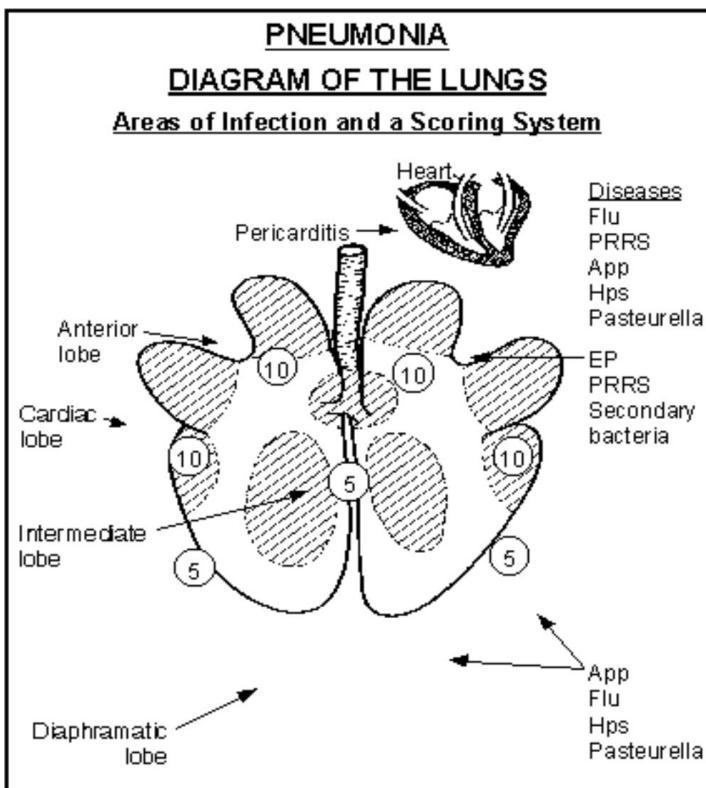
Os sinais clínicos e a intensidade da doença vão variar de acordo com a suscetibilidade dos animais, a virulência da cepa, a extensão da lesão pulmonar, os fatores de risco e predisponentes, e a ocorrência de infecções secundárias. De modo geral, os sinais clínicos podem ser agrupados em sinais respiratórios crônicos, diminuição do crescimento e complicações pulmonares^[2,16].

(i) Sinais respiratórios crônicos: são caracterizados por tosse não produtiva, crônica persistente, mais evidente ao movimentar os animais, principalmente pela manhã. Pode ocorrer anorexia e apatia transitória, pirexia e cerdas arrepiadas. Alguns animais desenvolvem ligeira dispneia a mínima movimentação. A curva térmica se mantém normal ou levemente irregular; (ii) diminuição do crescimento: neste caso, é possível perceber que o índice de conversão aumenta 10% a 20% e ocorre atraso no crescimento que impacta em três a quatro semanas a mais para a saída do lote para o abatedouro; e, (iii) complicações pulmonares: apresentam-se como crises violentas de tosse e dispneia, broncopneumonia ou pleuropneumonias graves e irreversíveis. Quando há o envolvimento de infecções secundárias, este quadro tende a ser mais grave, a tosse passa a ser produtiva e os animais apresentam corrimento nasal mucoso ou muco-catarral.

c) Patologia

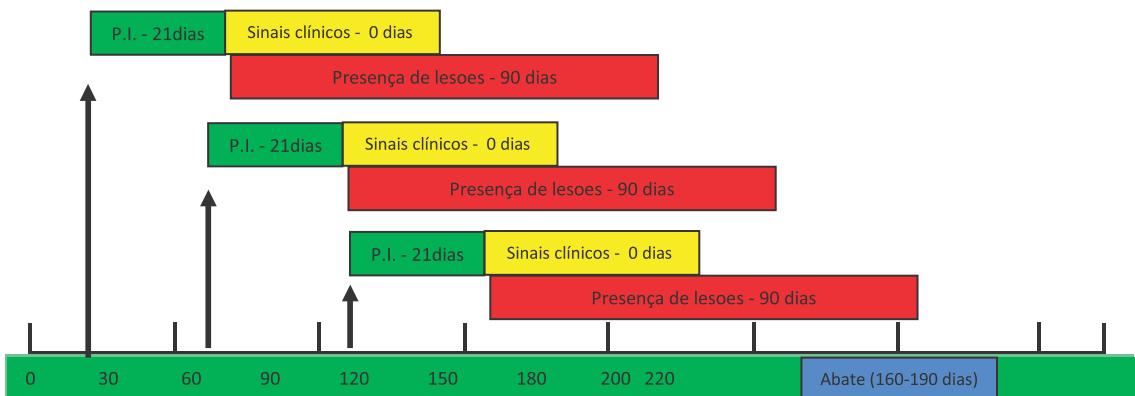
Na necropsia é possível observar áreas bem delimitadas de consolidação pulmonar de coloração púrpura-acinzentada, com tendência ao colapso/depressão (hepatização) localizadas principalmente nos lóbulos apicais, cardíacos, intermediário e e região anteroventral dos lóbulos diafragmáticos. A concentração das lesões nessas regiões se deve a fatores aerodinâmicos e gravitacionais que determinam um aporte de maior carga bacteriana. Os linfonodos mediastínicos e bronquiais geralmente se apresentam ligeiramente aumentados. Quando ocorre o agravamento por agentes secundários, ocorrem pneumonias e broncopneumonias (consolidação parenquimatosas, focos necróticos hemorrágicos, pleurite e pericardite), o que se denomina pneumonia bacteriana. Na fase crônica tem aparência de atelectasia, que, ao corte, tem consistência carnosa mas não muito firme como na hepatização.

Considerando que o período de incubação pode variar de 16 a 21 dias, dependendo da dose infectante, os sinais clínicos (tosse seca) permanecem de 15 a 50 dias com uma média de 40 dias, e as lesões cicatrizam 60 a 90 dias após o início dos sinais clínicos. Sendo assim, apenas as infec-



ções que ocorrem na fase de terminação apresentarão, no abate, aos 160 a 190 dias de vida, lesões plenamente identificáveis que permitem avaliar a dinâmica da difusão do *M. hyopneumoniae*. Sob essa dinâmica, animais que se infectam na fase de creche, durante o reagrupamento, terão a manifestação clínica na fase de recria, e por ocasião do abate as lesões já estarão cicatrizadas, não sendo perceptíveis (Figura 3). No caso de infecção por ocasião do reagrupamento na recria, os sinais clínicos ocorrem na fase de terminação, mas poucos animais mantêm lesões por ocasião do abate.

Figura 3. Relação entre o período de infecção para as diferentes fases de produção, sinais clínicos e a presença de lesões macroscópicas em animais infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae*.



O monitoramento patológico das doenças respiratórias ou das lesões de pneumonia no abate permite estabelecer a prevalência e o impacto dessas enfermidades no rebanho, que podem ser utilizadas como uma forma de avaliar a eficiência das estratégias de controle adotadas. A avaliação e a quantificação das lesões de pneumonia no momento do abate podem ser realizadas de acordo com o índice para pneumonia do rebanho (IPPR)^[9], que permite, pelo uso de um índice, determinar a severidade da doença e o impacto no rebanho. Permite, também, monitorar a eficiência dos programas de prevenção e tratamentos adotados para os problemas respiratórios. A preva-

lência dos casos de pneumonia em suínos, pelos diferentes agentes, pode ser calculada utilizando a seguinte formula:

$$\text{Prevalência de pneumonia (PN)} = \frac{(\text{Nº de pulmões com hepatização}) * 100}{(\text{Nº total de pulmões examinados})}$$

Para o cálculo do índice para pneumonia do rebanho (IPPR) para classificação dos rebanhos quanto ao desafio, pode ser calculado segundo metodologia desenvolvida por pesquisadores da Embrapa – Suínos e Aves^[9]. Nesse caso, atribuiu-se uma pontuação para o estabelecimento de categorias de acordo com o percentual de hepatização do pulmão, conforme a Tabela 18.

Tabela 18. Classificação dos pulmões em categorias de acordo com o percentual de hepatização do pulmão (%) correspondente.

Categoria de acordo com o percentual de hepatização do pulmão	Percentual de hepatização do pulmão (%)
0	0
1	0,1 a 11
2	11,1 a 21
3	21,1 a 31
4	31,1 a 41
5	41,1 a 51
6	51,1 a 100

O cálculo do índice para pneumonia do rebanho (IPPR) é calculado com base na seguinte fórmula:

$$\text{IPPR} = \frac{(\text{NA} * 0) + (\text{NA} * 1) + (\text{NA} * 2) + (\text{NA} * 3) + (\text{NA} * 3) + (\text{NA} * 3) + (\text{NA} * 3)}{\text{Nº total de animais examinados}}$$

IPPR: índice para pneumonia do rebanho

IRAP: índice de rinite atrófica progressiva

NA: número de animais enquadrados na respectiva categoria de acordo com o percentual de hepatização do pulmão

Como forma de facilitar o exame macroscópico e, ao mesmo tempo, a quantificação dos resultados, a extensão da área afetada de cada um dos lobos pulmonares pode ser expressa em categorias de acordo com o percentual de hepatização do lobo pulmonar e sua correspondência ou proporcionalidade em relação ao parênquima pulmonar total (Tabelas 19 e 20)^[9,15].

Devido à possibilidade de infecção dos animais em uma fase inicial e à consequente resolução das lesões antes do abate, o estudo da dinâmica da infecção por *M. hyopneumoniae* na granja deve compreender o monitoramento sanitário nas diferentes fases de produção (necropsia e exames laboratoriais), registros epidemiológicos e monitoramento.

O exame histopatológico revela perda dos cílios e infiltrado polimorfonuclear e macrófagos nas vias aéreas. No parênquima pulmonar é possível constatar pneumonia alvéolo-intersticial, caracterizada por hiperplasia linforreticular progressiva peribronquiolar, perialveolar e perivasculares, lesão mais característica da PE. Além disso, é possível observar infiltrado mononuclear nas regiões perivasculares e peribronquiolares com exsudação intra-alveolar de macrófagos pulmonares e neutrófilos e edema intra-alveolar. Na fase crônica é possível observar hiperplasia perivasculares e peribronquiolares dos folículos linfoides (BALTs) ao longo da arvore bronquial-vascular, comprimindo a luz dos bronquíolos, infiltrado mononuclear e espessamento da parede alveolar e septos interalveolares. Nos casos de envolvimento de agentes secundários, as lesões tendem a se mesclar^[2,4,16].

Tabela 19. Índice para pneumonia (IPP), classificação do rebanho e interpretação dos dados obtidos através do monitoramento macroscópico das lesões.

IPP	Classificação do Rebanho	Interpretação do IPP
Até 0,55	Animais com ausência de pneumonia ou pneumonia leve	Rebanhos livres de pneumonia ou que sofrem impacto muito baixo, não constituindo uma ameaça, pois são evidenciados poucos fatores de risco
De 0,56 a 0,89	Animais com pneumonia moderada	Rebanhos em que a pneumonia está presente, porém não constitui uma ameaça. Fica evidenciado que existem fatores de risco e, caso não sejam corrigidos, a pneumonia pode evoluir e o índice atingir valores maiores
acima de 0,90	Animais com pneumonia grave	Representa situação ruim, com ocorrência grave de pneumonia, tanto maior quanto mais elevado for o índice IPP; existem muitos fatores de risco e medidas emergenciais devem ser tomadas

Fonte: Adaptado^[9,15].

Tabela 20. Percentual de hepatização do lobo pulmonar e sua correspondência ou proporcionalidade em relação ao parênquima pulmonar total, considerando a extensão da área afetada de cada um dos lobos pulmonares no exame macroscópico.

Categoria corres-pondente ao per-centual de hepati-zação do lobo	Percentual de hepatização do lobo (%)	Percentual de hepatização do lobo (%)						
		Lobo apical direito	Lobo cardíaco direito	Lobo dia-fragmático direito	Lobo api-cal esquerdo	Lobo car-díaco esquerdo	Lobo dia-fragmático esquerdo	Lobo pulmo-nar interme-diário
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1 a 25	1,4	1,4	4,3	0,7	0,7	3,4	0,6
2	26 a 50	4,1	4,1	12,7	2,3	2,3	10,1	1,9
3	51 a 75	6,9	6,9	21,4	3,8	3,8	17,0	3,1
4	76 a 100	9,7	9,7	29,9	5,3	5,3	23,8	4,4

Fonte: Adaptado de^[9].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo da doença é dado pelo isolamento do agente. Entretanto, por se tratar de um agente fastidioso, esse procedimento é trabalhoso, demorado e requer cuidados específicos no momento da coleta do material. O exame bacteriológico visando ao isolamento do

agente não deve ser utilizado como método diagnóstico. Entretanto, a análise microbiológica do tecido respiratório deve ser realizada obrigatoriamente como forma de excluir a ocorrência de outros agentes.

O exame histopatológico permite, a partir de cortes histológicos, avaliar a presença de alterações microscópicas sugestivas e estabelecer um diagnóstico presuntivo. A partir dos cortes histológicos do pulmão também é possível detectar o *M. hyopneumoniae* mediante imuno-histoquímica e imunofluorescência direta (IFD)^[11,17].

Testes baseados na PCR possibilitam detectar o Mhp de forma rápida e segura em animais vivos, a partir de suabes nasais ou de fluido bronquiolar. Atualmente estão disponíveis vários métodos de diagnóstico molecular baseado na PCR. Entre os mais eficazes estão a amplificação dos genes p36 e p46, específicos do Mhp e PCR baseado em VNTARs (número variável de repetições de aminoácidos), que permitem a discriminação entre cepas vacinais e de campo, além de evitar reações cruzadas com outras bactérias ou outros micoplasmas^[1,3,13].

Os testes sorológicos são muito úteis, pois mesmo de forma indireta permitem amostrar animais vivos e, por conseguinte, avaliar o comportamento das diferentes fases de produção perante a dinâmica da infecção, auxiliando no estabelecimento das estratégias de controle que melhor atendem as necessidades sanitárias da unidade de produção. O principal ensaio utilizado no diagnóstico é o teste de ELISA.

A soroconversão ocorre três a cinco semanas após a infecção, e os animais permanecem positivos durante vários meses.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir outros micoplasmas e agentes que causam transtornos respiratórios, como *Pasturella multocida* tipo A, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pneumonia por *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus suis* e *M. hyosynoviae*, doença de Glässer, influenza suína, e pneumonia por *Klebsiella* (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21. Diagnóstico diferencial considerando o quadro lesional macroscópico e microscópico dos principais problemas pneumônicos em suínos.

Lesão macroscópica	Lesão microscópica	Agente potencialmente envolvido
Extensa consolidação dos lóbulos apical e cardíaco, aderências e pleurite fibrinosa	Exsudato mucopurulento nos alvéolos e brônquios com infiltrado neutrofílico e de macrófagos	<i>P. multocida</i> ; <i>M. haemolitica</i> ; <i>H. parasuis</i> e <i>B. bronchiseptica</i>
Consolidação vermelho-acinzentada na porção superior dos lobos apical e cardíaco	Infiltrado linfocitário peribronquial e perivascular	<i>M. hyopneumoniae</i>
Sem lesões aparentes	Sem lesões significativas, as vezes ocorrem células com corpúsculos de inclusão intranucleares	Adenovírus; enterovírus
Abscessos	Abscessos	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>S. aureus</i> ; <i>S. suis</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>Cromobacterium</i>
Granulomas	Granulomas, com centro necrótico rodeado de células epitelioides e deposição de tecido conjuntivo	Micobactérias; <i>Nocardia asteroides</i> e <i>Coccidioides immitis</i>
Enfisema nos lóbulos diafragmáticos e presença de parasitos	Broncopneumonia enfisematosas e presença de parasitos	<i>Metastrongylus</i> spp.

Tabela 22. Diagnóstico diferencial recomendado para PE considerando quadro clínico lesional e epidemiológico das principais doenças respiratórias que podem estar envolvidas.

Doença	Natureza	Curso	Sinais Clínicos	Lesões	Idade afetada
Influenza porcina	Vírica	Agudo, com alta morbidade e baixa mortalidade	Febre, tosse e dispneia	Áreas de necrose focal no pulmão	Todas
Doença de Aujeszky	Vírica	Quadro agudo, com alta morbida- de e mortalidade	Leitões: sinais nervosos; Quadro agudo, crescimento e termina- ção: sinais respiratórios, prostração, febre e vômi- tos; matrizes: aborto	Crescimento e termina- ção: pneumonia catar- ral e tonsilite; leitões: Todas áreas de necrose he- pática	
PRRS	Vírica	Subagudo a crô- nico	Leitões: transtornos res- piratórios nem sem- pre evidentes; matrizes: transtornos reprodutivos	Leitões: pneumonia in- tersticial, lesões por processos secundários	Todas
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Bacteriana	Hiperagudo, agudo, subagudo, crô- nico, sempre com alta mortalidade	Febre, dispneia e prostra- ção ("posição de cão sentado").	Pleurite fibrinosa, pneu- monia necrótica ou he- morragica	Leitões a partir de seis a sete semanas
<i>H. parasuis</i>	Bacteriana	Crônico	Sinais respiratórios ines- pecíficos	Polisserosites, poliartri- tes e meningite, prin- cipalmente na fase de creche	Leitões a partir da terceira se- mana
<i>P. multocida</i> tipos A e B; <i>Bronchiseptica</i> , <i>Streptococcus suis</i> , <i>Salmonella</i> spp.	Bacteriana	Todos são agentes secundários, complicadores dos processos pneumônicos produzidos por patógenos primários			

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A colheita de material para cultivo bacteriológico deve ser realizada com o máximo de asepsia e, de preferência, em ambiente com baixa possibilidade de contaminação. Os fragmentos coletados devem contemplar áreas lesadas e áreas limítrofes das lesões abrangendo tecido aparentemente normal e afetado, devendo ser processado imediatamente após a coleta. Apesar de o suabe de traqueia e o lavado traqueobrônquico permitirem maior eficiência na detecção do agente, são pouco práticos e difíceis de proceder em condições de coleta em campo, devendo esse procedimento se substituído por suave nasal. É importante salientar que o isolamento não é um método de rotina para diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, devendo o diagnóstico, preferencialmente, ser realizado pelo exame histopatológico/imunopatológico ou molecular baseado na PCR.

Para exame histopatológico, imunofluorescência direta e imuno-histoquímica, colher amostras de tecido pulmonar de áreas lesadas e áreas limítrofes das lesões, abrangendo tecido aparentemente normal e afetado e fixar em solução tamponada de formol 10%.

É importante para o diagnóstico diferencial submeter ao exame bacteriológico e histopatológico fragmentos de meninges, cérebro, fígado, baço, coração e pulmão, linfonodo mesentérico, bem como segmentos dos intestinos delgado e grosso.

Para o teste de PCR, colher suaves nasais (animais vivos), fluido bronquiolar, e fragmentos pulmonares contemplando áreas limítrofes das lesões abrangendo tecido aparentemente normal e afetado. A coleta deve ser o mais asséptica possível, e o material deve ser acondicionado e man-

tido sob refrigeração até o processamento. No caso do teste baseado na PCR, o material pode ser mantido congelado (-20°C).

Para o exame sorológico diferencial, coletar aproximadamente 3 a 5mL de soro. Se o tempo entre a colheita e processamento laboratorial do soro ultrapassar 48 horas, deve-se obrigatoriamente armazenar as amostras a -20°C e, então, transportar as amostras para o laboratório de diagnóstico. É importante amostrar grupos de animais de diferentes idades (diferença de pelo menos três semanas de idade), para poder definir a fase mais provável de infecção, acompanhar a evolução da doença e estabelecer estratégias de controle.

Referências bibliográficas

1. CARON, J.; OUARDANI, M.; DEA, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J. C. M.* v. 38, n. 4, p. 1390-1396, 2000.
2. CARRANZA, A. Neumonía enzoótica porcina. Memorias del V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR, Córdoba, Argentina, 2006.
3. CASTRO, L.A. et al. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Veterinary Microbiology*. v. 10, p. 258-269, 2006.
4. FANO, E.; PIJOAN, C.; DEE, S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 69, p. 223-228, 2005.
5. FERREIRA, H.B.; CASTRO, L.A. A preliminary survey of *M. hyopneumoniae* virulence factors based on comparative genomic analysis. *Genet. Mol. Biol.* v. 30, n. 1, p. 245-255, 2007.
6. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.
7. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. *Veterinary Microbiology*. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
8. NICOLÁS, M.F. et al. ABC transporters in *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*: Insights into evolution and pathogenicity. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 1, p. 202-211, 2007.
9. PIFFER, I.A.; BRITO, J.R.F. **Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos**. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPSA, 1991. 12p.
10. PITCHER, D.G.; NICHOLAS, C.S. Mycoplasma host specificity: factor or fiction? *The Veterinary Journal*, v. 170, n. 3, p. 300-306, 2005.
11. RIBEIRO, F.C. et al. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. *Arq. bras. med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 6, p. 709-714, 2004
12. ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, v. 83, p. 417-432, 2003.
13. SILVA, F.M.F. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR / Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmões e suabes nasais de suínos por nested PCR. Arq. bras. med. *Vet. Zootec.*; 61(1):149-155, 2009.
14. SOBESTIANSKY, J. et al. Pneumonia enzoótica suína: prevalência, impacto econômico, fatores de risco e estratégias de controle. Goiânia: Art3 Impressos Especiais, 2001. 44p.
15. SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C; SOUZA, C.M. Monitoria patológica de suínos em matadouros. Goiânia: Art3, 2001. 52p.

16. THACKER, E.L. Mycoplasmal diseases. In: STRAW B.E., et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 701-718, 2006.
17. THACKER, E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 317-320, 2004.

1.20 Eperitrozoonose suína

Conceito

Eperitrozoonose é uma infecção hemotrópica infecciosa causada pela bactéria *Mycoplasma haemosuis*. A doença está associada a quadros variados de palidez das superfícies mucosas, anemia hemolítica, sangue com característica aquosa, icterícia, febre, aumento da mortalidade dos animais e diminuição no desempenho de crescimento. Suínos de todas as faixas etárias são suscetíveis, principalmente em condições de imunidade de estresse.

Etiologia e Patogênese

Mycoplasma haemosuis, anteriormente classificado como *Rickettsia*, *Eperythrozoon suis* e posteriormente *Mycoplasma suis*, é um parasita epicelular hemotrópico *haemoplasma*, capaz de aderir à superfície da membrana de eritrócitos^[1]. É uma bactéria pleomórfica, com diâmetro médio de 0,2 a 2µm, que até o momento não passível de cultivo *in vitro*^[3,10].

M. haemosuis é específico da espécie; infecta somente suínos. A partir da transmissão direta ou indireta o *M. haemosuis* atinge a corrente sanguínea e passa a aderir aos eritrócitos^[10]. A adesão do *M. haemosuis*, provavelmente, é mediada por carboidratos (radicais glicosilados) da membrana celular dos eritrócitos, que permite uma aderência íntima e estável às células do hospedeiro^[9]. Essa adesão causa deformações e danos ao citoesqueleto eritrocitário que alteram sua fluidez, diminuem a resistência osmótica, torna-os mais frágeis e, consequentemente, mais rapidamente removidos da circulação sanguínea durante a passagem esplênica^[4].

Devido ao dano direto ocasionado pelo parasita, ocorre a produção e o direcionamento de uma resposta autoimune contra sialoglicoconjungados da membrana celular de eritrócitos infectados ou não, exacerbando o processo de hemólise e a consequente anemia hemolítica pela ação do sistema complemento. Como resultado da infecção na patologia clínica, é possível observar distúrbios circulatórios, tais como diminuição do volume globular, contagem total de eritrócitos e concentração de hemoglobina, predisposição a sangramentos, anemia e icterícia. Na fase aguda da doença, ocorre lenta e progressiva coagulopatia, que se manifesta por microaglutinações nas extremidades, aparecimento de cianose e necrose, principalmente das orelhas, podendo ocorrer também acidose sanguínea e hipoglicemias^[7,10].

Diagnóstico

Não é possível fazer o isolamento ou cultivo do agente *in vitro*. Sendo assim, o diagnóstico definitivo do agente deve ser baseado na demonstração do agente através do exame direto ou detecção através PCR.

a) Epidemiologia

O principal impacto da doença na produção de suínos está associado à diminuição dos índices de produtividade, baixo peso ao nascer e no desmame e quadros associados à supressão de imunidade^[6].

Em rebanhos com a manifestação clínica da doença, a taxa de morbidade normalmente é alta, podendo variar de 16% a 60%, podendo chegar facilmente a 95% desde que haja fatores de transmissão predisponentes^[9]. A mortalidade varia de 3,1% a 18,7%, entretanto pode chegar a 90% quando a enfermidade está associada a outras doenças infecciosas^[4].

A transmissão pode ocorrer pelo contato direto com ferimentos, canibalismo, ingestão de urina com índices de hematuria ou ingestão de ectoparasitas hematófagos. De forma indireta pode ocorrer através de agulhas, instrumentos utilizados em procedimentos cirúrgicos, mossador, cachimbo ou através de vetores mecânicos como *Haematopinus suis*, *Stomoxys calcitrans* e *Sarcopetes scabei* var. *Suis*^[11]. A transmissão via sêmen é rara, sendo possível apenas caso este esteja contaminado por sangue. A infecção pode demonstrar um perfil sazonal, ocorrendo principalmente no verão e outono, principalmente quando associada a insetos vetores^[1,6].

b) Sinais clínicos

A enfermidade afeta suíños de todas as faixas etárias, sendo principalmente associada a fatores estressantes ou imunossupressores. Clinicamente, a doença leva a quadros de: anemia hemolítica dos leitões desmamados; diminuição da eficiência reprodutiva das porcas; debilidade e anemia hemolítica dos leitões neonatos com aumento das infecções secundárias (digestivas e respiratórias); e diminuição do desempenho e ganho de peso dos animais da fase de terminação^[4,9].

Os leitões lactentes, durante a fase aguda, apresentam febre, palidez, anemia, ocasionalmente icterícia, cianose das orelhas e cauda. Além disso, podem apresentar letargia, inapetência, constipação, aparecimento de infecções secundárias e baixo peso ao desmame. Os sinais clínicos iniciam 3 a 7 dias após o nascimento e podem regredir em 3 a 6 dias^[4,11].

Fêmeas reprodutoras manifestam a doença principalmente no período periparto, quando apresentam febre, palidez, anorexia, letargia e diminuição na produção de leite. A recuperação ocorre a partir do terceiro dia pós-parto. Os animais ainda podem apresentar hipoglicemia, acidose sanguínea, bilirrubinemia moderada e diminuição do glicogênio hepático e muscular^[1,6].

As porcas com infecção aguda pelo *M. haemosuis* apresentam anorexia, febre (40 a 41,9°C), edema de mama e de vulva, agalaxia, perda de peso, palidez, anemia e morte súbita. Na forma crônica ocorre perda de peso, palidez, anemia, icterícia, ocasionalmente urticária, falhas reprodutivas (anestro, baixas taxas de concepção, estro irregular, prolongado ou ausente, mortalidade embrionária e aborto) e infecções secundárias que contribuem para a severidade do quadro clínico-patológico^[11].

c) Patologia

As lesões observadas, de maneira geral, são inespecíficas. Na necropsia é possível observar icterícia e palidez generalizada nos diferentes órgãos e tecidos, características clássicas da doença. O fígado apresenta-se aumentado (hepatomegalia) com coloração castanho-amarelada, esplenomegalia, hemorragias petequiais difusas nos diferentes órgãos^[9]. A vesícula biliar apresenta-se aumentada e repleta de bile gelatinosa e amarelada, que também pode ser observada nas fezes^[1,11]. O exame histológico revela degeneração gordurosa do fígado, hiperplasia da medula óssea com sítios de eritropoiese e infiltrado linfocitário no fígado, no baço e na medula óssea^[9,11].

d) Diagnóstico laboratorial

Até o momento, não é possível o isolamento e o cultivo do agente *in vitro*. Entretanto, o diagnóstico definitivo pode ser realizado pela demonstração do agente, que pode ser realizada por esfregaço sanguíneo, utilizando sangue periférico, corado pelo método de Romanovsky, Wright ou Giemsa. Durante a fase aguda da doença, é possível observar corpos basofílicos pleomórficos

(anéis, cocos ou bastonetes) na superfície de eritrócitos ou livres no plasma. Nas infecções crônicas ou nas infecções subclínicas a visualização do agente é rara devido ao baixo número de microorganismos.

O estudo de parâmetros sanguíneos, hemograma e bioquímica sérica revela diminuição do volume globular (vg), eritrócitos totais e concentração de hemoglobina, anemia hemolítica normocítica e normocrômica, policromasia, reticulocitose (indica eritropoiese exacerbada), acidose sanguínea e bilirrubinemia.

O sangue arterial ou venoso dos animais infectados, quando colhido em tubos de vidro transparente, tem aspecto aquoso, coloração clara, não adere à parede do tubo e seu tempo de coagulação é aumentado.

Quando a amostras de sangue são colhidas com anticoagulante e são mantidas à temperatura ambiente, ocorre uma microaglutinação ou formação de microcoágulos (aspecto de grumos) bem visíveis junto à parede do frasco. Esse fenômeno se desfaz à medida que a amostra é aquecida novamente à temperatura de 37 a 40°C, pois são aglutininas dependentes de calor que se separam das hemácias quando em temperaturas próximas da temperatura corporal.

A detecção do agente baseado na PCR é possível pela amplificação de sequências do gene 16S do DNA ribossomal (16rDNA)^[2]. Essa técnica é considerada, até o momento, a mais efetiva ferramenta diagnóstica, pois permite o diagnóstico direto do agente a partir de amostras sanguíneas infectadas, tanto da forma aguda da doença quanto da forma crônica ou latente^[5,8]. O sorodiagnóstico pode ser realizado pela técnica de fixação do complemento, pela hemaglutinação indireta (HI) e pelo teste de ELISA. Os testes sorológicos devem ser utilizados para levantamento de dados de positividade de rebanhos ou populações, não sendo indicados para o diagnóstico individual, pois a produção de anticorpos ocorre em picos, e de cada reinfecção ou recrudescimento da infecção resulta nova ativação da resposta imune e consequente nova produção de anticorpos que se mantêm em títulos detectáveis por 2 a 4 meses, resultando em frequentes diagnósticos falso-negativos.

e) Diagnóstico diferencial

Devido ao quadro clínico-patológico inespecífico, o diagnóstico diferencial deve incluir doenças sistêmicas que cursam com transtornos reprodutivos, como leptospirose, parvovirose e infecção por PCV-2.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o exame direto do esfregaço, coletar sangue periférico, de preferência, da veia auricular, fazer um esfregaço fino, deixar secar e enviar para leitura no laboratório. Alternativamente, o sangue pode ser coletado em tubo com anticoagulante (sangue total com qualquer anticoagulante) e enviado ao laboratório sob refrigeração.

No caso da colheita de tecidos destinados ao exame histopatológico, devido à necessidade de um diagnóstico diferencial e pelo fato de a doença não apresentar lesões específicas, é aconselhável coletar diferentes órgãos/tecidos; nesse caso, as amostras devem ser conservadas em solução tamponada de formol a 10%.

Para o exame sorológico diferencial, coletar aproximadamente 3 a 5mL. Se o tempo entre a colheita e o processamento laboratorial do soro ultrapassar 48 horas, deve-se obrigatoricamente armazenar as amostras a -20°C. É importante amostrar grupos de animais de diferentes idades (diferença de pelo menos três semanas de idade), para poder definir a fase mais provável de infecção, acompanhar a evolução da doença e estabelecer estratégias de controle. Para a realização de ensaios de PCR, o sangue deve ser colhido com anticoagulante.

Referências bibliográficas

1. GROEBEL, K. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 576-584, 2009.
2. HA, S.K. Development of in-situ hybridization for the detection of *Mycoplasma haemosuis* (Eperythrozoonsuis) in formalin-fixed, paraffin wax-embedded tissues from experimentally infected splenectomized pigs. **J. Comp. Path.** v. 133, p. 294-297, 2005.
3. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
4. HOELZLE, L.E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. **Vet. Microbiol.** v. 130, p. 215-226, 2008.
5. HOELZLE L.E. et al. First light cycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. **J. Microbiol. Meth.**, v. 70, p. 346-354, 2007.
6. HOELZLE, L.E. Significance of haemotrophic mycoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the *Mycoplasma suis* infection in swine. **Berl. Muench. Tierarztl. Wschr.** v. 120, p. 34-41, 2007.
7. HOELZLE, L.E. et al. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, p. 116-122, 2006.
8. HOELZLE, L.E., et al. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p. 185-96, 2003.
9. MESSICK, J.B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.
10. PORTIANSKY, E.L. *Mycoplasma suis* in naturally infected pigs: an ultrastructural and morphometric study. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2004.
11. THACKER, E.L. Mycoplasmal diseases. In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 701-718. 2006.

1.21 Pasteurelose pneumônica

Conceito

Pasteurelose pneumônica, causada pela *Pasteurella multocida*, se apresenta cada vez mais frequente na suinocultura moderna, como uma infecção primária ou secundária, geralmente associada a outros agentes como *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV-2.

Etiologia e Patogênese

São poucas as espécies de animais domésticos e silvestres, incluindo mamíferos e aves, que não são infectados por agentes do gênero *Pasteurella* sp. *P. multocida* é um cocobacilo Gram-negativo, imóvel, anaeróbico facultativo, não hemolítico que mede 0,25 a 1,25 μ m, sendo a expressão de proteínas, na sua grande maioria, dependentes de ferro^[3,4].

Cinco sorotipos capsulares (A, B, D, E e F) de *P. multocidas* foram identificados até o momento, sendo os tipos A, B e D isolados de suínos. O sorotipo capsular A é o principal agente da pasteurelose pneumônica. O sorotipo D, nos últimos anos, além de ser frequentemente associado à pasteurelose pneumônica e a cepas toxigênicas em associação com infecção por *Bordetella bronchiseptica*, também está associado à rinite atrófica progressiva (RAP)^[2,6].

As bactérias desse gênero expressam e secretam toxinas e antígenos capsulares e somáticos que possibilitam tanto a identificação quanto a tipificação das amostras. Quanto aos fatores de virulência, esses estão associados, principalmente, a endotoxinas (LPS) e à cápsula, que, devido à constituição hialurônica, possui atividade antifagocítica citotóxica e possibilita adesão facilitada às células do epitélio do trato respiratório^[8].

A cápsula é o principal fator de virulência do sorotipo A. É expressa principalmente em condições de restrição de ferro e permite a evasão da fagocitose pelos macrófagos alveolares. *P. multocida* Tipo D possui uma cápsula com radicais de heparina em sua composição que favorece a colonização e, consequentemente, a lesão tecidual. Ademais, expressa uma exotoxina, chamada toxina dermontecrótica (TDN), que confere atividade toxigênica^[2,4].

A adesão e a colonização na mucosa do trato respiratório pelo sorotipo A são mediadas pelo ácido hialurônico capsular, que permite íntima ligação da bactéria ao epitélio ciliado. O tipo D adere preferencialmente a regiões de epitélio não ciliado, aparentemente através de estruturas de adesão específicas (fímbrias), presentes em cepas toxigênicas^[1,6].

Diagnóstico

Para confirmar o diagnóstico devem ser considerados dados da epidemiologia, sinais clínicos, isolamento e genotipificação do agente.

a) Epidemiologia

P. multocida não é considerado componente da microbiota do trato respiratório superior dos suínos. Apesar disso, praticamente todos os rebanhos são positivos para o agente, podendo ser facilmente isolado das fossas nasais e tonsilas de animais saudáveis^[2,4].

A transmissão do agente ocorre basicamente através de aerossóis ou de forma imediata, pelo contato direto focinho-focinho. A transmissão vertical também pode ocorrer eventualmente. Aves e roedores também podem ter importância na transmissão da doença^[4,6]. A infecção ocorre principalmente como secundária ou em associação a outras doenças respiratórias, como pneumonia enzoótica, principalmente entre 16 e 18 semanas de vida. Considera-se que, nas condições da suinocultura moderna, a prevalência das lesões pneumônicas (pneumonia ou pleurite) varie de 30% a 80% nos animais de abate^[2,3].

b) Sinais clínicos

A intensidade dos sinais clínicos depende da virulência da cepa de *P. multocida*, assim como do status do sistema imune do animal, que determina a capacidade de se sobrepor à infecção.

Os sinais clínicos de febre, dispneia e cianose, sem comprometimento entérico, sugerem uma condição de pneumonia. Essa infecção bacteriana pode ser subclínica ou associada com pneumonia e septicemia com diferentes intensidades, levando a perdas por mortalidade e, principalmente, pela diminuição da taxa de crescimento^[7]. As pneumonias associadas com *P. multocida* usualmente são consideradas secundárias, como a pneumonia enzoótica (Mhp), *Haemophilus pleuropneumoniae*, *H. parasuis* ou infecções virais (vírus da influenza, PCV-2, vírus da doença de Aujeszky).

A doença pode manifestar-se por meio de três formas clínicas: aguda, subaguda e crônica. (i) **forma clínica aguda:** é associada ao Tipo B, é mais grave e cursa com alta mortalidade (15% a 40%). Clinicamente, os animais apresentam tosse, febre, dispneia, respiração abdominal dificultosa ou respiração bucal ruidosa, descargas nasais não muito abundantes, cianose das extremidades, ruídos pulmonares e morte súbita; a região ventral dos animais mortos ou doentes apresenta-se levemente arroxeadas. Essa forma não ocorre no Brasil; (ii) **forma subaguda:** representa os

quadros clássicos de pleurite, mais comum em leitões de crescimento e terminação. Os animais apresentam febre, dificuldade respiratória, respiração abdominal, tosse; clinicamente, a doença se assemelha à pleuropneumonia (*A. pleuropneumoniae*), contudo, nesse caso, a infecção raramente resulta em morte dos animais, que, geralmente, se tornam refugos^[6,7]; (iii) **forma crônica**: é a forma de apresentação mais comum, e também afeta animais de crescimento e terminação, caracterizando-se por tosse, respiração abdominal, que se apresenta como agravamento da pneumonia enzoótica, sendo indistinguíveis clinicamente os quadros clínicos de ambas as doenças.

c) Patologia

As alterações patológicas encontradas não são conclusivas. Na necropsia é possível observar o cadáver congestionado, com presença de espuma na traqueia e edema pulmonar evidente. No pulmão se observa pneumonia exsudativa com consolidação anteroventral do pulmão bem demarcada, de coloração vermelha a cinza-esverdeada, vários graus de pleurite fibrinosa, podendo ou não haver a formação de abscessos. No caso de pleurite, a pleura apresenta-se com aparência seca e translúcida, aderida à parede torácica, o que difere da pleuropneumonia, na qual a adesão pleural apresenta-se com aspecto amarelado e com deposição de grande quantidade de fibrina^[2,3,6]. Considera-se um índice de 30% a 80% de pneumonia ou pleurite nos animais abatidos atualmente^[2,3].

O exame histopatológico revela broncopneumonia exsudativa lobular, hiperplasia do epitélio alveolar, presença de exsudato mucopurulento e exsudação de neutrófilos no lúmen bronquial e espaço alveolar, caracterizando uma pneumonia bacteriana^[6].

d) Diagnóstico laboratorial

Devido ao fato de as lesões serem pouco específicas para o diagnóstico definitivo e estabelecimento de um diagnóstico diferencial, é fundamental o isolamento ou a detecção do agente, seguido de sua caracterização fenotípica ou genotípica.

O isolamento da *P. multocida*, normalmente, é feito em meios enriquecidos e seletivos, que melhoraram a probabilidade do isolamento a partir de secreções nasais e de pulmões devido à sua frequente associação com outros microrganismos e possíveis contaminações. Testes moleculares para a detecção do agente baseados na PCR estão disponíveis e possibilitam a demonstração e identificação da bactéria. Todavia, deve ser interpretado com cautela, sempre confrontado com os dados da necropsia, do exame histopatológico, do isolamento e da tipificação, visto que pode ser secundário ou estar associado a outras infecções^[5].

Devido à possibilidade de se tratar de uma infecção endógena, e em decorrência a grande disseminação do agente nos unidades de produção de suínos, os testes sorológicos têm pouco valor diagnóstico, não sendo recomendados para o diagnóstico individual ou de rebanho.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir outros agentes infecciosos do trato respiratório que estão envolvidos em quadros de pneumonias (vírus da influenza, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mannheimia haemolytica*, *Salmonella cholerasuis*, *Streptococcus* spp. e *Mycoplasma hyopneumoniae*), abscessos (*Streptococcus suis* e *Arcanobacterium pyogenes*) e pleurites (*Haemophilus parasuis* e *Mycoplasma hyorhinis*) (Tabela 23). Nesses casos, a cultura bacteriológica e o exame histopatológico são essenciais.

Tabela 23. Doenças pulmonares, agentes etiológicos, características clínico -patológicas e laboratoriais a serem observados para diagnóstico diferencial.

Doença	Agente envolvido	Patologia	Diagnóstico	Material para laboratório
Pneumonia enzótica	<i>M. hyopneumoniae</i> (primeira fase da infecção)	Consolidação vermelho-acinzentada na porção anteroventral dos lobos apicais, cardíacos, diafragmáticos e intermediário. Exsudato mucopurulento nos alvéolos e brônquios com infiltrado neutrofílico e de macrófagos	Micro - e macrolésões, PCR e sorologia (ELISA)	Amostras de soro, pulmões
Pneumonia enzótica + infecções secundárias	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> + <i>P. multocida</i>	Pneumonia catarral a purulenta, formação de abscessos e pleurite fibrinosa; infiltrado linfocitário peribrônquial e perivasicular	Micro - e macrolésões, PCR e sorologia (ELISA), e exame bacteriológico para identificar o agente secundário envolvido	Amostras de soro, pulmões
Gripe suína (influenza suína)	Vírus da influenza suína (H1N1 e H3N2)	Pneumonia com distribuição lobular; enfisema lobular	Isolamento do vírus	Suave nasal e pulmão
Pleuropneumonia (forma superaguda)	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Pneumonia fibrinonecrótica ou fibrinopurulenta severa	Isolamento ou detecção (PCR) do agente, IF, lesões macro- e microscópicas	Pulmão lesionado
Pleuropneumonia (forma aguda)	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Pneumonia fibrinonecrótica ou fibrinopurulenta e pleurite fibrinosa ou fibrinopurulenta	Isolamento ou detecção (PCR) do agente, IF, lesões macro- e microscópicas	Pulmão lesionado
Pleuropneumonia (forma crônica)	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Pneumonia fibrinonecrótica ou fibrinopurulenta e pleurite fibrinosa ou fibrinopurulenta com lesões tendendo ao encapsulamento	Isolamento ou detecção (PCR) do agente, IF, lesões macro- e microscópicas	Pulmão lesionado
Pneumonia bacteriana purulenta	Bactérias piogênicas, como <i>Corynebacterium</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Cromobacterium</i> , e <i>Arcanobacterium</i> spp.	Lesões em diferentes áreas do parênquima pulmonar de caráter purulento e difusas	Isolamento bacteriano	Pulmão lesionado

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para cultivo e isolamento bacteriológico ou detecção através da PCR, colher exsudato traqueobronquial e fragmentos do pulmão afetado, procurando manter o máximo de assepsia possível. É importante que a amostra clínica seja colhida na porção limítrofe da lesão, contemplando a área afetada e tecido aparentemente normal. Outros órgãos, tecidos ou secreções também devem ser incluídos no exame bacteriológico objetivando estabelecer o diagnóstico diferencial. As amostras destinadas aos exames bacteriológico e molecular devem ser mantidas sob refrigeração (4-8°C), e o tempo entre a colheita e o processamento laboratorial não deve ultrapassar 24 horas. Não congelar as amostras clínicas.

As amostras de tecido pulmonar destinadas ao exame histopatológico devem contemplar as regiões limítrofes das lesões, sendo fixadas em solução tamponada de formol a 10%. Como forma

de garantir o diagnóstico diferencial, outros órgãos/tecidos (por exemplo, linfonodos, SNC, fígado, baço, rim, intestino, coração, pleura, pericárdio e meninges) devem ser observados também.

No caso de se optar pelo diagnóstico sorológico como forma de monitorar a atividade do agente na granja, a colheita de sangue para os testes sorológicos deve contemplar uma amostragem de animais significativa das diferentes fases que se quer estudar. Devem ser enviados aproximadamente 3 a 5mL de soro para o laboratório de diagnóstico veterinário.

Referências bibliográficas

1. AHN, K.K. Detection by in-situ hybridization of *Pasteurella multocida* toxin (*toxA*) gene in the lungs of naturally infected pigs. **J. Comp. Path.**, v. 139, p. 51-53, 2008.
2. BOROWSKI, S.M. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22, n. 3, p. 97-103, 2002.
3. DAVIES, R.L. et al. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52, p. 59-67, 2003.
4. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
5. LICHTENSTEIGER, C.A. et al. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. **J. C. M.**, v. 34, n. 12, p. 3035-3039, 1996.
6. PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 719-726. 2006.
7. RANGEL, M.F.; AGUADÉ, C.P. *Pasteurella multocida* fimbriada como agente desencadeante de pleuritis y neumonía fibrinosa en cerdos. **Veterinaria México**, v. 3, p. 231-233, 1992.
8. TANG, X. et al. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 4, p. 951-958, 2009.

1.22 Pleuropneumonia

Conceito

A pleuropneumonia suína é uma doença infecciosa respiratória de alto impacto econômico para a suinocultura mundial. A enfermidade é causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae* e afeta as diferentes fases de produção, causando perdas por morte, redução do desempenho da produção, aumento dos custos associados à terapêutica da doença e, principalmente por condenações de carcaças no abate.

Etiologia e Patogênese

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae*) é um cocobacilo Gram-negativo, pequeno (0,5 a 1 x 1 a 2 μ m), pleomórfico, imóvel, não esporulado, anaeróbio facultativo, capsulado e positivo em teste CAMP. Baseado na necessidade de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD $^{+}$), as estirpes desse agente podem ser classificadas em biótipo I, dependentes de NAD e no biótipo II, independentes de NAD. No biótipo I integram-se os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5 (5a e 5b), 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 15. No biótipo II são incluídos os sorotipos 13 e 14. De maneira geral, considera-se que os diferentes sorotipos apresentam diferentes níveis de virulência, porém o biótipo I é mais virulento, sendo geralmente associado a surtos severos, com lesões pulmonares extensas e alta mortalidade^[8,9].

A. pleuropneumoniae pode ser isolado da cavidade nasal e das tonsilas. À medida que ocorre a infecção do animal, a bactéria adere às células epiteliais do trato respiratório inferior, principalmente nos epitélios alveolares. Os principais fatores de adesão envolvidos na colonização da bactéria são o LPS, fímbrias e OMP (*outer membrane protein* – proteína da membrana externa)^[6]. A ligação do LPS parece ocorrer com receptores glicoesfingolipídios.

Durante a multiplicação bacteriana ocorre a expressão de hemolisinas e proteínas que capturam componentes férricos (heme, hemina, hematina e hemoglobina), que servem de substrato essencial para a nutrição da bactéria^[4].

Um dos principais determinantes da virulência do App é a capacidade de evasão dos sistemas de defesa inatos, como o sistema muco-ciliar-fagocítico e sistema complemento determinados pela ação citotóxica da Apx e antifagocítica do LPS. Entre os principais fatores de virulência do App podem ser citados: (i) proteínas ligantes da transferrina; (ii) LPS, com atividade endotóxica; (iii) cápsula, com atividade antifagocítica, evita a ativação do sistema complemento; (iv) urease; e (v) citotoxinas (ApxI; ApxII; ApxIII; ApxIV). A toxina ApxI é fortemente hemolítica e citotóxica para leucócitos; a ApxII caracteriza-se por ser fracamente hemolítica e moderadamente citotóxica; a toxina ApxIII é fortemente citotóxica para leucócitos; e a toxina ApxIV possui forte ação tóxica sobre macrófagos e neutrófilos. De modo geral, considera-se que as toxinas possuem caráter antigênico, são tóxicas para macrófagos pulmonares, e responsáveis pela maioria das lesões pulmonares. A toxina ApxI é a mais citotóxica, seguida pela ApxII e pela ApxIII. A ApxIV é produzida por todos os sorotipos apenas *in vivo*^[4,5,6].

As Apx (toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*) são expressas durante a fase *log* de multiplicação bacteriana. De modo geral, essas toxinas comprometem a quimiotaxia, diminuem a capacidade de fagocitose dos macrófagos e estimulam o metabolismo oxidativo dos PMNs, permitindo a sobrevivência da bactéria por longos períodos no interior dos macrófagos e por pouco tempo no interior de neutrófilos^[6]. O LPS e a cápsula facilitam a evasão, principalmente do sistema complemento, de forma mais importante na infecção pelos sorotipos 1 e 5.

A especificidade sorológica é determinada pelo polissacarídeo capsular (CPS) e pelo lipopolissacarídeo da parede celular (LPS). Reações cruzadas podem ocorrer entre os sorotipos 1, 9 e 11; 3, 6 e 8; e 4 e 7^[4,9]. Todos os sorotipos são potencialmente patogênicos, podendo causar a doença; diferem apenas quanto à sua virulência^[4]. Os 15 sorotipos capsulares de APP produzem as toxinas em diferentes combinações, o que provavelmente explicaria, em parte, a diferença de virulência entre eles (Tabela 24).

Tabela 24. Expressão de toxinas Apx pelos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

Sorotipo/característica das toxinas	Toxina produzida pelos diferentes sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i> (Apx)			
	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV
1, 5a, 5b, 9, 11	+	+	- ^b	+
2, 3 ^c , 4, 6, 8	-	+	+	+
7, 12	-	+	-	+
10	+	-	-	+
Atividade hemolítica	Alta	Fraca	Ausente	Fraca
Atividade citotóxica	Alta	Moderada	Forte	Não determinada
Peso (kDa)	105 a 110	103 a 105	120	2005

^a = Presença dos *operons* contendo os genes apx; ^b = Ausência dos *operons* contendo os genes apx; ^c = Possuem *operons* contendo os genes apx (ApxII), entretanto raramente expressam.

Os sorotipos 1, 5, 9 e 11 e, em menor proporção, o 7, estão envolvidos nos surtos mais severos da doença, sendo associados a altas taxas de mortalidade. Os sorotipos 2, 3, 6, 8, 10 e 12, são geralmente menos virulentos e causam índices mais baixos de mortalidade.

No Brasil, os sorotipos predominantemente associados aos casos clínicos são 3, 5, 7 e 8, apesar de já terem sido diagnosticados os sorotipos 1, 3, 5, 7, 8, 9 e 11^[9,10]. Surtos graves também foram associados aos sorotipos 7, 5 e 11 em Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo respectivamente. Um mesmo rebanho pode estar infectado com um ou mais sorotipos^[3].

As lesões pleuropneumônicas são atribuídas, principalmente, à ação direta das toxinas Apx e, indiretamente, ao efeito endotóxico do LPS, que estimula a liberação de mediadores inflamatórios pelos macrófagos ativados como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α e mieloperoxidases pelos PMNs^[4,8].

As lesões teciduais, inicialmente, se caracterizam por coagulação, fibrinólise, edema e congestão alveolar, formação de microtrombos, trombose arteríoloar, isquemia localizada e necrose. O processo inflamatório inicia-se nos bronquíolos e alvéolos e atinge o tecido conjuntivo peribronquiolar levando a lesão vascular intensa com a formação de trombos. Com a evolução do quadro, o processo atinge os canais linfáticos, propaga-se aos septos interlobulares e também à pleura^[4,6].

Diagnóstico

O diagnóstico conclusivo da pleuropneumonia suína é obtido pelo isolamento do agente. Entretanto, os dados epidemiológicos e clínicos, os achados de necropsia e as lesões histopatológicas possibilitam um bom embasamento para o diagnóstico.

a) Epidemiologia

A. pleuropneumoniae é uma bactéria com alta especificidade pelo trato respiratório dos suínos, sendo esses considerados seu hospedeiro natural. A principal forma de transmissão é o contato direto, suíno-suíno, ou por via aerógena através de perdigotos entre suínos mantidos na mesma baia ou em baías próximas. A transmissão entre rebanhos ocorre através de introdução de animais portadores assintomáticos ou animais com infecção crônica. A transmissão através da circulação de pessoas (botas, roupas), roedores e pássaros é muito improvável, mas deve ser obrigatoriamente considerada^[2].

Suínos de todas as fases/idades podem ser afetados. A forma aguda é mais comum em animais de crescimento e início da terminação (70 a 100 dias); já a forma crônica afeta, principalmente, suínos na fase final da terminação, podendo afetar também reprodutores.

A introdução da infecção em um rebanho, em geral, ocorre pela aquisição de suínos portadores assintomáticos ou animais portadores de infecção crônica, os quais mantêm *A. pleuropneumoniae* nos nódulos pulmonares, abscessos ou nas tonsilas. A transmissão vertical, pós-parto, também é possível, entretanto a colonização do trato respiratório vai depender da presença de anticorpos (imunidade passiva) que permanece por duas semanas a 2 meses^[4].

A taxa de morbidade pode chegar a 55% e a mortalidade variar de 13% a 24%. A variação desses índices depende da virulência do agente à presença de fatores predisponentes.

Os principais fatores de risco associados à ocorrência da infecção e ao agravamento do quadro clínico são: ventilação deficiente, alterações bruscas de temperatura, introdução de animais portadores em rebanhos sem imunidade, superlotação, instalações com grande concentração de animais, ciclo contínuo de exploração, ausência de vazio sanitário e presença de outras doenças, como circovirose, rinite atrófica, pneumonia enzoótica, ou agentes secundários, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus* spp., *Salmonella cholerasuis*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma* spp.

b) Sinais clínicos

A doença pode apresentar-se sob as formas: **superaguda**, caracterizada por morte súbita ou, às vezes, febre, letargia, dispneia, cianose das extremidades, presença de exsudato espumoso e hemorrágico nas narinas e na boca; a morte ocorre em 24 a 36 horas; e **forma aguda**, na qual os animais apresentam febre, dispneia, anorexia, insuficiência cardíaca, tosse profunda, posição de “cão sentado” ou em decúbito esternal, pele avermelhada com congestão das extremidades e, às vezes, vômito. O desaparecimento dos sinais clínicos da fase aguda, possivelmente, determina o desenvolvimento da **forma crônica**, caracterizada por diminuição da taxa de ganho de peso, recesso no crescimento, acessos esporádicos de tosse e cicatrizes que determinam a aderências de pleura e pericárdio e consequentes condenações de carcaças no frigorífico.

c) Patologia

As lesões se concentram na cavidade torácica, de forma bilateral, englobando os lobos apical, cardíaco e diafragmático. Os lobos diafragmáticos e cardíacos direitos são envolvidos com maior frequência, assim como a pleura e o pericárdio.

Na forma superaguda é possível observar zonas pneumônicas escuras e duras bem demarcadas, com consistência friável. Nessa forma raramente se observa pleurite fibrinosa. Na forma aguda, lesões de consolidação fibrino-hemorrágica vermelho-escuras com consistência firme na região mais afetada são evidentes. Também é possível observar a presença de exsudação serofibrinosa ou fibrinossanguinolenta nas cavidades pleural (pleurite fibrinosa) e pericárdica, exsudato espumoso avermelhado nos brônquios e na traqueia. Esses achados podem estar presentes nos casos hiperagudos. Na forma crônica são frequentes abscessos pulmonares, encapsulados, bem demarcados e firmes, principalmente no lobo diafragmático, focos de pleurite e pericardite fibrosa, com aderências da pleura e áreas necróticas. A presença de broncopneumonia purulenta costuma ser um indicativo de infecção bacteriana secundária^[2].

O exame histológico revela pleuropneumonia exsudativa fibrino-hemorrágica caracterizada por necrose coagulativa, hemorragia, infiltrado neutrofílico e de células mononucleares ao redor das áreas de necrose, trombose vascular e pleurite fibrinosa^[5].

d) Diagnóstico laboratorial

No caso da doença superaguda ou aguda, o diagnóstico é relativamente fácil, visto que as lesões pulmonares são características e o isolamento bacteriano é facilitado^[1,7].

A sorotipificação baseada na determinação do tipo de抗ígenos capsulares é essencial para caracterizar os isolados e efetivar o diagnóstico bacteriológico. A determinação dos sorotipos pode ser realizada pelo teste de ELISA, por soroaglutinação rápida em placa ou por soroaglutinação lenta em tubo.

A detecção sorospecífica pode ser realizada por ensaios baseados na PCR.

O sorodiagnóstico pode ser utilizado para identificação de granjas ou lotes positivos e é indicado nas seguintes situações: (i) identificação de infecção crônica ou subclínica; (ii) estudo da dinâmica da infecção ou perfil sorológico em granjas infectadas; (iii) avaliação do esquema vacinal e estabelecimento de programas de vacinação; (iv) identificação de rebanhos infectados; (v) tentativas de erradicação da doença; (vi) entendimento da disseminação da infecção entre as fases de produção; e (vii) verificação da resposta imunológica dos animais ante a vacinação. Por ser um diagnóstico indireto, o teste utilizado deve possuir alta sensibilidade e especificidade. O teste sorodiagnóstico de eleição é o teste de ELISA, que usa como base antigênica ApxIV, CPS ou cadeia O do LPS.

Na doença crônica, devido à riqueza da microbiota local que limita o isolamento do App, o diagnóstico se faz pelas lesões encontradas no matadouro, pela pesquisa do agente (PCR) ou pela sorologia.

As técnicas moleculares baseadas na PCR são eficazes para a detecção e tipificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em tecido pulmonar, suabes traqueais e nasais, e tonsila. O teste de PCR, que deve voltar-se à detecção dos genes A dos operons apxI, apxII, apxIII e apxIVA, que codificam para as exotoxinas de *A. pleuropneumoniae*, e genes cpx, cujos produtos estão envolvidos no transporte da cápsula, tem sido muito aplicado nas rotinas de diagnóstico laboratorial^[10].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir outros agentes infecciosos do trato respiratório que estão envolvidos em quadros de pneumonia, pleuropneumonias ou morte súbita, como vírus influenza, peste suína clássica, doença de Aujeszky, *Pasteurella multocida* (A e D), *Mannheimia haemolytica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella cholerasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, intoxicações e úlceras gástricas (Tabela 25). Nesses casos, a cultura bacteriológica e o exame histopatológico são essenciais.

Tabela 25. Diagnóstico clínico-patológico diferencial entre as enfermidades respiratórias.

Etiologia das infecções respiratórias	Característica clínico-patológica
QUADRO HIPERAGUDO	
Morte súbita	
Infecção por <i>Pasteurella multocida</i>	Consolidação pulmonar anteroventral - as lesões necróticas são pouco importantes
Doença de Glässer	Presença de sintomas nervosos - polisserosite e meningite fibrinosas
Peste suína clássica	Mortalidade elevada - animais de qualquer idade
Úlceras gástricas	Suíños pálidos, com erosões na mucosa gástrica - ausência de febre
<i>Salmonella</i> spp. (quadro septicêmico)	Hepatomegalia e esplenomegalia - lesões necróticas no fígado - gânglios mesentéricos reativos
Cianose	
Doença de Glässer	- Polisserosite, artrite e sintomas nervosos
Peste suína clássica	Elevada mortalidade - afeta animais de qualquer idade
Rinite atrófica	Atrofia de cornetas Lacrimejamento, formação da mancha escura no ângulo interno do olho
Traumatismos	Lesões localizadas no nariz e nas fossas nasais
Dispneia	
<i>Pasteurella multocida</i>	Consolidação anteroventral nos pulmões - as lesões necróticas são pouco importantes

Etiologia das infecções respiratórias	Característica clínico-patológica
PRRS (pneumonia intersticial)	Falhas reprodutivas
Doença de Glässer	Afeta principalmente animais até oito semanas de idade Lesões de polisserosite fibrinosa
Influenza suína (gripe)	Raramente é a causa da morte Afeta suínos de todas as idades
QUADRO AGUDO	
Dispneia e tosse	
<i>Pasteurella multocida</i>	Consolidação anteroventral dos pulmões - as lesões necróticas são pouco importantes
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (pneumonia enzoótica suína)	Broncopneumonia afetando lóbulos craniais - tosse não produtiva prolongada
PRRS	Pneumonia intersticial Falhas reprodutivas
Doença de Aujeszky	Morbidade muito elevada e mortalidade baixa - sinais reprodutivos e nervosos
<i>Salmonella cholerasuis</i> (quadro pneumônico/septicêmico)	Diarreia
Influenza suína (gripe)	Raramente é a causa da morte Afeta suínos de todas as idades
Doença de Glässer	Afeta principalmente animais até oito semanas de idade - lesões de polisserosite fibrinosa e sinais nervosos
Pneumonia por <i>Pasteurella multocida</i>	Consolidação pulmonar anteroventral - as lesões necróticas são pouco severas
<i>Streptococcus suis</i>	Depósitos de fibrina sobre o peritônio - sinais nervosos
QUADRO CRÔNICO	
Pleurite fibrosa	
<i>Pasteurella multocida</i>	Consolidação anteroventral dos pulmões - as lesões necróticas são pouco evidentes ou ausentes
Doença de Glässer	Afeta principalmente animais até oito semanas de idade - lesões de polisserosite fibrinosa
Dispneia e tosse	
Pneumonia por <i>Pasteurella multocida</i>	Consolidação anteroventral dos pulmões - as lesões necróticas são pouco evidentes ou ausentes
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Broncopneumonia nos lóbulos apicais, sem comprometimento pleural - tosse não produtiva prolongada
Doença de Aujeszky	Falhas reprodutivas e sinais nervosos esporádicos

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A. pleuropneumoniae pode ser isolado com certa facilidade e segurança a partir de lesões pulmonares típicas, tonsilas, suabes traqueais e nasais de animais doentes. A amostra clínica do pulmão afetado deve ser obtida o mais assepticamente possível, em uma porção limítrofe da lesão, contemplando área afetada e tecido aparentemente normal. Outros órgãos, tecidos ou suabes

(por exemplo, sistema nervoso, coração, pericárdio, pleura, meninges e líquidos ou secreções) também devem ser submetidos ao exame bacteriológico, objetivando embasar o diagnóstico diferencial. As amostras destinadas ao cultivo bacteriológico também podem ser submetidas a ensaios moleculares para a detecção do agente através de técnicas moleculares baseadas na PCR.

Tanto as amostras destinadas ao exame bacteriológico quanto para a detecção do agente em ensaios utilizando a PCR devem ser mantidas sob refrigeração a 4 a 8°C. Para garantir o isolamento, é importante que o tempo entre a coleta e o processamento não ultrapasse 24 horas. Nos quadros crônicos, o isolamento direto é dificultado pelo efeito inibidor da microbiota local. Não congelar as amostras clínicas.

Para o estudo histopatológico, colher amostras de pulmão, pleura e pericárdio, tendo o cuidado de contemplar a região limítrofe da lesão, incluindo tecido aparentemente normal. Nesse caso, o material deve ser fixado e conservado em solução tamponada de formol a 10%. Linfonodos, SNC, fígado, baço, rim, intestino, coração, pleura, pericárdio, meninges, etc. também devem ser colhidos para o diagnóstico diferencial.

A colheita de sangue/soro para os testes sorológicos deve contemplar uma amostragem significativa de animais da(s) fase(s) que se quer estudar. São necessários para o diagnóstico 3 a 5mL de soro, devendo este ser mantido sob refrigeração a 4 a 8°C. Se o tempo até o processamento ultrapassar 48 horas, o soro pode ser congelado.

Referências bibliográficas

1. CHIERS, K. et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a DsbE-like gene. **Vet. Microbiol.**, v. 83, p. 147-159, 2001.
2. COELHO, A.C. et al. Swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnosis and strategies of control. **R. P. C. V.**, v. 99, n. 552, p. 193-198, 2004.
3. COSTA, M.M. et al. Evaluation of PCR based on gene apxIVA associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. **Current Microbiology**, v. 48, p. 189-195, 2004.
4. DUBREUIL, D. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: uses in diagnosis and as vaccinal molecules against pig pleuropneumonia. **Animal Health Research**, v. 1, n. 2, p. 73-93, 2000.
5. GOTTSCHALK, M.; TAYLOR, D.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: STRAW B.E., et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 563-576. 2006.
6. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
7. HIRSH, D.C.; MACLAGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
8. KIELSTEIN, P. et al. Phenotypic and genetic characterization of NAD-Dependent *Pasteurellaceae* from respiratory tract of pigs and their possible pathogenic importance. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 243-255, 2001.
9. KLEIN, C.S. et al. Detection of *A. pleuropneumoniae* in field strains from healthy and diseased pigs. **Current Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 443-447, 2003.
10. SOUZA, K.K. et al. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseada no gene cpx para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos naturais e experimentalmente infectados. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1954-1960, 2008.

1.23 Salmonelose

Conceito

A salmonelose é uma doença infecciosa, com distribuição mundial, que acomete homens e animais, causada por duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* e *S. bongori*. Em suínos, além da doença clínica, a salmonelose está associada à contaminação das carcaças nos abatedouros, representando um sério risco para a saúde pública devido ao caráter zoonótico.

Etiologia e Patogênese

O gênero *Salmonella* spp. (família *Enterobacteriaceae*) se caracteriza por cocobacilos (2 a 4 x 0,5 a 1µm), Gram-negativos, não capsulados, com flagelo peritíquio, móveis, anaeróbicos facultativos, que se multiplicam em temperatura de 37 a 45°C^[5,15]. Sobrevivem longos períodos no ambiente e resistem à dessecação e ao congelamento. São sensíveis ao calor, à luz solar e à maioria dos desinfetantes, como fenóis, clorados e iodados^[14].

Existem mais de 2.400 sorovares de *Salmonella* spp., amplamente distribuídos, sendo alguns extremamente adaptados a uma espécie animal, como, por exemplo, *S. Typhi* para humanos, *S. Dublin* para bovinos e *S. Choleraesuis* para suínos^[14].

A partir de estudos moleculares, o gênero foi dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica*, mais patogênica, possui seis subespécies: Enterica (I), Salamae (II), Arizonae (IIIa), Diarizonae (IIIb), Houtenae (IV) e Indica (VI). A subespécie Enterica possui vários sorovares como *S. ParaTyphiA*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. ParaTyphiB*, *S. Cholerasuis*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis* e *S. TyphieAnatum*^[4,13].

A doença clínica é frequentemente causada pelos sorovares *S. cholerasuis* var. kunzendorf (produtora de sulfeto de hidrogênio) e *S. Typhimurium*, raramente por *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Panama* e *S. Saint-Paul*^[9,11]. Com relação à contaminação de carcaças ou produtos industrializados, sorovar *S. Typhimurium*, da espécie *S. enterica*, foi o mais frequentemente isolado, seguido pelos sorovares *S. Panama*, *S. Agona*, *S. Bredeney*, *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Ohio* e *S. Brandenburg*^[1].

Na classificação dos sorotipos, segundo o esquema de Kauffmann-White, as salmonelas podem ser sorotipificadas com base na diversidade dos抗ígenos: (i) somático (O), determinado pela estrutura e composição do lipopolissacárido (LPS), expressos por números arábicos (ex. 6, 7); (ii)抗ígeno capsular ou de virulência (Vi), é encontrado nos sorotipos Typhi, Paratyphi C e Dublin; (iii)抗ígenos flagelares da fase 1 (H1) representados por letras minúsculas (ex. a, b); (iv)抗ígenos flagelares da fase 2 (H2) (variação de fase de Andrewes) representados por números arábicos (ex. 9, 12). A determinação da combinação desses抗ígenos por aglutinação sorológica, atualmente, permite reconhecer aproximadamente 2.500 sorotipos^[6,13].

A fórmula antigênica de alguns sorotipos de salmonela pode ser descrita segundo a (Tabela 26). A formula antigênica em alguns sorovares pode incluir a subespécie (ex. *S. houtenae*), designada por número romano (ex. *Salmonella IV 48:g,z51*)

Mais de 200 fatores de virulência já foram associados com a patogênese das salmoneloses, porém poucos deles foram completamente estudados. Os principais fatores de patogênese das salmonelas patogênicas estão associados à expressão de fatores que permitem ou possibilitam a adesão (fímbria), invasão, citotoxicidade, endocitose, sobrevivência intracelular (evasão da fagocitose), resistência sérica, e produção de endotoxinas e exotoxinas^[4].

Tabela 26. Fórmula antigênica de alguns sorotipos de *Salmonella* spp.

Sorotipo	Fórmula antigênica	Antígeno O	Antígeno H	
			H1	H2
S. Typhimurium	1,4,5,12:i:1,2 (difásica)	1, 4, 5, 12	i	1, 2
S. Enteritidis	1, 9, 12:g,m:1,7	1, 9, 12	g, m	1, 7
S. Choleraesuis	6,7:c:1,5 (difásica)	6, 7	c	1,5
S. Dublin	9,12 (Vi):g,p:-(monofásica)	9, 12(Vi)	g, p	-
S. Pullorum	9,12:- (móvel)	9, 12	-	-
S. Galinarum	9,12:- (móvel)	9, 12	-	-
S. Typhi	9,12 (Vi):d:-	9, 12 (Vi)	d	-

A virulência da *Salmonella* está relacionada à adesão, invasão, citotoxidez, resistência a fagócitos e à combinação desses fatores. A infecção por S. Choleraesuis, por ser um sorovar mais adaptado ao suíno e possuir maior capacidade invasiva, não requer uma proliferação intraluminal ou dose infectante expressiva para causar a doença clínica, visto que a infecção pode ocorrer através das tonsilas e desencadear uma septicemia em 24 a 72 horas. No caso da infecção entérica (mais frequente), o sorovar faz adesão, preferencialmente, ao íleo e cólon, a partir dos quais passa para a corrente sanguínea^[2,4,15].

S. Typhimurium é menos invasivo e sua colonização e multiplicação são facilitadas pela diminuição do peristaltismo, pelo desequilíbrio da microbiota, pela elevação do pH gástrico e pela baixa digestibilidade da ração. Entretanto, o aparecimento das lesões de enterocolite e, consequentemente, da doença clínica são dependentes da dose infectante (superior a 10⁷UFC/g de conteúdo intestinal). Este sorovar não tem predileção por um sítio ou segmento intestinal específico. Todavia, por causa da presença de diferentes tipos celulares (células M), a invasão é mais frequente no jejuno e no íleo, e atingem a submucosa através das placas de Peyer^[9].

A fase estacionária da *Salmonella* é fundamental para iniciar a infecção. Nessa fase ocorre a expressão do fator sigma (δ) da RNA polimerase (RNAPo δ) responsável por iniciar a transcrição de genes responsáveis pela tolerância ácida, principalmente estomacal. A RNAPo, que contém fator δ , regula positivamente a expressão de genes encontrados nos plasmídeos Spv (*Salmonella virulence plasmids*) de 50 a 100kb^[2,4,9].

A adesão aos sítios de ligação é mediada por adesinas como Pef (*plasmid encoded fimbriae*) e Agf (*Thin aggregative fimbriae ou curli*), responsáveis pela ligação a células epiteliais do intestino delgado, e Lpf (*long polar fimbriae*), responsável pela adesão às células M (*microfold*), associadas aos GALTs (*gut association lymphoid tissue*). Na sequência, induz a um processo de internalização por endocitose, macropinocitose (*ruffles*) pelas células M/enterócitos, mediada pelos genes sip (*Salmonella invasion proteins*) e sop (*Salmonella other proteins*) com a formação do vacúolo endocítico e consequente transcitose através do citoplasma, atingindo a lâmina própria, a submucosa e os linfonodos. Ocorre início de uma resposta inflamatória mediada por PMNs (neutrófilos) e macrófagos. A reorganização do citoesqueleto celular resulta em ativação da fosfolipase C e aumento da fosforilação das proteínas dos canais de cloro envolvidos nas absorção de NaCl^[2,9].

A migração através do epitélio causa danos celulares, induz à produção de citocinas pró-inflamatórias quimiotáxicas (IL-8), e induz à migração de macrófagos. Na lâmina própria, a bactéria infecta macrófagos (CD18+) e neutrófilos (PMNs). Devido à capacidade de sobrevivência

intracelular, alcança a linfonodos mesentéricos, a corrente sanguínea e atinge diferentes órgãos (fígado, baço e pulmões) em 24 a 72 horas. As células dendríticas (CD), quando processam a bactéria ou fagocitam material de macrófagos mortos pela indução da apoptose pela bactéria, apresentam as células CD8 e CD4 através do MHC I e MHC II e, consequentemente, inicia-se uma resposta imune eficaz^[5,7].

A diarreia tem caráter hipersecretório devido ao aumento da secreção de Cl- e à diminuição da reabsorção de Na+, mediada pela reorganização do citoesqueleto no processo de endocitose e migração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), ativação do AMPc, em face da ação de enterotoxinas como LT-like e Fosfolipase A (PLA), e por má absorção (inflamação e necrose da mucosa e consequente perda da capacidade absortiva). As lesões da doença entérica são associadas a reações inflamatórias (liberação de prostaglandinas, leucotrienos, histamina e radicais de oxigênio, prostaglandina E2, que causa hipersecreção Cl- e água devido ao desequilíbrio osmótico) que determinam trombose microvascular e necrose endotelial na submucosa e na lâmina própria, associadas ao LPS, lipídio A e OMPs^[4,9].

Quando a *Salmonella* envolvida é a *S. Choleraesuis*, que possui capacidade de crescimento intracelular e resistência a fatores séricos como a SlyA (salmolisina), ocorre septicemia. Nesse caso, as lesões septicêmicas e os sinais clínicos sistêmicos são subsequentes à endotoxemia que determina lesão vascular direta, ou são induzidas por citocinas inflamatórias (IL-1, FNT-α, IFN-γ e IL-12), ativação de células CD8 e NK^[2,7].

Diagnóstico

O “padrão ouro” para o diagnóstico da salmonelose é o isolamento seguido da sorotipificação. Entretanto, no caso da doença clínica, são imprescindíveis dados da histopatologia de diferentes órgãos e tecidos para determinar o diagnóstico diferencial.

a) Epidemiologia

O reservatório para *Salmonella* spp. é o trato gastrintestinal de animais de sangue quente, tendo como principal via de eliminação as fezes. Suínos, durante a infecção aguda, eliminam um número superior a 10^6 S. Choleraesuis/g de fezes ou 10^7 UFC de S. Typhimurium/g de fezes^[3,5].

A epidemiologia da infecção por salmonelas em suínos tem dois aspectos relevantes: a doença clínica e a contaminação de carcaças e produtos industrializados. A doença clínica é causada pela S. Choleraesuis e S. Typhimurium, e raramente por outros sorovares. Já a contaminação de carcaças pode por uma grande variedade de sorovares que passam despercebidos enquanto na granja, mas representam risco de contaminação para humanos e consequente impacto na saúde pública^[1,4].

A principal fonte de infecção são os animais portadores, mas rações contaminadas, fômites, a presença de cães, gatos, pássaros e roedores e a circulação de veículos também devem ser considerados como possíveis fatores de introdução ou disseminação do agente nos sistemas de produção^[15]. A transmissão ocorre principalmente pela via fecal-oral. Entretanto, contato focinho-focinho e por aerossóis a curtas distâncias também são importantes^[3,5].

A doença afeta principalmente leitões desmamados com até um a quatro meses de idade; em lactentes, devido à imunidade materna, e em adultos é pouco frequente. A morbidade e a mortalidade são muito variáveis. Em geral, variam de 9% a 15% e de 6% a 9% respectivamente. Nos casos da doença septicêmica, a mortalidade é mais expressiva^[3].

S. Choleraesuis é o sorovar mais invasivo e adaptado à espécie suína. É isolado exclusivamente de animais doentes, não sendo isolado de carcaças, produtos industrializados, alimentos e de outros reservatórios. A bactéria é mantida no intestino e tecido linfoide do suíno portador, sendo eliminada por até quatro meses. Para este sorovar a principal fonte de infecção é o próprio su-

íno doente ou portador e dificilmente a infecção é associada à contaminação ambiental ou ao alimento. Devem ser consideradas tanto a infecção horizontal como a vertical^[3,9].

S. Typhimurium não é específico de um hospedeiro e está associado à salmonelose entérica (enterocolite) em animais debilitados, expostos a altos desafios ambientais, deficientes condições de higiene ou imunologicamente sensíveis. Apesar de as fontes de infecção para este sorovar serem muito amplas, considera-se o alimento como a fonte primária da infecção, seja ele de origem animal ou vegetal^[5,15].

b) Sinais clínicos

A intensidade dos sinais clínicos e a severidade da doença dependem de sorotipo, virulência, imunidade natural ou adquirida do hospedeiro, rota de infecção e dose infectante.

Na **forma septicêmica** o quadro normalmente é agudo e afeta animais até 5 meses de idade e, eventualmente, adultos. No caso de fêmeas prenhas causa aborto. Os animais podem apresentar morte súbita ou manifestar perda de apetite, relutância na movimentação, apatia, febre e cianose de extremidades, que, inicialmente, se caracterizam por avermelhamento das orelhas e do abdome, principalmente da região inguinal, evoluindo para cianose e morte. Pode ocorrer diarreia amarelada três ou quatro dias após o início da doença. Nesses casos a morbidade fica ao redor de 10% e a mortalidade acima de 30%. Na regressão dos sinais clínicos o animal permanece eliminando o agente pelo menos por 12 semanas. Se há comprometimento pulmonar, ocorre tosse e dispneia^[7].

A forma de **enterocolite** é mais comum em animais acima de quatro meses de idade, e se caracteriza por diarreia amarelada ou amarelo-esverdeada, com sangue e muco na fase inicial. Os animais apresentam febre, diminuição no consumo, desidratação e perda de desempenho. A diarreia pode durar semanas. A morte está associada a desidratação e hipocalémia e pode variar de 20% a 40%^[2].

c) Patologia

As lesões podem ter caráter septicêmico ou entérico. Nos casos de salmonelose septicêmica (aguda), na necropsia é possível evidenciar cianose ventro-abdominal e nas extremidades, pontos de hemorragia e necrose da mucosa estomacal, esplenomegalia e hepatomegalia, hemorragias petequiais no córtex renal, na bexiga e no epicárdio. Com frequência pode ser observada congestão pulmonar, presença de edema interlobular, broncopneumonia purulenta, hemorragia disseminada, linfonodos mesentéricos, e GALTs aumentados e com pontos hemorrágicos^[3,15]. Na histopatologia os achados mais frequentes são: necrose coagulativa hepatocelular, característica dessa doença, amiloidose, nódulos paratifoides no fígado (frequente nos casos de septicemia), trombose das vênulas da mucosa gástrica e glomérulos^[2,9].

Na salmonelose enterocolítica os achados lesionais tendem a ser restritos ao trato entérico, como espessamento da mucosa do íleo, cólon e ceco com áreas de tecido fibrinonecrótico de coloração amarelado-acinzentada ou avermelhada, lesões focais ou difusas de enterite necrótica, colite ou tifite. Nos casos mais crônicos, pode ocorrer a presença de úlceras em forma de “botões” bem delimitados, os chamados “botões pestosos”. Na luz intestinal há a presença de tecido necrótico com ou sem sangue. Os linfonodos mesentéricos apresentam-se aumentados e, às vezes, hemorrágicos. Na histopatologia é possível observar necrose focal ou difusa das criptas e enterócitos superficiais, frequentemente envolvendo camada submucosa, camada muscular e folículos linfoides. No caso do íleo, a necrose tende a ser mais próxima da superfície, caracterizada pela atrofia das vilosidades. Apresentando intenso infiltrado de macrófagos e moderada presença de linfócitos na lâmina própria, necrose dos GALTs (placas de Peyer) e nos casos mais crônicos, hipertrofia ou hiperplasia dos linfonodos^[2,7,9].

d) Diagnóstico laboratorial

O exame bacteriológico deve ser voltado ao isolamento do agente a partir de suabes retais, amostras de fezes ou conteúdo intestinal. Nos casos agudos de salmonelose septicêmica deve-se incluir ainda o cultivo bacteriológico do fígado, baço, pulmão e hemocultura. Os isolados com características morfotintoriais e bioquímicas de *Salmonella* sp. devem ser submetidos à sorotipificação^[5,14].

Ensaios moleculares baseados na PCR objetivando a amplificação de regiões específicas do cromossomo bacteriano podem ser usados para a detecção da *Salmonella* spp.^[8,10,12]. É importante considerar que esse método pode ser utilizado tanto para identificar indivíduos portadores, rebanhos infectados e consequente risco de contaminação das carcaças/subprodutos, além do diagnóstico de um indivíduo doente.

O exame sorológico pode ser utilizado para classificar os rebanhos quanto ao risco de contaminação da carcaça e de produtos no frigorífico, não sendo recomendado como ferramenta para o diagnóstico da doença em indivíduo ou mesmo em rebanho.

e) Diagnóstico diferencial

No caso da doença septicêmica, o diagnóstico diferencial deve incluir agentes que causam septicemia, pneumonia, hepatite, encefalite ou enterocolite, entre os agentes *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Tabela 27). No caso da forma entérica, o diagnóstico deve incluir agentes que causam disenteria suína (*B. hyodesenteriae*), enterite necrótica, enteropatia proliferativa (*L. intracellularis*), colite espiroquetal (*B. pilosicoli*) colibacilose e tricuríase.

Tabela 27. Diagnóstico diferencial entre as doenças que cursam com enterocolite em suínos.

Enfermidade	Lesões no íleo	Lesões no cólon	Linfonodos mesentéricos	Lesões sistêmicas
Salmonelose	Suaves, sem presença de pseudo-membranas	Lesões necróticas focais ou difusas profundas	Sempre reativo, aumentado, com edema e congestão	Lesões de congestão no estômago, pneumonia intersticial e necrose hepática miliar (forma aguda); ausentes na forma entérica
Disenteria suína	Ausentes	Necrose superficial difusa com presença de sangue e muco	Normal, às vezes aumentado	Ausentes
Enteropatia proliferativa suína	Lesões necrótico-hemorrágicas difusas ou proliferativas	Lesões necrótico-hemorrágicas difusas ou proliferativas menos intensas que no íleo	Geralmente aumentados	Ausentes

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exame bacteriológico ou detecção do agente através do diagnóstico molecular (PCR) em animais vivos, coletar suave retal ou fazer pool de fezes de lotes ou grupos de animais^[8,10,12]. Por ocasião da necropsia, nos casos de doença entérica, coletar fezes ou fragmentos do intestino (íleo, cólon e ceco) e linfonodos mesentéricos. Na suspeita da forma septicêmica ou aguda, incluir a coleta de fígado, baço e sangue para hemocultura, pois nesses casos é comum a negatividade de isolamento a partir do intestino ou de seu conteúdo.

O material deve ser armazenado e transportado sob refrigeração (4-8°C) até o processamento laboratorial. O tempo entre a coleta e processamento não deve ultrapassar 24 horas. As

mesmas alíquotas destinadas ao exame bacteriológico podem ser submetidas a ensaios moleculares baseados na PCR a fim de amplificar e detectar alvos gênicos de interesse.

Para exame histopatológico, coletar fígado, baço, segmentos intestinais (íleo, cólon e ceco), pulmão, rim, cérebro, bexiga e linfonodos da cadeia gastrointestinal. As amostras clínicas devem ser fixadas em solução tamponada de formol a 10%.

No caso de sorologia do rebanho, amostrar uma quantidade significativa de animais do rebanho, de diferentes faixas etárias, para definir o provável momento da infecção. Coletar aproximadamente 10mL de sangue, sem anticoagulante, e submetê-lo à separação do soro, para a obtenção de 3 a 5mL de soro. O soro deve ser mantido sob refrigeração. Caso o intervalo entre a coleta do sangue e o processamento laboratorial do soro exceder a 48 horas, o soro deve ser congelado.

Referências bibliográficas

1. BESSA, M. et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
2. GEBREYES, W.A. Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 777-780, 2009.
3. GRAY, J.T. et al. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 1, p. 141-146, 1996.
4. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
5. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
6. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes: The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex T Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 519-520, 2005.
7. LETELIER, A. et al. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. **Can. J. Vet. Res.**, v. 65, n. 3, p. 168-172, 2001.
8. LEVY, H. PCR method to identify *Salmonella enterica* Serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. **J. C. M.**, p. 1861-1866, 2008.
9. MEYERHOLZ, D.K. et al. Early Epithelial Invasion by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 in the Swine Ileum. **Vet. Pathol.**, v. 712, n. 39, 2002.
10. OLIVEIRA, C.J.B. et al. Detection of *Salmonella enterica* in porcine faecal samples by different isolating and enrichment broth cultivation-PcR methods. **R. P. C. V.**, v. 100, n. 555, p. 193-198, 2005.
11. PATHMANATHAN, S.G. et al. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. **J. M. M.**, v. 52, p. 773-776, 2003.
12. SUH, D.K; SONG, C.J. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. **J. Vet. Sci.**, v. 6, n. 3, p. 231-237, 2005.
13. TINDALL, B.J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 521-524, 2005.
14. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.
15. WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 2000. 463p.

1.24 Rinite atrófica

Conceito

A rinite atrófica é uma doença infecciosa dos suínos caracterizada por espirros, formação de placas escuras nos cantos internos dos olhos, corrimento nasal seroso ou mucopurulento, epistaxe, perda de peso, atrofia dos cornetos nasais e encurtamento ou desvio lateral do focinho. Os agentes primários da rinite atrófica são a *Bordetella bronchiseptica* e a *Pasteurella multocida*, produtoras de toxina dermonecrótica. Duas formas de rinite são descritas: a rinite atrófica progressiva (RAP) e a rinite atrófica não progressiva (RANP).

A RAP é a forma mais grave da doença, relacionada com a *Pasteurella multocida* toxigênica tipo D e mais raramente tipo A ou pela combinação sinérgica da *Bordetella bronchiseptica* + *Pasteurella multocida*. Já a RANP, tem sido relacionada exclusivamente à infecção por *Bordetella bronchiseptica*.

Etiologia e Patogênese

B. bronchiseptica (família Alcaligenaceae) é um cocobacilo Gram-negativo pequeno ($0,4 \mu\text{m} \times 1,2\mu\text{m}$), aeróbico, móvel^[5,14]. Até o momento, foram caracterizados aproximadamente 20抗ígenos (K) termolábeis e termoestáveis. Os principais fatores de virulência expressos durante a infecção são as adesinas, entre elas, a hemaglutinina (com 150kDa), a pertactina (com 68 a 70kDa) e as fímbrias (com 14 a 24kDa), que se ligam a resíduos do ácido siálico do epitélio ciliado; toxina dermonecrótica, citotóxica para células do epitélio ciliar e osteoblastos, induz a lesões ósseas, provoca alterações inflamatórias, proliferativas e degenerativas no epitélio nasal, com perda de cílios; toxina termolábil, que afeta tanto o trato respiratório superior quanto o inferior; adenilato ciclase (com 216kDa), que interfere na fagocitose; hemolisina; citotoxina traqueal (com 0,9kDa) é um peptídio murâmico tóxico para o epitélio ciliado; e lipopolissacarídeo (LPS). Os fatores de virulência são expressos na fase I (colônias lisas). Após várias subculturas em meios de cultura, as colônias adquirem aspecto rugoso (fase II) e os isolados se tornam avirulentos^[4,7].

A bactéria é comensal do trato respiratório superior de suínos, cães, gatos, coelhos e equinos, representando um patógeno potencial para essas espécies. Em suínos pode ser isolada de animais de diferentes idades, tanto de leitões com rinite ou pneumonia como de animais de rebanhos sem sinais clínicos respiratórios^[3,5].

P. multocida (família Pasteurellaceae) é um cocobacilo Gram-negativo, imóvel, aeróbico, não hemolítico, que mede 0,3 a $2\mu\text{m}$. Possui características de coloração bipolar. Os sorotipos D, e mais raramente tipo A, são produtores de toxina dermonecrótica e, classicamente, em combinação com a *B. bronchiseptica*, são os agentes primários da RAP^[5,14].

O principal fator de patogênese da *P. multocida*, sorotipo capsular D, é a toxina dermonecrótica (Pmt). A Pmt é necrosante, citotóxica, osteolítica, mitogênica para os fibroblastos e aumenta a atividade dos osteoclastos. *P. multocida* tipo D, adere, preferencialmente, a regiões de epitélio não ciliado, aparentemente por estruturas de adesão específicas, as fímbrias, presentes em cepas toxigênicas. O sorotipo capsular A produz Pmt e uma cápsula constituída basicamente de ácido hialurônico, expressada durante o crescimento em condições de restrição de ferro. Esses fatores permitem a evasão da fagocitose pelos macrófagos alveolares^[2,4].

A infecção e a colonização do trato respiratório superior dos animais, por ambos os agentes, *B. bronchiseptica* e *P. multocida*, ocorrem por inalação ou ingestão, facilitadas pelo contato direto suíno-suíno ou pela presença de aerossóis.

B. bronchiseptica coloniza primariamente a cavidade nasal, preferencialmente o epitélio ciliado; em seguida, durante o processo de multiplicação e colonização da superfície mucosa (fase I

– patogênica), a bactéria passa a expressar os fatores de patogênese como toxina dermonecrótica, citotoxina traqueal, hemolisina e adenilato ciclase. A toxina dermonecrótica causa necrose proliferativa, degenerativa não ulcerativa do epitélio, consequente irritação, lesão e perda do epitélio ciliar e lesões ósseas. Como consequência da infecção por *B. bronchiseptica* ocorre comprometimento das defesas inespecíficas, como sistema muco-ciliar pela ciliostase e perda da barreira de defesa da mucosa pelo processo de lesão direta, irritabilidade e aumento da produção de muco.

Quando ocorre a infecção dos leitões até a terceira semana e não há complicações com agentes infecciosos secundários, como *P. multocida* toxigênica, as lesões ósseas e epiteliais se estabilizam e ocorre regeneração completa das estruturas nasais em aproximadamente quatro semanas após a infecção, caracterizando o quadro de RANP^[7,14].

Aparentemente, existe um mecanismo sinérgico entre *P. multocida* e *B. bronchiseptica* expresso pela afinidade de proteínas de membrana de *B. bronchiseptica* por componentes heparínicos constituintes da cápsula de *P. multocida*, o que explicaria a associação das referidas bactérias como agentes primários da RAP. A presença de lesões/alterações determinadas pela infecção por *B. bronchiseptica* ou agentes irritantes predispõe à colonização do trato respiratório superior por *P. multocida*, que adere por meio de fímbrias ao epitélio nasal, não ciliado (Tipo D) ou ciliado (Tipo A) ou ao muco. Com a multiplicação do agente durante a etapa de colonização da mucosa nasal, ocorre a expressão da toxina dermonecrótica (Pmt), principal fator de virulência expresso pela *P. multocida* e intimamente associado à RAP. A Pmt tem ação necrosante, citotóxica, osteolítica, e efeito mitógeno sobre fibroblastos e osteoblastos, prejudicando a síntese da matriz osteoide, estimulando atividade dos osteoclastos e alterando o processo normal de osteogênese^[2,3]. Além disso, a Pmt exerce ação sistêmica, produzindo lesões no fígado e nos rins, influenciando negativamente no crescimento dos animais.

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da RAP deve incluir, além dos dados clínico-epidemiológicos, a avaliação das lesões macroscópicas da morfologia dos cornetos, exame histológico e bacteriológico.

a) Epidemiologia

Apesar de *B. bronchiseptica* e *P. multocida* não serem específicas de algum hospedeiro, e provavelmente não fazerem parte da microbiota do trato respiratório do suíno, as cepas que causam rinite atrófica são isoladas apenas de suínos. Por colonizarem facilmente o tecido epitelial ciliar do trato respiratório, podem ser isoladas com facilidade da nasofaringe e das tonsilas de animais sadios. Nesse caso, percebe-se que a ocorrência da doença está relacionada a fatores predisponentes ou desencadeantes.

Considerando a *B. bronchiseptica*, a principal fonte de infecção são leitões doentes ou infectados, principalmente nos casos de reagrupamento de animais. Matrizes também podem transmitir a bactéria a suas leitegadas por contato nasal durante a fase de aleitamento. Outros animais, como cães, gatos, ratos, coelhos e aves, também podem ser considerados possíveis transmissores dos agentes, porém isolados veiculados por esses vetores são considerados de baixa virulência^[12,14].

A transmissão da *B. bronchiseptica* ocorre por contato suíno-suíno ou por meio de aerosolos. A introdução da doença no rebanho ocorre por animais infectados. A severidade da doença é maior quando a infecção ocorre na primeira semana de vida devido à baixa competência do sistema de imunidade. Essa suscetibilidade vai diminuindo à medida que a infecção ocorre em uma idade mais avançada. Animais infectados acima de nove semanas de idade dificilmen-

te desenvolvem lesões. Em animais infectados entre uma e quatro semanas de vida, as lesões de atrofia dos cornetos aparecem ao redor do segundo ou terceiro mês de vida e permanecem até o abate. E no caso da RANP, as lesões desaparecem aproximadamente quatro semanas após o início da infecção^[9]. A imunidade passiva protege contra o desenvolvimento das lesões, mas não impede a infecção.

P. multocida pode ser isolada das tonsilas, das fossas nasais e, em menor proporção, dos pulmões^[2]. A infecção do rebanho, geralmente, ocorre pela introdução de animais positivos, seja no reagrupamento, seja na reposição. A infecção primária dos animais pode ocorrer na primeira semana de vida, mais frequentemente entre a terceira e a quinta semana, e os sinais clínicos passam a ser visíveis entre a quarta e a décima segunda semana^[12].

b) Sinais clínicos

Por se tratar de uma doença multifatorial, a intensidade dos sinais clínicos e das lesões não depende somente da virulência dos agentes envolvidos, mas também do impacto dos fatores de risco ou predisponentes nas condições de vida dos animais do rebanho.

Os sinais mais característicos da infecção por *B. bronchiseptica* são aparentes já nas primeiras semanas de vida dos leitões, sendo mais visíveis a partir da terceira ou quarta semana, quando ocorre diminuição da imunidade passiva ou por ocasião do reagrupamento dos animais por conta do desmame. Os leitões apresentam espirros e corrimento nasal mucoso variando de se-roso a mucopurulento. Quanto mais jovem o leitão for infectado, mais severo será o quadro clínico-lesional. Os sinais clínicos de RAP não são visíveis antes de quatro a 12 semanas de vida, sendo mais evidentes no final da fase de recria ou durante a fase de terminação. Nesse caso, os sinais mais evidentes são desvio ou encurtamento do focinho, distorções faciais, braquignatia e pregueamento da pele da porção superior do focinho. Pode ocorrer epistaxe intermitente, normalmente unilateral, mais frequente na RAP e rara na RANP. Placas escuras nos ângulos mediais dos olhos devidas à obstrução do ducto nasolacrimal também são perceptíveis^[7,12,14]. Animais com sinais clínicos de RAP normalmente apresentam atraso no crescimento e aumento na conversão alimentar, e essa condição está associada à ação da Pmt.

c) Patologia

O diagnóstico definitivo pode ser realizado através do exame das conchas nasais de leitões com cinco a dez semanas de idade, ou no frigorífico por ocasião do abate, pelo método de apreciação visual dos cornetos (AVC)^[10,11] (Figura 4).

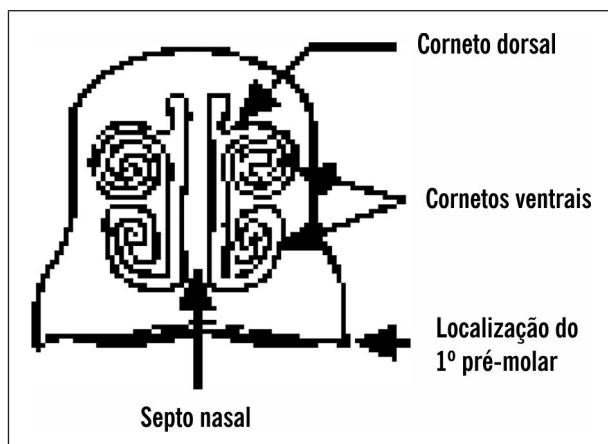


Figura 4. Estruturas anatômicas observadas no corte entre o 1º e 2º pré-molares de acordo com o método de apreciação visual dos cornetos (AVC) para o estabelecimento do IRAP (índice de rinite atrófica progressiva).

O AVC, baseado na apreciação visual da morfologia dos cornetos nasais, estabelece diferentes graus de atrofia dos cornetos pela avaliação do espaço entre a cartilagem nasal e o tecido ósseo, bem como a estrutura morfológica dos cornetos nasais ventrais e dorsais (Figura 5). Para a realização do exame macroscópico e apreciação visual da morfologia dos cornetos, realiza-se um corte transversal do focinho entre o primeiro e segundo dentes pré-molares (9^a prega do palato), na linha da comissura labial, local em que as conchas dorsal e ventral são simétricas e estão mais proeminentes^[10]. O método AVC permite confirmar o diagnóstico clínico e, de forma muito eficiente, avaliar e classificar o grau de severidade da atrofia dos cornetos nasais. E a partir daí, determinar a prevalência e calcular o índice para RAP nos rebanhos afetados. Esse método é caracterizado pela eficiência e praticidade, possibilitando sua utilização em frigoríficos por ocasião do abate e em campo durante a execução da necropsia. É importante considerar que, paralelamente ao AVC, pode-se, por ocasião do monitoramento patológico no abatedouro, estabelecer a prevalência de casos de pneumonia e índice para pneumonia do rebanho (IPPR)^[10,12] (Tabela 40). Em consequência, será possível estabelecer níveis de desafio para a granja para os diferentes agentes e monitorar a eficiência dos programas de prevenção e tratamentos adotados para os problemas respiratórios de desafio^[10,11,13].

Figura 5. Graduação das lesões das conchas dos cornetos nasais de suínos com RAP com base no grau de anormalidade observado entre o primeiro e segundo pré-molares de acordo com o método de apreciação visual da morfologia dos cornetos (AVC).

Alteração na morfologia das conchas dos cornetos nasais	Grau	Graduação das lesões das conchas dos cornetos nasais de animais com RAP
	0	Normal: sem alterações morfológicas nos cornetos nasais
	1	Alteração leve: alteração morfológica pequena, geralmente perceptível nas conchas inferiores dos cornetos nasais ventrais
	2	Moderada: atrofia moderada dos cornetos que, morologicamente, pode ser detectada pela ocorrência de espaços bem perceptíveis entre a cartilagem nasal e o tecido ósseo
	3	Grave ou completa: atrofia grave, restando apenas cornetos pequenos e deformados ou o desaparecimento completo das estruturas

No caso de RAP, a principal lesão observada é a atrofia e, nos casos mais graves, a ausência das conchas ventral e dorsal e desvio de septo. A mucosa da cavidade nasal apresenta-se inflamada e com a presença de conteúdo mucopurulento com estrias de sangue. No caso da RANP,

é possível identificar rinite mucopurulenta e lesões de atrofia leves, não ultrapassando grau 1 da escala de AVC^[9,12].

Cálculo do IRAP (índice de rinite atrófica progressiva)
$\text{IRAP} = ((\text{NA}*0) + (\text{NA}*1) + (\text{NA}*2) + (\text{NA}*3))/\text{NAT}$
IRAP: índice de rinite atrófica progressiva NA: número de animais NAE: número total de animais examinados

O método de apreciação visual dos cornetos (método AVC) permite classificar o grau de atrofia dos cornetos de 0 a 3, detectar a prevalência da RAP, e estimar e interpretar o índice de desafio para RAP nos rebanhos (Tabela 28). A classificação de rebanhos com rinite atrófica por meio de índice IRAP (índice de rinite atrófica progressiva) baseia-se no número de animais examinados e na interpretação dos graus de alterações morfológicas presentes nas conchas nasais^[11,13].

Tabela 28. Índice para pneumonia no rebanho (IPPR), índice de rinite atrófica progressiva (IRAP), interpretação dos dados e classificação dos rebanhos quanto ao desafio.

Classificação de rebanhos de acordo com o índice de lesão de IPPR e RAP			
Índice para pneumonia no rebanho		Índice de rinite atrófica	
IPPR	Interpretação dos dados e classificação dos rebanhos quanto ao desafio	IRAP	Interpretação dos dados e classificação dos rebanhos quanto ao desafio
Até 0,55	Animais com pneumonia leve	0 até 0,3	Animais livres, ou com nível insignificante, da doença
De 0,56 a 0,89	Animais com pneumonia moderada	0,31 até 0,45	Animais levemente afetados
Acima de 0,9	Animais com pneumonia grave	0,46 até 3	Animais moderada a severamente afetados

O cálculo do IRAP (índice de rinite atrófica progressiva) é baseado no grau de anormalidade morfológica observado entre o primeiro e segundo pré-molares de acordo com o método de apreciação visual dos cornetos (AVC). Os achados histopatológicos mais frequentes, nos casos de RAP, são: substituição das trabéculas ósseas dos cornetos por tecido conjuntivo fibroso, principalmente da concha ventral; metaplasia epitelial e infiltrado inflamatório na lamina própria; hiperplasia de osteoblastos e redução na síntese da matriz óssea^[8,12,13]. Experimentalmente, pela aplicação de Pmt foi possível observar cirrose, lesão renal, redução de linfócitos periféricos e retardno crescimento.

d) Diagnóstico laboratorial

O cultivo de *P. multocida* e *B. bronchiseptica* deve ser realizado em meios seletivos, devido a possibilidade de infecções mistas com outros agentes e porque nas situações de coleta de material em campo o crescimento de contaminantes pode sobrepor-se ao cultivo do agente. Tanto as amostras de *P. multocida* quanto de *B. bronchiseptica* isoladas devem ser caracterizadas quanto ao potencial toxigênico, visto que, apenas as amostras produtoras de toxinas participam da patogênese da RAP.

Em casos específicos podem ser utilizados exames sorológicos (teste ELISA) para detecção de anticorpos para *B. bronchiseptica* ou para a toxina dermonecrótica da *P. multocida*. A detecção de anticorpos para *B. bronchiseptica* tem baixo valor diagnóstico, assim como para *P. multocida*, visto que existe reação cruzada entre cepas toxigênicas e não toxigênicas, e a soroconversão pode demorar até 3 meses devido à baixa imunogenicidade.

Os testes moleculares para a detecção do agente baseados na PCR possibilitam identificar a presença tanto da *B. bronchiseptica* quanto da *P. multocida* diretamente de amostras clínicas, além disso, permitem identificar as amostras toxigênicas.^[1,6] Entretanto, deve ser utilizado com cautela, sempre confrontado dados clínicos, de necropsia e monitoramentos baseados no AVC, achados histopatológico e tipificação, pois ambos os agentes podem ser isolados facilmente do trato respiratório de animais sadios.

e) Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial é importante considerar outras enfermidades que também cursam com manifestações respiratórias, como influenza suína, doença de Glässer, infecção por *Mannheimia haemolytica* e rinite necrótica por *Fusobacterium necrophorum* em associação a outros microrganismos, que, apesar de causar uma lesão em outra região, nos casos crônicos está associada a deformidades do focinho ou a quadros respiratórios. A presença de espirros devido ao excesso de pó, à deficiência de ventilação ou ao excesso de gases nas instalações e outras infecções bacterianas também devem ser consideradas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O isolamento de *P. multocida* e *B. bronchiseptica* pode ser realizado a partir de suabe nasais ou de tonsilas (*in vivo*) ou a partir de amostras clínicas obtidas por ocasião da necropsia, obtida o mais assepticamente possível. O material deve ser colhido de leitões jovens (cinco a dez semanas de idade) que não tenham sido medicados. As amostras de tecidos e os suabes devem mantidos sob refrigeração a 4 a 8°C. O processamento laboratorial deve ser realizado em menos de 24 horas devido à sobreproliferação dos componentes da microbiota. As mesmas amostras clínicas destinadas ao exame bacteriológico podem submetidas a ensaios moleculares baseados na PCR a fim de detectar o agente.

Outros órgãos, tecidos ou suabes, por exemplo, sistema nervoso, coração, pericárdio, pleura, meninges e líquidos ou secreções, também devem ser submetidos ao exame bacteriológico, objetivando embasar o diagnóstico diferencial.

Para o estudo histopatológico, os órgãos/tecidos de eleição são pulmão, pleura e pericárdio. Nesse caso, o material deve ser fixado e conservado em solução tamponada de formol a 10%. Demais órgãos e tecidos também devem ser colhidos para proceder ao diagnóstico diferencial, principalmente nos casos de RANP.

A coleta de sangue/soro para os testes sorológicos deve contemplar uma amostragem significativa de animais da(s) fase(s) que se quer estudar. Coletar sangue, sem anticoagulante, para separar no mínimo 3 a 5mL de soro, devendo este ser mantido sob refrigeração a 2-8°C. Se o tempo até o processamento ultrapassar 48 horas, o material pode ser congelado.

Referências bibliográficas

1. COUTINHO, T.A. et al. Performance of transport and selective media for swine *Bordetella bronchiseptica* recovery and its comparison to polymerase chain reaction detection. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, n. 3, p. 470-479, 2009.

2. FOGED, N.T. *Pasteurella multocida* toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. **APMIS Suppl.**, v. 25, p. 1-56, 1992.
3. GATLIN, C.L. et al. The quantitation of turbinate atrophy in pigs to measure the severity of induced atrophic rhinitis. **Can. J. Vet. Res.**, 60, 121-126, 1996.
4. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
5. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
6. HOZBOR, D.; FOUQUE, F.; GUISO, N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 333-341, 1999.
7. JONG, M.F. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In: STRAW B.E. et al. (Eds). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 564-602, 2006.
8. LICHTENSTEIGER, et al. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3035-3039, 1996.
9. MAGYAR, T. et al. Turbinate atrophy evaluation in pigs by computed tomography. **Acta Vet. Hung.**, v. 51, p. 485-491, 2003.
10. MARTINS, E.; SCARSI, R.M.; PIFFER, I.A. **Classificação macroscópica dos graus de atrofia dos cornetas na rinite atrófica dos suínos**. EMBRAPA-CNPSA, Comunicado Técnico 93, p. 1-2, 1985.
11. PIFFER, I.A.; BRITO, J.R.F. **Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos**. Concórdia - SC: EMBRAPA-CNPSA, 1991. 12p.
12. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. 770p.
13. SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C; SOUZA, C.M. **Monitoria patológica de suínos em matadouros**. Goiânia: Art3, 2001. 52p.
14. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

1.25 Tuberculose suína

Conceito

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa granulomatosa crônica de caráter zoonótico causada por micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (CMTB), como *M. bovis*. Para a indústria suinícola, a tuberculose, além de ter potencial zoonótico, está associada à depreciação das carcaças afetadas e à consequente condenação ou destino condicionado quando detectada na linha de abate.

Etiologia e Patogênese

O gênero *Mycobacterium* sp. é constituído por *M. leprae*, por espécies que compõem o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e por outras micobactérias denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT).

O CMTB é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose (TB) humana; *M. bovis*, principal agente da TB bovina; *M. bovis-Bacille Calmette-Guérin* (BCG); *M. bovis* subespécie *caprae*, causador de TB em caprinos; *M. africanum*, agente da TB humana en-

contrado mais frequentemente no continente africano; *M. microti*, que causa TB em roedores; *M. pinnipedii*, agente da TB em leões-marinhos e no homem; e o *M. canettii*, variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália. Essas espécies são muito similares, apresentam 99,9% de identidade genética e, por isso, estão incluídas em um mesmo complexo. Do complexo MNT, o também chamado complexo avium (MCA), fazem parte *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*^[4,6,7,16].

As micobactérias são bacilos resistentes a álcool e ácido devido à elevada concentração de lipídios, principalmente ácido micólico na parede celular, que confere uma extraordinária hidrofobicidade. São positivas para Ziehl-Neelsen, possuem 4µm de comprimento, são imóveis, citoquimicamente Gram-positivas, aeróbias e crescem de forma lenta em temperatura de 37 a 43°C em até oito semanas^[4,7]. A constituição da parede celular basicamente lipídica torna as células bacterianas hidrofóbicas e altamente resistentes às condições do meio ambiente, sendo encontradas até mesmo no solo, na vegetação e na água^[13].

Os principais fatores de virulência (Tabela 29) envolvidos na infecção são: constituintes micosídeos, entre eles os peptidioglicolipídios e glicolipídios, que impedem a fagocitose e induzem a uma resposta inflamatória proliferativa granulomatosa; alquil-hidroperoxidase redutase, que aumenta a resistência à fagocitose; dimecotiltrealose, que mobiliza neutrófilos e induz a uma resposta granulomatosa; sulfolipídios e fosfatidil inositol manosídeo, que impedem a formação do fagolisossoma e a explosão respiratória^[6,7,16]. A cera D e as tuberculoproteínas possivelmente induzem à reação de hipersensibilidade tardia, ou tipo IV (mediada por LT), detectada no teste de tuberculinização^[14]. Não há a produção de exotoxinas ou enzimas que causem lesão tecidual direta, sendo esta associada à própria resposta imunopatológica do hospedeiro.

Tabela 29. Fatores de virulência e atividade biológica atribuída a componentes das micobactérias na patogenia das doenças.

Fator de virulência	Atividade biológica na Patogênese da doença
Ácido micólico	Induz à formação de granuloma
Fosfolípido	Imunógeno com atividade adjuvante modulando a resposta imune
Micosídeos	Associados ao complexo MAC, são implicados na formação da “pseudocápsula” ao redor da bactéria fagocitada
Cera-D	Atividade adjuvante modulando a resposta imune e induz à formação do granuloma
<i>Cord factor</i>	Fator de virulência; tem atividade adjuvante modulando a resposta imune e induz à formação do granuloma; inibe a migração de neutrófilos polimorfonucleares e induz à diminuição da síntese de glicogênio hepático
Sulfatídios	Fator de virulência; inibe a fusão fagossoma-lisossoma nos macrófagos infectados
Muramil-dipeptídio	Atividade adjuvante e imunomoduladora
Parede celular	Atividade adjuvante modulando a resposta imune
Micobactinas e exoquelinas	Fator de virulência; quelantes de ferro

Fonte: Adaptado de^[4,6,7,16].

Em suínos a tuberculose é majoritariamente causada pela *M. bovis* e, diferentemente da maioria das outras espécies animais, nessa a infecção ocorre principalmente pela ingestão de material contaminado (água e alimentos contaminados)^[12,15].

A bactéria penetra na mucosa gastrintestinal, é englobada por macrófagos e transportada para os linfonodos drenantes (mesentéricos). No interior dos macrófagos, parte das micobactérias não é fagocitada, sendo a sobrevivência e multiplicação amparadas por fatores de patogênese (estruturais e secretados). Aparentemente, os principais fatores envolvidos na sobrevivência intracelular da bactéria são os lipoglicanos, que modulam a secreção de citocinas, os glicolipídios fenólicos e os sulfolipídios, que protegem a bactéria da destruição intracelular fagocítica^[6,9,13]. No interior do fagossomo, inibem a fusão fagolisossômica, conseguem se evadir da fagocitose e não sofrem ação dos fatores da fagocitose. Consequentemente, as células bacterianas se multiplicam e induzem à formação de um processo proliferativo granulomatoso que pode permanecer estacionário e mineralizar com o tempo ou evoluir para necrose de liquefação^[4,11]. A intensidade e o desenvolvimento da doença dependem da rota de infecção, da capacidade do bacilo de multiplicar-se no interior dos macrófagos, e da resposta imune do hospedeiro.

Diagnóstico

O diagnóstico da doença em animais vivos é bastante limitado, sendo realizado o monitoramento somente em granjas de reprodutores certificadas (GRSC).

a) Epidemiologia

No sistema de produção industrial, a maioria das infecções ocorre por micobactérias do complexo MCA. A infecção por *M. bovis* é um reflexo da prevalência desse agente no rebanho bovino. No caso da infecção por *M. tuberculosis*, está associada ao contato próximo com pessoas doentes ou portadoras.

A principal rota de infecção é a via oral devido ao consumo de alimentos ou restos contaminados^[3,5,15].

As micobactérias são extremamente resistentes, podendo sobreviver vários meses em instalações e por anos no solo^[13]. A infecção ocorre pelo contato direto ou indireto com animais infectados, cama, ração, água e solo contaminados. Outras formas de infecção devem ser consideradas, como a utilização de produtos derivados de leite contaminado, fezes, restos de carne bovina não cozida, restos de frigoríficos e contato com pessoas doentes^[4,12,15].

b) Sinais clínicos

Trata-se de um processo crônico progressivo, depauperante, caracterizado por caquexia progressiva com ausência de anorexia, moderada morbidade e baixa mortalidade. Os sinais clínicos da tuberculose, em ordem de importância, são predominantemente respiratórios e articulares, com menor incidência de sinais digestivos. Entretanto, a importância da doença está associada à depreciação das carcaças, pois afeta animais entre 3 e 13 meses de idade^[11,16].

Os sinais respiratórios indicam que a lesão principal se concentra no pulmão, onde se origina o complexo primário, que é indicado macroscopicamente pela lesão pulmonar e adenopatia satélite dos gânglios traqueais e mediastínicos.

c) Patologia

A patologia da tuberculose bovina caracteriza-se pela formação típica de lesões granulomatosas com graus variados de necrose, calcificação e encapsulamento. A localização das lesões primárias da tuberculose está associada à rota de infecção e também à capacidade de disseminação do *M. bovis* pelos diferentes órgãos/tecidos^[4,11,16].

Na necropsia é possível observar comprometimento dos linfonodos do aparelho digestivo (linfonodos cefálicos e mesentéricos e, ocasionalmente, linfonodos gástricos, hepáticos e medias-

tínicos), que se apresentam aumentados de tamanho e de consistência firme, com lesões granulomatosas localizadas (granulomas) revelando um padrão típico de formação de tubérculo, facilmente observáveis ao corte. Os granulomas podem apresentar-se como pequenos nódulos branco-amarelados, capsulados com material caseoso amarelado, às vezes mineralizados no interior. O tamanho varia desde pequenos focos com poucos milímetros até lesões mais difusas, podendo atingir todo o linfonodo. Não é possível diferenciar com segurança lesões de linfadenite granulomatosa (complexo MCA) de tuberculose (*M. bovis* ou *M. tuberculosis*) de *Rodhococcus equi*. De forma bastante generalista, considerando a infecção pelas diferentes micobactérias, o *M. bovis* causa doença progressiva clássica com metástases disseminadas em vários órgãos. A infecção por *M. tuberculosis* fica restrita aos linfonodos regionais. Já *M. avium*, principalmente a subespécie *hominisuis*, pode disseminar-se por ossos, vísceras e meninges formando granulomas com necrose caseosa central, normalmente sem uma organização característica de tubérculo^[3,4,5].

No exame histológico é possível observar granulomas geralmente multicêntricos, envoltos por uma cápsula conjuntiva, com necrose caseosa central e proliferação de células epitelioides, células gigantes multinucleadas (tipo Langhan's) e necrose de caseificação central^[4,11,16].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento e a tipificação devem ser realizados a partir de material de necropsia com lesões sugestivas da doença. Apesar de “padrão ouro” para o diagnóstico, o isolamento é demorado, trabalhoso, muito oneroso e pouco sensível, e por essas características é pouco realizado.

O exame direto para a pesquisa de bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) pode ser realizado por esfregaços em lâmina histológica a partir de material caseoso. Em lesões proliferativas é comum a ausência de bacilos ou sua presença em pequenas quantidades.

Em animais vivos o diagnóstico presuntivo da infecção pode ser realizado pelo teste de tuberculinização pareada, baseado na hipersensibilidade tipo IV ou retardada utilizando a tuberculina (PPD- [*purified protein derivative*]) PPD aviária e mamífera^[1,18]. O teste apresenta sensibilidade e especificidade baixas para identificar animais infectados, sendo utilizado com o objetivo de detectar rebanhos positivos e não especificamente animais infectados^[5].

• Tuberculinização pareada

O teste de tuberculinização pareada com PPD aviária e bovina é baseado na detecção de hipersensibilidade tipo IV utilizando PPD aviária e mamífera e permite um diagnóstico diferencial presuntivo entre animais com linfadenite granulomatosa (causada pelo complexo MAC) da tuberculose (causada pelo *M. bovis* ou *M. tuberculosis*)^[1,5]. Apesar de o teste apresentar baixa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico individual de animais infectados, é o teste de eleição para identificar rebanhos positivos para micobactérias^[16,18].

A realização do teste requer os seguintes procedimentos:

(i) Localizar a área de aplicação intradérmica da tuberculina, que é na face dorsal da orelha, a cerca de 5cm da base em direção ao centro;

(ii) Aplicar, intradermicamente, 0,1ml de tuberculina aviária (0,05mg de PPD) na face dorsal de uma orelha e 0,1ml de tuberculina bovina ou mamífera (0,05mg de PPD) na face dorsal da outra orelha. A aplicação deve ser intradérmica com *carpule* formando uma pequena elevação semelhante a uma lentilha no local da aplicação;

(iii) A leitura das reações às tuberculinas deve ser realizada 48 horas após a aplicação pela medição do maior diâmetro da reação, considerando toda a extensão da reação, utilizando-se um paquímetro. Reações de edema, eritema, hiperemia, hemorragia ou necrose no local de aplicação das tuberculinas podem estar presentes e, nesses casos, devem ser consideradas como resultado positivo ao teste para a determinada PPD;

(iv) Para fins de interpretação dos resultados do teste, calcular da média aritmética das reações para cada uma das tuberculinas aplicadas, considerando todos os suínos que apresentaram reação igual a ou maior que 0,5cm de diâmetro. Se a média do diâmetro dos reagentes for maior que a PPD aviária, trata-se de infecção por micobactérias do complexo *avium*; se a média do diâmetro dos reagentes for maior que a PPD bovina, trata-se de infecção do rebanho por *M. bovis* ou *M. tuberculosis* (Tabela 30).

Tabela 30. Leitura (48 horas \pm 6 horas após a aplicação) e interpretação do teste de tuberculinização pareada em suínos com PPD aviária (TA) e PPD bovina (TB), pela medição do diâmetro maior da reação, feita com régua milimétrica.

Teste comparativo (TA \neq TB)**	Maior diâmetro da reação (mm)	Característica da reação	Interpretação*
TA > TB	Menos de 0,5cm	Nenhuma	Negativo
	De 0,51 a 1cm	Edema ou hiperemia	Suspeito
	Mais de 1cm	Edema, hiperemia hemorragia ou necrose	Positivo para <i>M. do complexo avium</i>
TA < TB	Mais de 2cm	Edema, hiperemia, hemorragia ou necrose	Positivo para <i>M. bovis</i> ou <i>M. tuberculosis</i>

* Toda medida acima de 0,5cm no diâmetro maior da reação deve ser considerada como positiva no cálculo da média.

** TA – 0,1ml de tuberculina aviária (0,05mg de PPD) e TB – 0,1ml de tuberculina bovina ou mamífera (0,05mg de PPD).

Fonte: Adaptado de^[16,18].

A relação entre a reação ao teste de tuberculinização e a observação de lesões no abatedouro depende de alguns fatores, tais como período decorrido entre a infecção e a realização dos exames, dada a possibilidade de infecções recentes, regressão das lesões com a permanência da soroconversão, dessensibilização ou lesões causadas por outros microrganismos (Tabela 31). As lesões macroscópicas podem levar mais de 90 dias para aparecer, enquanto a reação à tuberculinina pode ocorrer a partir de 24 dias após a infecção com o *M. do complexo avium*^[11].

Tabela 31. Relação entre a reação ao teste de tuberculinização e a observação de lesões na necropsia/abate e possíveis interpretações.

Reação à tuberculinização	Presença de lesões	Interpretação
Positiva	Não	a) Infecções recentes (intervalo menor que 45 dias) b) Regressão das lesões e permanência da soroconversão
Negativa	Sim	c) Lesões não progressivas antigas com dessensibilização d) Lesões causadas por outros agentes (<i>Rhodococcus equi</i>)

Fonte: Adaptado de^[11,18].

Recentemente, ensaios baseados na PCR tem sido usada com sucesso para identificar e caracterizar as diferentes micobactérias em amostras clínicas de tecido com lesão sugestiva e diferenciar micobactérias de outros agentes^[2,8,10].

c) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir micobactérias tuberculosas e não tuberculosas e doenças crônicas que cursam com perda de peso e caquexia. Os sinais respiratórios podem ser confundidos com múltiplos processos respiratórios que ocorrem entre o quarto e o sexto mês de idade, dentre eles broncopneumonia parasitária (*Metastrongilus*), pneumonia enzoótica, pleuropneumonia e pasteurelose.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para cultivo bacteriológico, ensaios moleculares baseados na PCR ou exame direto do material caseoso através de ZN, coletar linfonodos e outros tecidos com lesões macroscópicas sugestivas. Alíquotas desses mesmos órgãos/tecidos também podem ser direcionadas ao exame histopatológico. Nesse caso, esses órgãos/tecidos devem ser mantidos em solução tamponada de formol a 10%.

A análise molecular baseada na PCR para diagnóstico e a caracterização específica de certas espécies das micobactérias envolvidas na infecção também podem ser realizadas a partir de tecido já parafinizado (emblocado em parafina)^[2,10,17].

As amostras destinadas ao cultivo bacteriológico devem ser conservadas sob refrigeração a 4-8°C até o processamento laboratorial. Caso o tempo entre a coleta e o processamento exceda a 24 horas, todo o material pode ser submetido ao congelamento a -20°C.

Referências bibliográficas

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01de março de 2002, Seção 1, p. 3.
2. Bull, T.J. et al. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. **Mol. Cell. Probes.**, v. 17, p. 157-164, 2003.
3. CORNER, L.A.L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. **Vet. Microbiol.**, v. 112, p. 303-312, 2006.
4. COUSINS, D.V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 20, p. 71-85, 2001.
5. COUSINS, D.V.; FLORISSON N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 24, n. 3, 2005.
6. GYLES, C.L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blackwell Publishing. 2004. 456p.
7. HIRSH, D.C.; MACLACGLAN, N.J.; WALKER, R.W. **Veterinary Microbiology**. 2. ed. Blackwell Publishing, 2004. 536p.
8. KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 907-914, 1997.
9. MATLOVA, L. et al. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1261-1268, 2005.

10. MILLER, J.; JENNY, A.; PAYEUR, J. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium bovis* and *M. avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative organisms. *Vet. Micro.*, v. 2328, p. 1-9, 2002.
11. MORES, N. et al. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 27, n. 1, p. 13-17, 2007.
12. O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.*, v. 76, p. 1-46, 1995.
13. PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; Y FALKINHAM, J.O. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, n. 17, p. 98-106, 2004.
14. SIDDERS, B. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Immun.*, v. 76, n. 9, p. 3932-3939, 2008.
15. SILVA, V.S. et al. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 52, n. 6, p. 562-566, 2000.
16. THOEN, C.O. Tuberculosis. In: STRAW B.E. et al. (Eds.). *Diseases of Swine*. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 807-816. 2006.
17. TURENNE, C.Y. et al. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.*, n. 44, p. 433-440, 2006.
18. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

2 PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS DOS SUÍNOS

2.1 Circovirose suína

Conceito

A circovirose suína é uma doença infecciosa sistêmica causada pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2). A enfermidade pode manifestar-se sob as formas clínicas de síndrome multissistêmica do definhamento pós-desmame (PMWS), síndrome dermatite e nefropatia (PNDS), ou fazer parte do complexo de doenças respiratórias denominado “doenças do circovírus suíno” (PCVD).

Etiologia e Patogênese

Os circovírus suínos pertencem à família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*. A denominação circovírus se deve ao fato de seu genoma ser circular, com extremidades unidas de forma covalente. O PCV1 foi descrito por Tischer (1973) como um contaminante não citopático de culturas celulares, PK-15 (*Porcine Kidney*), e aparentemente é apatogênico para os suínos. Em 1998 foi descrito o PCV2 a partir de tecidos de suínos que manifestaram síndrome multissistêmica do definhamento pós-desmame^[6].

Os representantes do gênero *Circovirus* são vírus pequenos, esféricos, com 17nm, não envelopados, de simetria icosaédrica, não hemaglutinantes, com DNA circular de fita simples, sendo um dos menores genomas virais entre os vírus que infectam animais vertebrados (1.767 a 1.760 nucleotídeos)^[2]. Foram identificadas 6 a 11 ORFs (*open reading frames*) e, dessas, três foram caracterizadas quanto a sua funcionalidade: ORF1 (codifica a proteína Rep que atua na replicação do DNA viral), ORF2 (codifica proteínas do capsídeo) e ORF3 (codifica proteínas que induzem à apoptose das células infectadas)^[1,3,12]. O PCV é dividido em dois tipos: PCV1, considerado apa-

togênico para suínos, e PCV2, não citopatogênico, associado a lesões nos tecidos linfoides e à imunossupressão em suínos. Ambos são geneticamente diferentes, com menos de 80% de homologia genômica^[2].

Quanto às propriedades físico-químicas do PCV2, são considerados muito estáveis no meio ambiente, resistem a temperaturas de 60°C durante 30min ou a uma faixa de pH entre 3 e 9. É sensível a desinfetantes, oxidantes à base de peróxido de hidrogênio^[7,12] (Tabela 32).

Tabela 32. Características estruturais, constitutivas e físico-químicas do circovírus suíno tipo 2 (PCV2).

Propriedade	Característica do circovírus suíno tipo 2
Estrutura	Não envelopado, esférico, com simetria icosaédrica
Genoma	Uma molécula de DNA circular simples de 1,7 kbp com extremidades covalentemente unidas
Replicação	Replicação intranuclear nas células infectadas, produzindo corpúsculos de inclusão intranucleares
Densidade em CsCl	1,33 a 1,34 g/ml
Sensibilidade	Resiste a temperaturas de 60°C por 30min; resiste a pH entre 3 e 9; é sensível a oxidantes à base de peróxido de hidrogênio
Isolamento	Replicam-se em células de linhagem de origem suína do sistema imune, principalmente monócitos/macrófagos, sem causar efeito citopático (PK15, IBRS2 e SK, todas renais; ST de testículo de suíno; e células Vero)

Fonte: Adaptado de^[2,12].

O PCV2 tem como células alvo macrófagos/monócitos e células dendríticas foliculares dos órgãos linfoides (APCs – células apresentadoras de抗ígenos), células de origem epitelial (hepatócitos, epitélio renal, epitélio bronquial) e, em menor intensidade, linfócitos (B e T). Durante a infecção o PCV-2 induz à apoptose das células B e T nos sítios de proliferação dos tecidos linfoides e consequente depleção linfocítica^[6,13].

A infecção dos animais ocorre possivelmente pela via oronasal. Entretanto, em condições experimentais foi possível infectar os animais através das vias oronasal, parenteral e oral. Após a infecção e replicação nas células do sistema imune, o PCV2 produz viremia e se distribui no organismo do suíno podendo infectar e causar lesões em diferentes órgãos (pulmões, tecido linfoide, rins, pele, fígado), considerados órgãos alvo. A predileção por macrófagos e células dendríticas foliculares, presentes no timo, baço, linfonodos e tecido linfoide associado a mucosas (MALT) e, esporadicamente, células linfoides, sugere a relação entre a patogênese da infecção e a depleção do sistema imune^[6,13,14]. Nessas circunstâncias, devido à debilidade do animal infectado em montar uma resposta imune satisfatória em consequência do desequilíbrio nos fatores mediadores da imunidade, como as citocinas, a morte de linfócitos e a falha na reposição de células linfoides colaboraram para essa imunodeficiência. Nessas circunstâncias o animal fica suscetível de forma sinérgica ou de forma secundária a infecções por outros agentes bacterianos e virais, que agravam o quadro clínico e lesional da doença^[11]. Entretanto, apesar do aumento na suscetibilidade a outros agentes, ainda não está claro por que alguns leitões adoecem e outros, mesmo infectados, não apresentam expressão da doença clínica^[6].

A disseminação do vírus no organismo está ligada à mobilidade das células infectadas, generalizando a infecção ao sistema linfoide e a diferentes órgãos. O vírus já foi isolado ou detecta-

do nas tonsilas, timo, baço, fígado, rins, nódulos linfáticos, mucosa nasal, pulmão, intestino delgado, medula óssea, encéfalo, testículo e sêmen^[8,14].

Nos casos de PMWS, antígenos virais (PCV2) podem ser encontrados no citoplasma de PMNs, células macrófagas (macrófagos alveolares, células de Kupffer, macrófagos do baço e histiocitos), células dendríticas foliculares e células linfoïdes (B e T). Esporadicamente, o DNA ou Ag de PCV-2 podem ser encontrados no citoplasma de células dos epitélios respiratório e renal, endotélio vascular, células ductais e acinares pancreáticas e núcleos de monócitos, macrófagos, células musculares lisas, hepatócitos e enterócitos^[9,10].

A diminuição na expressão de IL-10 tem sido associada à depleção e à atrofia tímica, bem como à diminuição da IL-2 no baço, IL-4 em tonsilas e linfonodos, IL-12 no baço e linfonodos inguinais e IFN- α e IL-10 em linfonodos inguinais^[5]. Com relação a IL-8, permanece alta em tecidos com lesões leves ou moderadas, com pequena quantidade de vírus, porém ela se apresenta em níveis baixos em situações com lesões severas^[4]. Essa interação de fatores de sinalização celular talvez resulte na inibição de fatores antivirais, aumente a apoptose e reduza a proliferação de células linfocíticas (principalmente T) e na diminuição da apoptose de macrófagos, principal célula alvo para o vírus. As alterações histológicas se concentram mais evidentemente nos tecidos linfoïdes (linfonodos, baço, timo, amígdalas e placas de Peyer), no pulmão e nos rins^[10,12].

Desde as fases iniciais da infecção por PCV2 os animais eliminam o vírus através de fezes, urina, sêmen e secreções nasais durante longo período, podendo chegar a meses. Além disso, foi comprovada a presença do vírus na cavidade nasal, tanto de animais saudáveis quanto de doentes, com ou sem viremia; contudo, não está totalmente claro quais são as vias de transmissão^[6,13].

Nos casos de PDNS, os sinais clínicos e as lesões estão associados a uma enfermidade vascular sistêmica mediada por “imunocomplexos”, com afinidade por vasos sanguíneos pequenos e medianos, desencadeando um quadro de vasculite sistêmica com tropismo pela pele e rins. Nesse caso, observam-se lesões hemorrágicas subcutâneas, principalmente no períneo e no abdome, hipertrófia dos gânglios linfáticos e glomerulonefrite^[6,13].

Diagnóstico

O diagnóstico das diferentes formas clínicas da circovirose deve ser baseado na combinação entre dados epidemiológicos, sinais clínicos, lesões anátomo-histopatológicas e detecção de antígenos virais ou DNA viral.

a) Epidemiologia

O PCV-2, aparentemente, tem como hospedeiro natural suídeos domésticos e javalis, não sendo detectados anticorpos ante PCV2 por imunofluorescência em ovinos, bovinos, caprinos, equinos e humanos^[8,9].

Devido à transmissão eficiente do PCV-2 entre granjas e entre animais de uma mesma granja, grande parte das granjas brasileiras é soropositiva; isso é diagnosticado em todos os países produtores de suínos.

O PCV-2 pode ser transmitido por via horizontal e vertical. Apesar de a transmissão oronasal ser a rota mais frequente, devido à associação com casos de abortos e natimortos, indica que a transmissão transplacentária também pode ocorrer se matrizes soronegativas forem infectadas durante a prenhez. Antígenos virais/DNA viral têm sido encontrados no sêmen de cachaços, mas há divergências quanto à capacidade infecciosa.

A movimentação e a introdução de animais nas granjas parecem ser as formas mais evidentes de entrada do vírus na granja (Tabela 33). Apesar de a transmissão mais provável ser pelo contato direto entre animais doentes e saudáveis, o vírus por ser muito estável no ambiente e pode ser

veiculado de forma mecânica (caminhões, roupa, fômites). Pássaros e roedores presentes na granja também podem transmiti-la mecanicamente. A alta densidade e a ausência de manejo, como *all in/all out*, favorecem a transmissão do agente.

Tabela 33. Fatores potenciais implicados na transmissão do PCV-2 entre granjas e entre animais de uma mesma granja.

Condição	Principais fatores implicados na transmissão de PCV-2
Transmissão entre granjas	Movimentação de animais Via indireta: por roupas, calçados, veículos, fômites, equipamentos e, provavelmente, pássaros e roedores Sêmen (não confirmado; somente confirmada a presença do material genético do vírus)
Transmissão entre animais da granja	Contato direto entre suínos sadios e enfermos, através de fezes, urina e secreções nasais Fatores que favorecem a transmissão: - alta densidade de animais por baia - produção contínua sem <i>all in/all out</i> - práticas de manejo que causam comprometimento da imunidade

Devido às características particulares desse vírus, possivelmente o aparecimento de sinais clínicos e de lesões está relacionado a fatores como estresse e comprometimento da imunidade. E outros microrganismos que, além de favorecer o aparecimento de sinais clínicos e lesões, tendem a agravar o quadro.

Clinicamente, a circovirose pode manifestar-se por PMWS e PDNS. A PMWS é uma doença multifatorial e, portanto, a expressão clínica e as perdas na produção dependem da intensidade dos fatores de risco aos quais estão expostos os animais. Os principais fatores de risco são superlotação, baixo peso ao nascimento/desmame e a presença de infecções concomitantes por *Haemophilus parasuis*, *Salmonella* sp., *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus suis*^[7]. Essa forma clínica afeta leitões pós-desmame, entre a seis e 14 semanas de idade, apesar de outros autores já haverem verificado a infecção em leitões de 1 a 6 meses de idade. A morbidade é frequentemente superior a 50%, e a mortalidade dos animais clinicamente afetados varia de 10% a 80%, sendo mais alta em machos que em fêmeas^[14]. A imunidade passiva (anticorpos maternos) persiste por cinco a oito semanas após o nascimento; já a soroconversão ocorre por volta de oito a 12 semanas^[5].

Atualmente, é discutida a presença de maior ou menor suscetibilidade de determinadas raças ou linhagens, principalmente associadas as linhagens de machos, quanto a infecção por PCV2 e o consequente desenvolvimento clínico das PMWS. Entre as diferentes raças, recentes estudos descrevem uma maior suscetibilidade da raça Landrace quando comparada com Duroc e Large White, contudo outros estudos têm expressado dados um tanto contraditórios.

Em relação à PDNS, a epidemiologia está menos clara. Entretanto, sabe-se que a forma clínica afeta principalmente animais entre 12 e 16 semanas e raramente atinge reprodutores. Pode aparecer de forma esporádica ou epidêmica, com uma morbidade de aproximadamente 10%^[6].

b) Sinais clínicos

A infecção por circovírus gera uma série de sinais clínicos inespecíficos e quadros que se apresentam na forma de síndromes. De modo geral, os animais apresentam hipertermia leve a mo-

derada, letargia, depressão e, em alguns casos, icterícia, hipertrofia de gânglios linfáticos, transtornos respiratórios leves a moderados e maior suscetibilidade a infecções bacterianas.

Os animais que manifestam a PMWS apresentam sinais clínicos variáveis de acordo com a condição sanitária do rebanho. Classicamente, é observada rápida e progressiva perda de peso, abdome distendido, aumento dos linfonodos, apatia, anorexia, palidez, cerdas opacas e, ocasionalmente, diarreia, pneumonia e icterícia^[2]. Em estágios mais avançados da doença, ou nos casos mais graves, os animais podem apresentar, ainda, tosse, dispneia, febre (40 a 41°C), palidez e caquexia^[14]. Infecções secundárias podem agravar os quadros de pneumonia e enterite.

Nos casos de PNDS, o quadro clínico está associado a uma vasculite sistêmica mediada por “imunocomplexos” com tropismo pelo endotélio vascular da pele e dos rins. Nesse caso, observam-se lesões hemorrágicas subcutâneas, principalmente no períneo e no abdome, hipertrofia dos gânglios linfáticos e glomerulonefrite^[6]. As lesões cutâneas aparecem como máculas e pápulas de cor morrom-avermelhada de diferentes tamanhos e formas que podem confluir e formar grandes zonas lesionadas^[13]. Em duas a três semanas as lesões aparecem cobertas por crostas escuras. Os suínos mais afetados podem apresentar anorexia, depressão e febre (40 a 41°C).

Essa forma afeta principalmente leitões na fase de creche, crescimento e terminação causando alta mortalidade. Os animais desenvolvem uma série de sinais sistêmicos inespecíficos, como febre, anorexia, depressão e prostração. Tanto por ocasião do exame clínico quanto da necropsia é possível observar o desenvolvimento de lesões crostosas escuras, irregulares ou circulares vermelho-púrpura, que iniciam nos membros posteriores, na região inguinal, no abdome, evoluindo para flancos e orelhas e, em alguns casos mais graves, tomando praticamente toda a pele, causando até mesmo a necrose da borda das orelhas^[8].

Outras formas clínicas têm sido descritas e associadas à infecção por PCV2. Entre elas destacam-se: tremor congênito, associado a processos de desmielinização no cérebro e na medula espinhal; falhas reprodutivas, causando aumento no número de abortos, natimortos, mumificados, associadas a uma miocardite não supurativa a necrotizante nos fetos^[2,8]. A coinfecção do PCV-2 com outros vírus patogênicos, como o *Parvovírus porcino* (PPV) e o vírus da PRRS (PRRS_V) tende a expressar um sinergismo ou uma complementaridade no desenvolvimento de suas patologias, agravando os quadros clínicos.

c) Patologia

Nos casos de síndrome multissistêmica do definhamento (PMWS), durante a necropsia é possível observar linfonodos pálidos e aumentados (principalmente inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos), com áreas de enfartamento na fase inicial da infecção, apresentando-se de tamanho normal ou hipotróficos, em estágios mais avançados da doença^[2,7]. Em alguns casos pode ser observado edema de mesentério e úlceras gástricas. Lesões concomitantes de polisserosites e colite associadas a infecções secundárias podem ser observadas com frequência. É possível observar, esporadicamente, discreta hipertrofia renal com a presença de estrias brancacentas envolvendo as regiões cortical e medular^[6,14]. Os pulmões encontram-se aumentados, com presença de edema interlobular, não colapsados (armados).

Nos animais que manifestam a síndrome da dermatite e nefropatia (PNDS), por ocasião da necropsia, classicamente, é possível observar o desenvolvimento de lesões crostosas na pele (máculas e pápulas), irregulares ou circulares, vermelho-púrpura (vasculite necrotizante), que são recobertas por crostas escuras^[6]. As lesões iniciam nos membros posteriores, na região inguinal, no abdome, evoluindo para flancos e orelhas. Rins aumentados, superfície cortical granular (pontos brancos) e pequenos pontos avermelhados na região cortical também podem estar presentes. Essas lesões correspondem à lesão de glomerolite fibrinonecrótica e de glomerulonefrite. Os linfonodos apresentam-se aumentados e com áreas de enfartamento^[13].

Em geral, os achados histopatológicos revelam depleção linfocitária variável nos órgãos linfoides, necrose celular de hepatócitos e processos inflamatórios mononucleares de intensidade leve a moderada, que podem afetar distintos tecidos, principalmente nódulos linfáticos, pulmão, intestino, fígado, rins e coração^[11,12]. Essas lesões são leves em infecções subclínicas por PCV2, porém atingem toda sua plenitude em casos de SDM. Também é possível observar infiltração de macrófagos que, ocasionalmente, contêm corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticas do tipo basofílico nos tecidos linfoides e em outros tecidos.

Na PMWS, classicamente, observam-se, na histopatologia, lesões e depleção linfoide com necrose de células linfoides nos centros foliculares nos linfonodos e no baço, infiltração de histiócitos (inflamação granulomatosa dos órgãos linfoides), pneumonia intersticial e, ocasionalmente, pneumonia granulomatosa, fibrose peribronquial, hepatite linfo-histiocítica periportal com vacuolização e necrose hepatocelular, infiltrado linfo-histiocítico na mucosa do estômago, ceco e cólon, nefrite intersticial e glomerulonefrite linfo-histiocítica com perivasculite não supurativa^[7,14]. Corpúsculos de inclusão basofílicos no citoplasma de macrófagos podem ser encontrados em histiócitos e em células dendríticas. Na PNDS, microscopicamente, é epidermite hemorrágica aguda, associada à vasculite necrótica sistêmica, principalmente da derme superior, e arterite necrótica na derme inferior, além de infiltrado leucocítico perivascular^[13].

As lesões renais se caracterizam por glomerulonefrite exsudativa (aguda), com grande quantidade de proteína na cápsula de Bowman e nos túbulos, que se apresentam distendidos. Em alguns casos pode aparecer fibrose cortical e exsudato fibrinoso na cápsulas de Bowman. Nos casos crônicos é possível observar esclerose glomerular, inflamação e fibrose intersticial e atrofia tubular. A presença de vasculite nas pequenas artérias do baço, fígado e gânglios linfáticos, fluido serossanguinolento nas articulações e vasculite necrotizante nas cápsulas articulares também pode ser evidenciada^[6,13].

d) Diagnóstico laboratorial

A aplicação e a interpretação dos testes diagnósticos devem ser cuidadosas, pois inúmeras granjas com animais positivos para a presença do vírus ou anticorpos do PCV-2 não apresentam evidências de sinais clínicos ou lesões. Por isso, a interpretação dos resultados laboratoriais deve ser avaliada cuidadosamente, visto que o agente está extremamente disseminado no ambiente e nem a presença do agente nem a presença de anticorpos do PCV2 são indicativos da doença. Em todos os casos o diagnóstico definitivo deve incluir a detecção do vírus (antígenos virais ou ácido nucleico) associada com o quadro clínico-lesional evidenciado pelo exame clínico do rebanho ou do indivíduo, necropsia e exame histopatológico.

A detecção de antígenos virais pode ser realizada por técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e ELISA de captura (cELISA). Já a detecção do genoma viral pode ser realizada por meio de ensaios moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase, como *real time* PCR (qPCR), PCR convencional ou hibridização *in situ* (HIS).

A imunohistoquímica (IHQ) permite a detecção de antígenos virais sobre esfregaços de tecido fixados com acetona, cortes de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, ou cultivos celulares inoculados. É uma técnica rápida e de alta sensibilidade, que emprega um anticorpo policlonal ou monoclonal específico a antígenos do PCV-2, sendo a detecção realizada mediante um anticorpo secundário conjugado com uma enzima do complexo enzimático.

A técnica de hibridização *in situ* possibilita localizar, com precisão, no tecido parafinado ou congelado, um gene ou uma sequência específica do genoma viral utilizando sondas de DNA específicas. Técnicas moleculares utilizando a PCR permitem a detecção, a caracterização e a quantificação (qPCR) do PCV2 a partir do tecido lesionado oriundo de amostras clínicas a fresco ou mesmo parafinado.

O isolamento viral se realiza pela inoculação de macerados de amostras suspeitas em cultivos primários de macrófagos ou linhagens celulares como PK-15, ST ou SK-6 (rins de suíno). Como não produz efeito citopático, a replicação viral é observada mediante a detecção de抗ígenos virais ou DNA viral.

Testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos, no soro, para抗ígenos virais do PCV2, apesar de não serem recomendados para o diagnóstico da doença, podem ser utilizados para estudo de soroprevalência da doença nos rebanhos.

e) Diagnóstico diferencial

Devido à característica de doença sistêmica imunossupressora, o PCV2, frequentemente, tem sido associado a doenças como parvovirose, infecções bacterianas causadas por *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodesenteriae* e *B. pilosicoli*, *Salmonella* spp., entre outras. Outros agentes secundários também associados com quadros de imunossupressão, como *Staphylococcus hyicus*, *Aspergillus* spp. e *Chlamydia* spp. também podem estar presentes e devem ser considerados no diagnóstico diferencial. O diagnóstico diferencial das lesões histológicas de circovirose deve ser feito em suínos, principalmente ante o complexo de micobacteriose e infecções por *Rhodococcus equi*.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras clínicas de eleição a serem enviadas ao laboratório veterinário para o diagnóstico da circovirose suína são: linfonodos (preferencialmente inguinais, mediastínicos e mesentéricos), tonsilas, fragmentos intestinais (jejuno, ileo, ceco e cólon espiral), baço, pulmão, fígado, rins e sistema nervoso. É imprescindível que, para o monitoramento da doença nas granjas, a amostragem contemple os animais das seguintes faixas etárias: 40 dias, 70 dias, 90 dias e 120 dias.

É importante que alíquotas das amostras clínicas sejam enviadas para isolamento bacteriológico visando ao diagnóstico diferencial. As amostras destinadas a isolamento viral, qPCR, PCR e diagnóstico bacteriológico diferencial devem ser enviadas ao laboratório sob refrigeração (4 a 8°C). Já as amostras destinadas a IHQ e histopatologia devem ser fixadas em solução de formol a 10% tamponada.

Para o sorodiagnóstico, enviar 3 a 6mL de soro, tendo o cuidado de amostrar de forma representativa o rebanho. De modo geral, considera-se que devam ser amostrados aproximadamente 25 animais das seguintes fases ou faixas etárias: 21 dias ou desmama, 35 dias, 80 dias, 110 dias, 150 dias e animais de reprodução. O soro deve ser mantido sob refrigeração a 4°C ou congelado.

Referências bibliográficas

1. AGUERO, M; ARIAS, M; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Development of a novel Multiplex PCR for porcine Circoviruses detection and preliminary field testing. In: CONGRESS OF VETERINARY VIROLOGY, 5, 2000, Brescia, Italy. **Proceedings...** Brescia, 2000. p. 34-35.
2. ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 3-14, 2000.
3. ALLAN, G.M. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 10, p. 3-10, 1998.
4. DARWICH, L. et al. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 2117-2125, 2003.

5. DARWICH, L. et al. Changes in CD4+, CD8+, CD4+, CD8+, and immunoglobulin M-Positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and *Porcine Circovirus* Type 2 load in lymphoid tissues. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 9, n. 2, p. 236-242, 2002.
6. DROLET, R. et al. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health Prod.*, v. 7, n. 6, p. 283-285, 1999.
7. ELLIS, J.A. et al. Coinfection by porcine circovirus and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 12, p. 21-27, 2000.
8. HARDING J.C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microbiol.*, v. 98, n. 2, p. 131-135, 2004.
9. MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; BROCKBANK, O.C.S. Evaluation of a porcine circovirus type-2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 14, p. 106-112, 2002.
10. MCNEILLY, F. et al. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods*, v. 80, n. 2, p. 123-128, 1999.
11. ROSELL, C.; SEGALES, J.; DOMINGO, M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.*, v. 37, n. 6, p. 687-692, 2000.
12. SEGALES, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine Circovirus Diseases. In: Straw B.E.; D'Allaire, S.; Mengeling W.L.; Taylor, D.J. (Eds.). *Diseases of Swine*. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 299-308, 2006.
13. SMITH, W.J.; THOMPSON, J.R.; Y DONE, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, v. 132, n. 2, p. 47-59, 1993.
14. ZANELLA, J.R.C.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. *Arq. bras. med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 5, p. 522-527, 2003.

2.2 Doença de Aujeszky

Conceito

A doença de Aujeszky (DA), ou pseudorraiva, é uma enfermidade infectocontagiosa de notificação obrigatória, causada por um *Alfaherpesvirus*, o vírus da doença de Aujeszky (DAV). A doença foi descrita primeiramente em bovinos em 1902 por Aladar Aujeszky, na Hungria, e em suínos no ano de 1914, na Alemanha. Atualmente, a DA está presente em muitos países produtores de suínos e representa uma das mais impactantes barreiras para o comércio internacional da carne suína.

Etiologia e Patogênese

O vírus da doença de Aujeszky (DAV), também denominado herpes-vírus porcino tipo I (HPV-I), pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e, por ser um herpes vírus, tem como uma das principais características a habilidade de estabelecer infecções latentes no hospedeiro.

Os *Alfaherpesvirus* possuem como principais propriedades biológicas a capacidade de infectar várias espécies animais, replicar-se rapidamente, causar efeito citopático em células de cultivo laboratorial, e estabelecer infecções latentes em gânglios do sistema nervoso periférico^[11].

O DAV é um vírus DNA, envelopado, icosaédrico, e mede 150 a 180nm de diâmetro (Tabela 34). Possui um ciclo de infecção lítica em menos de 24 horas e habilidade para estabelecer infecções latentes em células do tecido nervoso, especificamente no gânglio trigêmeo. O genoma viral é composto por uma dupla fita de DNA de aproximadamente 150kb, formada por um segmento L (*long*), segmento S (*short*), flanqueado por duas sequências invertidas, Ir (internas) e Tr (terminal)^[11,12].

Tabela 34. Características estruturais, constitutivas e físico-químicas do vírus da doença de Aujeszky.

Propriedade	Característica
Classificação	O DAV é um herpes-vírus porcino tipo I (HVP-I), pertencente à família <i>Herpesviridae</i>
Estrutura	Tamanho do virion: aproximadamente 150 a 180nm de diâmetro; nucleocápside de estrutura icosaédrica envolto por uma série de proteínas glicosiladas denominadas glicoproteínas virais
Genoma	Composto por uma fita dupla de DNA linear, de aproximadamente 150kpb, formado por um segmento longo (L) e um curto (S) flanqueado por duas zonas de sequências repetidas e invertidas, interna (Ir) e terminal (Tr)
Sensibilidade no ambiente	Muito estável em faixas de pH entre 6 e 8. Inativado entre 1 e 7 dias em substratos com pH menor que 5 ou maior que 9,7
Substâncias inativadoras	Hidróxido sódico (NaOH) a 5%; compostos à base de amônia quaternária; etanol 70%; calor, a 60°C por 30 a 60min causa perda da infectividade da partícula viva
Desinfetantes	Derivados fenólicos (formol e formaldeídos) destroem o vírus em 5 minutos

Atualmente são descritas 11 glicoproteínas virais: cinco essenciais para a multiplicação do vírus, denominadas gB (anteriormente gII), gD (gp50) gH, gK e gL, e cinco não essenciais, denominadas gC (gIII), gE (gI), gG (gX), gI (gp63), e gM. Recentemente foi identificada uma nova proteína e denominada gN. Todas as glicoproteínas, com exceção da gG, estão localizadas no envoltório do virion. Essas proteínas estabelecem sua função em diferentes níveis do ciclo replicativo, controlando funções relacionadas a aderência, penetração, disseminação do vírus e evasão do sistema imune. Proteínas não estruturais com atividade enzimática, como a timidina Kinase (tk), essencial para o crescimento do vírus em cultivos celulares, participam nas funções de neurovirulência, e sua deleção origina cepas atenuadas^[4,7].

As glicoproteínas gB, gC e gD são imunógenos potentes do virion, induzindo anticorpos neutralizantes que inibem a adesão do vírus, bloqueando a infecção em estágios mais precoces^[3]. A deleção do complexo gE/gI leva à atenuação da virulência, visto que atua funcionalmente no transporte de novas partículas virais para fora da célula infectada. Devido a essa característica e suas propriedades imunogênicas, a gE tem sido uma das glicoproteínas empregadas como marcador de抗ígenos vacinais nos quais a gE está ausente^[1,9]. As glicoproteínas gC, gD e gB do VDA induzem a anticorpos neutralizantes protetores no suíno^[1].

Os principais mecanismos de defesa ante a infecção por ADV são: INF-γ e células NK (in específicos), anticorpos neutralizantes, anticorpos mediadores de mecanismos de citotoxicidade celular, dependentes de complemento, linfócitos T citotóxicos e hipersensibilidade retardada, ou IV^[6,9].

Os mecanismos imunológicos de base humoral, representados pelos anticorpos, fundamentalmente neutralizantes e indutores de citotoxicidade (ADCC), impedem a disseminação do vírus pela aglutinação, neutralização e opsonização^[4,6]. Nos mecanismos imunológicos de base celular participam linfócitos T (CD4+ e CD8+), responsáveis pela ativação dos linfócitos B e pela atividade citotóxica respectivamente. Entre as citocinas, o INFγ possui forte atividade antiviral modulando a resposta citotóxica^[9].

A patogenia apresenta variações dependendo da cepa viral, da idade do animal, da dose infectante e da via de inoculação, podendo levar a manifestações nervosas, respiratórias, reprodutivas, ou mesmo apresentar-se como uma infecção latente. Em condições naturais, provavelmente a principal rota de infecção é oronasal. Nessas circunstâncias, os primeiros sítios de replicação são o epitélio da nasofaringe e as tonsilas. Caso a infecção ocorra pela via genital, a replicação ocorrerá no local de penetração e nos gânglios linfáticos regionais^[2]. Quando a doença se apresenta na forma nervosa, o vírus atravessa o epitélio da nasofaringe e as tonsilas, invade terminações nervosas locais e, através do fluxo axonal ascendente (fluxo centrípeto), é transportado ao longo dos axônios até o bulbo olfatório ou gânglio trigêmeo, onde pode desenvolver uma infecção lítica ou latente. Após a multiplicação primária, o vírus migra através do V par cranial (nervo trigêmeo) ao bulbo e ponte, e através do I par cranial (nervos olfatórios) e do IX par cranial (glossofaríngeo) ao bulbo. A viremia e a invasão do sistema nervoso central são praticamente simultâneas, porém na forma respiratória a infecção do SNC ocorre em uma fase posterior^[2,7].

Quando ocorre a reativação da infecção pelo vírus, este migra de volta aos sítios da infecção primária (fluxo centrífugo), replica-se e ocorre viremia^[6]. Após uma infecção ativa ou após a reativação do vírus, este pode ser encontrado em diferentes tecidos e ser excretado ao meio ambiente^[11].

Na forma respiratória o vírus atravessa o epitélio da nasofaringe e das tonsilas passa para os gânglios linfáticos regionais, chega à corrente sanguínea (de onde é possível isolar o vírus de células linfoides e monócitos), através da qual alcança os diferentes órgãos e tecidos, infectando macrófagos alveolares, epitélio dos bronquíolos, células linfoides do baço, gânglios linfáticos, células ad-renais corticais, hepatócitos e células do corpo lúteo no ovário^[2].

Na forma reprodutiva da doença, acredita-se que o vírus atravesse a barreira transplacentária e infecte os embriões, mesmo em estágios bem jovens. Se a infecção ocorrer a partir dos 45 dias de gestação, geralmente ocorrem abortos acompanhados ou não de febre e anorexia, e a infecção mais precoce leva à absorção fetal^[2,8]. Na forma latente da infecção pelo DAV, o DNA viral pode ser detectado nos neurônios, sem expressão gênica. Pode haver, também, replicação viral sem sinais clínicos, permanecendo de forma latente fora do alcance do sistema imunológico por longo tempo ou toda a vida do animal, porém infecções latentes podem ser reativadas por situações de estresse. Nessas circunstâncias, o vírus replica-se e é excretado ao meio ambiente, servindo como fonte de infecção para os animais suscetíveis^[8,11,12].

Diagnóstico

É uma doença de notificação obrigatória, e o diagnóstico definitivo somente é obtido através de ensaios sorológicos ou moleculares^[5,12]. O diagnóstico sugestivo deve considerar dados epidemiológicos, presença de sinais clínicos associados a transtornos reprodutivos, sinais nervosos, elevada mortalidade de leitões jovens e a presença de lesões sugestivas na necropsia.

a) Epidemiologia

O suíno e o javali são considerados os únicos hospedeiros naturais e reservatório do ADV na natureza, que pode estabelecer infecções clínicas, subclínicas ou latentes e servir como fonte natural de infecção para outras espécies animais^[11].

A introdução do VDA no rebanho se dá através de suínos portadores (forma latente), sêmen contaminado e perdigotos através de correntes de ar (em até 500m). A transmissão do vírus entre animais da mesma granja ocorre por aerossóis, contato com secreções e excreções, via venérea, e alimentos e fômites contaminados^[10]. Felinos, caninos, humanos, insetos, roedores e veículos também são considerados vetores na transmissão do DAV^[2,12].

As vias de entrada do vírus no suíno podem ser oronasal, transplacentária, venérea e através de fluidos orgânicos, como sêmen e leite. A enfermidade cursa com alta morbidade e mortalidade

variável, dependendo da idade do animal e da cepa do vírus que está infectando. Em um rebanho suscetível, suínos de todas as fases podem ser acometidos, porém após o estabelecimento de imunidade no rebanho, a infecção se restringe a animais suscetíveis que são introduzidos no plantel, ou animais em que ocorre reativação da latência viral por condições estressantes (transporte, parto, infecções sistêmicas, corticoides, doenças parasitárias, deficiências de manejo)^[2,10] (Tabela 35).

Tabela 35. Nível de suscetibilidade de algumas espécies animais à infecção pelo vírus da doença de Aujeszky (DAv).

Suscetibilidade	Espécie animal
Muito sensíveis	Gatos, ovelhas, cabras, bovinos, cães, guaxinins, gambás
Moderadamente sensíveis	Coelhos, lebres, veados, ratos, camundongos

Os animais infectados podem tornar-se portadores assintomáticos e fontes de disseminação do vírus. Outras espécies de mamíferos domésticos, como bovinos, ovinos, caprinos, felinos e caninos, e algumas espécies silvestres também são susceptíveis à infecção pelo ADV. A contaminação desses animais ocorre pela ingestão de carne ou tecidos de suínos infectados^[2,11]. Nessas espécies, a enfermidade se desenvolve de forma rápida e leva a uma encefalite fatal, além de intenso prurido e, em alguns casos, automutilação. Em ruminantes, o quadro de prurido e automutilação geralmente é muito intenso, sendo a doença chamada “peste de coçar”. Os felinos desenvolvem um quadro superagudo de encefalite fatal, sendo considerado hospedeiro secundário, terminal e raramente elimina o vírus, podendo ser considerado um animal sentinela. A infecção de equinos e aves é muito rara, sendo considerados refratários^[8,12].

b) Sinais clínicos

A DA pode manifestar-se de três formas clínicas (Tabela 36): nervosa, respiratória ou reprodutiva, dependendo da cepa do vírus, da dose infectante e, principalmente, da idade do animal.

Tabela 36. Formas clínicas da doença de Aujeszky em suínos e sinais mais frequentemente correlacionados.

Forma clínica	Sinais Clínicos correlacionados
Nervosa	Típica em leitões: febre (40 a 41°C); prostração; anorexia; tremores; hipersalivação; incoordenação; ataxia; paralisia nervosa posterior, adotando postura de “cão sentado”
Respiratória	Típica em animais de crescimento e terminação: febre; depressão; anorexia; tosse; espirro; descarga nasal; dispneia
Reprodutiva	Inicialmente desenvolvem sinais respiratórios, seguidos de aborto, sinal mais característico em fêmeas gestantes em qualquer fase de gestação; pode ocorrer febre e anorexia; se a infecção ocorre no primeiro terço da gestação, pode haver reabsorção fetal e retorno ao estro; no terço final ocorrem abortos e mumificações, além de natimortos e leitões fracos; os sinais reprodutivos têm incidência moderada e raramente ultrapassam 20% das fêmeas gestantes; a mortalidade é menor que 2%
Inaparente	A infecção pode passar despercebida em granjas sem fêmeas gestantes e leitões; geralmente associados a unidades de creche e terminação, que apresentam sinais respiratórios moderados, como tosse, dispneia e espirro, que podem ser confundidos com outras doenças respiratórias, como a influenza suína

Forma nervosa: observada em leitões de até nove semanas de idade. O período de incubação é de 2 a 4 dias e os animais manifestam apatia, anorexia, febre e sinais nervosos, como tremores, salivação, incoordenação, ataxia, que evoluí para opistotônico, e convulsão (Tabela 37). A morte ocorre dentro de 72 horas após o início dos sinais clínicos. A mortalidade em animais de até duas semanas é de 100%, e de três a nove semanas pode chegar a 60%^[8].

Tabela 37. Características e sinais clínicos da doença de Aujeszky de acordo com a idade ou fase do ciclo produtivo dos animais

Característica clínica	Fase do ciclo produtivo		
	Leitões (maternidade e creche)	Crescimento e terminação	Reprodutores
Período de incubação	2 a 4 dias	3 a 6 dias	3 a 6 dias
Primeiros sinais da doença	Febre (41 a 42°C); anorexia; apatia	Febre (41 a 42°C); inapetência e depressão	Febre (41 a 42°C); inapetência e depressão
Sinais nervosos	Hipersalivação; opistotônico; incoordenação; pedalagem; postura de “cão sentado”	Tremores e convulsões	-
Sinais respiratórios	-	Às vezes, tosse, espirro e dispneia	Às vezes, tosse, espirro e dispneia
Falhas reprodutivas	-	-	Aborto, infertilidade, reabsorção fetal, natimortos, mumificados e leitões fracos
Sinais digestivos	Vômitos e diarreia	-	-
Morbidade	100%	100%	20%
Mortalidade	50% a 100%	1% a 2%	1% a 2%

Forma respiratória: comum em animais de crescimento, terminação e reprodução. Os sinais clínicos se iniciam após um período de incubação de 3 a 6 dias, quando os animais passam a apresentar apatia, anorexia, febre, corrimento nasal, espirros, tosse, dispneia e pneumonia. Os sinais nervosos são menos frequentes nessa fase. A morbidade é muito alta, entretanto a mortalidade, se não há infecção secundária por *Pasteurella multocida* ou *Actinobacillus pleuropneumoniae*, não passa de 1% a 2%. Ao cessar a febre os animais tendem a recuperar-se^[8,11].

Forma reprodutiva: essencialmente, as matrizes manifestam repetição de cio, aborto e aumento na taxa de natimortos e mumificados, dependendo da fase de gestação em que a porca é infectada. A morbidade nessa forma atinge, no máximo, 20%. Em machos ocorre apatia, hipertermia, anorexia, sinais respiratórios e infertilidade. Raramente ocorrem sinais nervosos em animais adultos^[6,8,11].

c) Patologia

Na necropsia, não há a presença de lesões características, e quando presentes são mínimas ou não detectáveis, principalmente na forma nervosa. Na forma respiratória é possível observar lesões pulmonares que podem variar desde edema pulmonar até pequenos focos de necrose, hemorragia ou pneumonia. Pode ocorrer necrose multifocal no fígado e no baço. As porcas que abortam apresentam endometrite catarral e engrossamento do útero. Nos machos ocorre edema e aumento da bolsa testicular^[6,8,12].

Na histopatologia é possível observar encefalite ou meningoencefalite não purulenta com envolvimento da substância cinzenta, característica da doença. Ocorre ganglioneurite, mielite, presença de manguitos perivasculares, necrose neural, gliose e neuronofagia. Inclusões intranucleares típicas nos neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e margem das lesões de necrose eventualmente podem ser encontrados^[7,8,11]. No sistema respiratório é possível observar bronquite, bronquiolite, alveolite necrótica, edema pulmonar e pneumonia intersticial. Podem ser observados, ainda, focos de necrose com ausência de inflamação ou pequeno infiltrado inflamatório no pulmão, baço, fígado, linfonodos e glândulas ad-renais. Nos casos em que ocorrem sinais de alterações reprodutivas, é possível observar endometrite, vaginite linfo-histiocitária e placentite necrótica. Em machos ocorre periorquite exsudativa com lesões necróticas e inflamatórias na túnica albugínea e degeneração dos túbulos seminíferos^[6,7,8,11].

d) Diagnóstico laboratorial

Existe um grande número de métodos específicos para o diagnóstico da DA baseados no isolamento e na identificação do vírus mediante a detecção de抗ígenos virais (glicoproteínas do vírus) ou do ácido nucleico viral (DNA) ou, ainda, na detecção de anticorpos específicos no soro ou nos fluidos orgânicos produzidos durante a infecção ou a vacinação.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), para o diagnóstico da DA em suídeos devem ser utilizadas as provas sorológicas de ensaio imunoenzimático, ELISA triagem ou ELISA diferencial para a glicoproteína viral gE naqueles estabelecimentos onde a vacinação é praticada, e o teste de virusneutralização realizado exclusivamente em laboratório oficial ou credenciado^[5].

O isolamento viral é considerado o método mais sensível e específico para o diagnóstico, sendo baseado na infecção de células suscetíveis por ADV, que provoca efeito citopático. Para a identificação do vírus, associa-se uma técnica de detecção viral para diferenciar o efeito citopático causado por outros vírus, ou fatores tóxicos inespecíficos.

A detecção do vírus (DNA viral) pode ser realizada com base na técnica de PCR. Essa técnica possui alta sensibilidade e detecta quantidades mínimas do agente infeccioso em qualquer tipo de amostra ou tecido do animal infectado, mesmo de amostras difíceis de praticar o isolamento, como o sêmen. Além disso, permite detectar o vírus em estado latente. O uso de primers específicos para uma região do gene que codifica a glicoproteína gE permite identificar e diferenciar um animal vacinado de um infectado.

e) Diagnóstico diferencial

Algumas infecções virais, fúngicas ou bacterianas produzem sinais clínicos e lesões similares à DA. Assim, é necessário estabelecer um diagnóstico diferencial e uma posterior conformação laboratorial para adotar as medidas sanitárias convenientes. (Tabela 38).

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para isolamento viral ou provas moleculares (PCR), remeter ao laboratório amostras de cérebro, baço, tonsilas, gânglio trigêmeo, medula espinhal, pulmão e fetos abortados. O material colhido deve ser conservado sob refrigeração a 4 a 8°C, devendo-se evitar o congelamento, pois o DAV é sensível ao congelamento a -20°C. Quando o tempo entre a coleta e chegada ao laboratório exceder a 24 horas, e, portanto, for inevitável o congelamento, deve-se usar gelo seco. Para a detecção do RNA viral através da PCR, o material pode ser congelado a -20°C.

O material destinado à histopatologia, como cérebro, baço, tonsilas, gânglio trigêmeo, medula espinhal, pulmão e fetos abortados, deve ser remetido ao laboratório em solução de formol 10% tamponada.

Tabela 38. Principais agentes/enfermidades evolvidos em sinais clínicos e lesões que devem ser incluídos no diagnóstico diferencial para a doença de Aujeszky.

Sinais Clínicos	Doenças ou agentes relacionados
Manifestações nervosas	Peste suína clássica (PSC), meningite estreptocócica, polioencefalomielite, intoxicação por NaCl
Manifestações respiratórias	Influenza suína, PRRS, pneumonia enzoótica, <i>A. Pleuromoniae</i> , pasteurelose pneumônica, <i>Streptococcus suis</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>M. Hyorhinis</i> , circovírus, salmonelose, clostridiose, toxoplasmose, listeriose e raiva
Transtornos reprodutivos	PRRS, parvovirose, PRRS, leptospirose, erisipela, peste suína clássica, influenza tipo A, toxoplasmose, adenovírus, brucelose, clamidiose, citomegalovírus, encefalomiocardite, reovírus e enterovírus
Transtornos nervosos	Meningite estreptocócica, <i>E. Teschen-Talfan</i> ; encefalomiocardite, Doença de Glasser, doença do edema, raiva, peste suína clássica, toxoplasmose, listeriose, doença de Glässer, salmonelose, clostridiose, e intoxicações por NaCl, mercúrio e arsênico

Para sorologia, encaminhar ao laboratório 8 a 10mL de sangue com anticoagulante (EDTA) e 3 a 5mL de soro. Tanto o sangue quanto o soro devem ser enviados sob refrigeração a 4 a 8°C ou congelado. É importante que animais de todas as fases sejam amostrados.

Para monitorar a condição sanitária de uma unidade de produção de suínos quanto à DA, o Médico Veterinário oficial deve colher soro de suídeos de diferentes faixas etárias e encaminhá-lo ao laboratório oficial ou credenciado para a realização de exames sorológicos (virusneutralização e teste de ELISA). Para determinar o tamanho da amostra, deve-se considerar uma prevalência mínima estimada da doença de 5% e nível de confiança de 95% (Tabela 39)^[5].

Tabela 39. Número de amostras de soro dos suídeos para o diagnóstico laboratorial, considerando uma prevalência mínima estimada de 5% e nível de confiança de 95%.

Número de animais no rebanho	Número de animais que devem ser amostrados
1 a 25	Todos
26 a 30	26
31 a 40	31
41 a 50	35
51 a 70	40
71 a 100	45
101 a 200	51
201 a 1.200	57
> 1.200	59

Fonte: conforme^[5].

Referências bibliográficas

1. Arias M., Romero LJ. and Sanchez-Vizcaino JM. Vacunas actuales frente a la enfermedad de Aujeszky. **Porci.** n. 63, p. 89-104, 2001.

2. BERAN, G.W. Understanding the transmission of pseudorabies virus. *Vet. Med.*, n. 88, p. 70-79, 1993.
3. KIMMAN, T.G. et al. Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cell responses. *Immunol.*, v. 86, p. 372-378, 1995.
4. KLUPP, B. et al. Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J. Virol.*, v. 82, n. 13, p. 6299-6309, 2008.
5. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa SDA-Normas para o controle e a erradicação da doença de Aujeszky (DA) em suídeos de 19/02, feb./15. *Diário Oficial da União*, n. 41, Seção 1, 2002.
6. METTENLEITER, T.C. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 54, p. 221-229, 1996.
7. METTENLEITER, T.C. Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis- State of the art, June 1999. *Vet. Res.*, v. 31, p. 99-115, 2000.
8. PEJSAK, Z.K.; TRUSZCZYNSKY, M.J. Aujeszky's Disease (Pseudorabies). In: Straw B.E; D'Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. (Eds). *Diseases of Swine*. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 419-434. 2006.
9. ROOIJ, V. et al. Analysis of protective immunity against PRV infection in pigs using attenuated and inactivated PRV vaccines. *Veterinary Research*, n. 31, p. 135-143, 2000.
10. STEGEMAN, J.A. et al. Spread of Aujeszky's disease virus within pig herds in an intensively vaccinated region, *Vet. Rec.*, v. 134, p. 327-330, 1994.
11. ZUCKERMANN, F.A. Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges. *Vet. Res.*, n. 31, p. 121-131, 2000.
12. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

2.3 Peste suína clássica

Conceito

A peste suína clássica (PSC) é uma doença infecciosa viral altamente contagiosa, de caráter hemorrágico, que afeta exclusivamente suínos. Descrita pela primeira vez em Ohio (EUA) no início do século XIX, a doença está amplamente difundida no mundo e, apesar dos esforços para a erradicação, permanece endêmica ou recorrente em muitas regiões do planeta, principalmente onde a suinocultura não tem muita expressão. A PSC é uma doença de notificação obrigatória contemplada no Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS)^[1].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da PSC é um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*^[8]. O vírus da peste suína clássica (PSCv) é um vírus RNA de fita simples, envelopado, que codifica quatro proteínas estruturais (C/ p14; E1/gp33; E2/gp55 e Erns/gp44/48) e sete proteínas não estruturais, que possibilitam marcada variabilidade antigênica entre os grupos (Tabela 40). A proteína C/ p14 é componente do nucleocápside, e as proteínas E1/gp33, E2/gp55 e Erns/gp44/48 são glicoproteínas. As proteínas E1/gp33 e E2/gp55 induzem a anticorpos neutralizantes^[2,13,14,15]. Proteínas não estruturais, como NS3, NS5A e NS5B, também estão sendo estudadas quanto a seu papel na patogênese e imunopatologia do PSCV^[12].

O vírus penetra no organismo por ingestão, inalação, pele ou sêmen^[7,10]. Depois de penetrar no organismo, o vírus replica-se nas células endoteliais das tonsilas (via oronasal) e dos linfonodos regionais. As células alvo para o PSCv são as células endoteliais e linforreticulares, os macrófagos e algumas células epiteliais específicas. Ocorre viremia 12 a 20 horas após a penetração do vírus. Nesse período o vírus migra para outros órgãos por via hematógena ou linfática, como baço, rins, linfonodos inguinais e medula óssea, onde se replica novamente e promove lesões hemorrágicas^[6]. O PSCv promove linfopenia, trombocitopenia, necrose do endotélio vascular e, como consequência, hemorragias e imunossupressão^[6,7]. A multiplicação viral na medula óssea provoca trombocitopenia e compromete os processos coagulativos^[9].

Tabela 40. Características estruturais, constitutivas e físico-químicas do vírus da peste suína.^[2,6,8,12]

Propriedade	Característica
Classificação	Gênero: <i>Pestivirus</i> ; família: <i>Flaviviridae</i>
Genoma	RNA simples de 12,3Kpb
Proteínas estruturais	pC, E1 (gp33), Erns (gp44/48), E2 (gp55)
Proteínas relacionadas com proteção	Erns, E2
Proteínas não estruturais	p23, p75, p125, NS3, NS5A e NS5B
Características físico-químicas	Estável em pH 5 a 10 e em temperaturas de -20 a -70°C; é inativado por hipoclorito 2% e hidróxido sódio 2%

Fonte: Adaptado de^[6,8,12].

O vírus da PSC é relativamente resistente a temperaturas até 56°C e a pH de 3 a 11. Sensível a éter, clorofórmio, cresol, hidróxido de sódio (2%), formalina (1%), carbonato de sódio (4% anidro ou 10% cristalino, com 0,1% detergente), detergentes iônicos e não iônicos, iodóforos fortes (1%) e ácido fosfórico^[6,11].

Diagnóstico

Com base nos sinais clínicos, deve-se suspeitar da PSC nos casos de septicemias, febre alta, problemas reprodutivos e mortalidade de leitões. Nesses casos, o histórico e as lesões macroscópicas também devem ser considerados. Entretanto, o diagnóstico definitivo é obtido pela detecção do vírus, de seus抗ígenos ou de ácidos nucleicos no sangue ou em amostras de tecido^[1].

a) Epidemiologia

O único hospedeiro natural do vírus é o suíno, tanto doméstico quanto selvagem. Contudo, o vírus consegue replicar-se em outras espécies animais, como ruminantes domésticos, veados e animais de experimentação, provocando uma reação febril, praticamente assintomática^[3,7].

A transmissão da PSC ocorre tanto pela via vertical como pela horizontal. O animal infectado elimina o vírus a partir do segundo dia após a infecção através de saliva, secreções nasais e oculares, urina, fezes e sêmen^[10,11]. O tempo de eliminação do vírus depende da virulência das cepas, podendo ocorrer durante toda a vida do animal. Os javalis e os porcos selvagens possuem um papel importante na epidemiologia atuando como reservatórios naturais do vírus, principalmente por estarem em vida livre ou mantidos em criações ilegais em contato com os suínos^[8,11,13].

b) Sinais clínicos

As manifestações clínicas variam de acordo com a virulência da cepa, podendo assumir forma hiperaguda, aguda, crônica ou congênita^[4,6].

Forma hiperaguda: a mortalidade e a morbidade são altas, e os animais infectados morrem nos primeiros dias após a infecção, apresentando apenas um quadro de febre (41°C).

Forma aguda: ocorre alta mortalidade e morbidade entre 5 e 15 dias após a infecção. Os animais apresentam hipertermia (42°C), anorexia, letargia, hiperemia multifocal, lesões hemorrágicas na pele e conjuntivite com descarga ocular, bem como cianose da pele, principalmente nas extremidades (orelhas, membros, cauda). Sinais nervosos são observados frequentemente, incluindo letargia e convulsões. Nas fêmeas gestantes ocorre aborto. Com a evolução os animais apresentam diarreia amarelada e vômito com conteúdo biliar (coloração amarelo-esverdeada). Na fase terminal os animais tendem à ataxia e à paralisia dos membros posteriores^[4,7,16]. A taxa de mortalidade e os sinais clínicos podem variar dependendo da virulência da cepa e do estado de imunidade da população suína afetada. A mortalidade de animais jovens podem ser próxima a 100%^[7].

Forma subaguda: a morte dos animais ocorre entre 20 e 30 dias após a infecção. Os sinais clínicos são similares aos da forma aguda, entretanto com menor intensidade, e o período de incubação é mais prolongado^[8,16]. A taxa de mortalidade é inferior a 30%.

Forma crônica: é característica de animais que sobreviveram mais de 30 dias após a infecção^[7]. Geralmente, o curso é muito lento, e os sinais clínicos estão associados a um sistema orgânico do animal. Em geral, os animais apresentam períodos prolongados e intermitentes de febre, prostração, apetite irregular, diarreia e retardo no crescimento^[7]. É frequente a ocorrência de infecções bacterianas secundárias, o que agrava o quadro clínico.

Em infecções pré-natais ou congêntitas, o PSCV atravessa facilmente a barreira placentária. Os sinais clínicos variam de acordo com a cepa envolvida^[16]. Quando for cepa de baixa ou moderada patogenicidade, pode causar malformações, mioclonia congênita, hemorragia cutânea e leitões debilitados^[4]. Na necropsia é possível observar marcada atrofia do timo.

c) Patologia

As lesões hemorrágicas são em consequência dos danos causados pelo vírus ao endotélio. Macroscopicamente, os animais afetados apresentam petéquias difundidas, principalmente na pele, nos gânglios linfáticos, na laringe, na bexiga, nos rins, na válvula ileocecal, nas mucosas e nas serosas. Pode também acontecer infarto multifocal na borda do baço e necrose das tonsilas. O fígado pode estar congesto. Os linfonodos podem apresentar acentuada congestão periférica. Lesões intestinais, como úlceras em forma de botão próximas à válvula ileocecal e no intestino grosso, são os achados mais comuns no quadro crônico^[6,16].

Na forma hiperaguda, na necropsia, observam-se lesões inespecíficas, como congestão e edema nos pulmões, no fígado e no trato gastrointestinal com pouca evidência de hemorragias. Na forma subaguda, os sinais clínicos são mais definidos. Uma importante lesão observada nessa forma clínica, e de alto valor para o diagnóstico da PSC, são os botes pestosos, lesões no intestino grosso que consistem em áreas de necrose circular, concêntricas, muito bem delimitadas, de poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro, associadas aos GALTS (tecido linfoide associado ao intestino)^[8,9,16]. Nos casos crônicos as lesões tendem a concentrar-se, predominantemente, em um sistema.

Na histopatologia é possível observar lesões vasculares, depleção do tecido linfoide e meningoencefalite não purulenta caracterizada por infiltrado celular linfoide perivasicular (manguinhos).

to perivascular). Nos capilares ocorre tumefação e proliferação de células endoteliais e formação de microtrombos. Em vasos sanguíneos maiores, as túnica média e adventícia podem apresentar hialinização ou necrose. Nos órgãos e estruturas linfoides ocorre diminuição dos linfócitos em decorrência da apoptose^[6,8,16].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento viral em cultivos celulares PK-15 é seguido de técnicas imunológicas, visto que o vírus não possui efeito citopático. Essa técnica é obrigatória em zonas consideradas livres do vírus.

A imunofluorescência direta e a imunoperoxidase direta permitem a detecção de抗ígenos virais em cortes histológicos de órgãos suspeitos, entretanto não permitem a diferenciação entre os pestivírus. No caso da forma crônica, utilizar, preferencialmente, cortes histológicos do cólon como tecido de eleição.

O teste de Elisa de captura (cELISA) é destinado à detecção de抗ígenos virais a partir de órgãos, sangue ou soro de animais suspeitos, sendo essa técnica recomendada em zonas já afeitadas ou quando o número de amostras é muito grande. Os testes sorológicos permitem o monitoramento da presença ou ausência da atividade viral em determinadas áreas, a diferenciação entre áreas livres do vírus, e a presença de vírus vacinal (vacinadas) e áreas infectadas. Entre os ensaios sorológicos, a virusneutralização é a técnica de referência, indicada para confirmar casos positivos.

Várias técnicas de imunoensaios (ELISA) para a detecção de anticorpos específicos para o PSCV estão disponíveis. Essas técnicas são específicas, sensíveis, rápidas, de fácil execução e permitem o processamento de grande número de amostras.

Ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR e qPCR) também podem ser utilizados, entretanto não são reconhecidos para o diagnóstico oficial^[1,5].

e) Diagnóstico diferencial

É importante diferenciar de outras doenças que cursam com febre, hemorragias e petéquias, como a peste suína africana, a salmonelose, a erisipela, a pasteurelose aguda, e a intoxicação por cumarina. Infecções com cepas de PSCV de baixa virulência devem ser diferenciadas de doenças ou condições associadas a transtornos reprodutivos e alterações congênitas, como doença de Aujeszky e parvovirose.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

De acordo com o Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS), nos casos de suspeita de PSC deve-se notificar os órgãos de defesa sanitária oficiais, e o encaminhamento do material suspeito ao laboratório deve ser realizado pelo Médico Veterinário oficial^[1,16]. Para o diagnóstico sorológico, devem ser enviados ao laboratório credenciado, no mínimo, uma amostra de 3-5mL de soro por animal, apresentando características de limpidez e ausência de hemólise. As amostras de soro podem ser congeladas.

Além disso, deve-se fazer a eutanásia de animais doentes ou com suspeita clínica e colher amostras de tecidos como tonsilas palatinas, baço, gânglios faríngeos e mesentéricos e porção distal do íleo, contemplando alíquotas de, no mínimo, 20g de cada órgão/tecido. As amostras clínicas devem ser armazenadas em sacos plásticos separados, devidamente identificados e individualizados, e transportadas sob refrigeração^[1]. Caso o tempo entre a coleta e chegada ao laboratório ultrapasse 48 horas, todo o material deve ser congelado.

Para exame histopatológico, prover alíquotas de tonsilas palatinas, gânglios linfáticos (faríngeos e mesentéricos), baço, rins, íleo distal e encéfalo. Fixar os órgãos/tecidos em solução tamponada de formalina a 10%.

Referências bibliográficas

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19, de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de março de 2002, Seção 1, p. 3.
2. DE SMIT, A.J. et al. Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 307-317, 2001
3. DE SMIT, A.J. Classical swine fever: efficacy of marker vaccines and laboratory diagnosis. In: EASTON, I.W.; DE SMIT, A.J. (Eds). **Drukkerij Elinkwijk**, p. 181-186, 2000.
4. ELBERS, A.R.W.; BOUMA, A.; STEGEMAN, J.A. Quantitative assessment of clinical signs for the detection of classical swine fever outbreaks during an epidemic. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 23-332, 2002.
5. JIANG, Y. et al. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 2, p. 172-175, 2010.
6. KLEIBOEKER, S.B. Swine fever: classical swine fever and African swine fever. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 18, p. 431-451. 2002.
7. MOENNIG, V.; FLOEGEL-NIESMANN, G.; GREISER-WILKE, I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. **Vet. J.**, v. 165, p. 11-20, 2003.
8. MOENNIG, V.; GREISER-WILKE, I. Classical Swine Fever Virus **Encyclopedia of Virology**, p. 525-532, 2008.
9. RALPH, J.A. et al. Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 1, p. 78-85, 2006.
10. RIBBENS, S. et al. Transmission of classical swine fever. A review. **Vet. Q.**, v. 26, p. 146-155, 2004.
11. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Bioseguridad en las explotaciones porcinas. Puntos críticos. Peste porcina clásica. **Porci**, v. 47, p. 69-77, 1998.
12. SHENG, C. et al. Characterization of NS3, NS5A and NS5B of classical swine fever virus through mutation and complementation analysis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 72-80, 2010.
13. VAN RIJN, P.A. et al. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. **J. Virol.**, v. 68, p. 3934-3942, 1994.
14. VAN RIJN, P. et al. Subdivision of the Pestivirus Genus Based on Envelope Glycoprotein E2. **Virology**, v. 237, p. 337-348, 1997.
15. WEILAND, E. et al. A second envelope glicoprotein mediate neutralization of pestivirus, hog cholera virus. **J. Virol.**, v. 66, p. 3677-3682, 1992.
16. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

2.4 Peste suína africana

Conceito

A peste suína africana (PSA) é uma doença infecciosa, com características clínico-epidemiológicas complexas, que afeta unicamente suínos. A doença é considerada uma arbovirose, na artrópodes podem atuar como vetores biológicos e reservatórios do vírus.

No Brasil a doença é considerada exótica, sendo o território brasileiro considerado livre da doença desde 1984. Um importante surto ocorreu em 1978 no município de Paracambi, no Estado do Rio de Janeiro, onde foram sacrificados 1.200 animais. O estudo epidemiológico da origem do surto identificou como fonte de infecção restos de alimentos oriundos de uma empresa que abastecia aviões de diversas linhas aéreas entre Portugal e Espanha, países endêmicos para a PSA. Na época, focos em diferentes regiões do Brasil foram registrados. Contudo, estima-se que em 1981 foi o último foco da PSA, e em 1984 o Brasil foi declarado livre da PSA.

Etiologia e Patogênese

O vírus da PSA (PSAV) anteriormente classificado como membro da família *Iridoviridae*, foi recentemente reclassificado como pertencente à família *Asfarviridae* e único membro do gênero *Asfivirus*. Entretanto, existem vários sorotipos com virulência variável, desde cepas altamente virulentas, que causam 100% de mortalidade, a cepas de baixa virulência, difíceis de serem diagnosticadas^[6].

O virion mede 200nm de diâmetro e tem o genoma constituído por DNA linear de fita dupla com cerca de 170 a 190 kbp. O sequenciamento total da cepa viral Ba71 revelou 170.701 nucleótidos, com 151 fases de leitura aberta (ORFs), e 5 famílias multigênicas (FMGs)^[5,10].

A replicação viral ocorre no citoplasma celular, porém a síntese de DNA viral ocorre no núcleo, visto que o PSAV possui sua própria enzima transcriptase, e uma polimerase RNA dependente de DNA^[2].

Foram identificadas 34 proteínas estruturais e mais de 100 proteínas de infecção das quais pelo menos 50 são imumogênicas, como as proteínas estruturais p72, p54 e p12, envolvidas na adesão do vírus à célula, e a p32, implicada na internalização do vírus (Tabela 41). Entretanto, apesar de essas proteínas não induzirem a resposta protetora de imunidade, são de grande utilidade como抗ígenos para o diagnóstico sorológico^[4,5].

Tabela 41. Características estruturais, genômicas e físico-químicas do vírus da peste suína africana.

Propriedade	Características do vírus da peste suína africana
Características da partícula viral	Mede 200nm e tem núcleo “electrodenso” de 80nm; possui três envoltórios e um adicional no vírus extracelular
Características do genoma viral	Massa molar de 100,1gr/mol; densidade CICs: 1,7gr/cm ³ ; coeficiente de sedimentação: 60s; comprimento: 58nm
Características físico-químicas	É inativado em uma faixa pH < 4 e > 11 e por calor a 56°C durante 60 a 70min ou 60°C durante 20min
Inativantes/Desinfetantes	Luz solar, hidróxido sódico 2% durante 30min, hipoclorito (cloro 2% a 3%) durante 30min, formalina 0,3% durante 30min, e compostos fenólicos ou de iodo, éter, clorofórmio e ortofenilfenol

Nota: As partículas virais são termolábeis e sensíveis a solventes lipídicos, porém muito resistentes a uma ampla faixa de pH e temperatura (4 a 20°C).

Fonte: Adaptado de^[5,6,12,14].

A via de entrada mais comum do VPSA no suíno é a oronasal, apesar de as vias dérmica (escarificação), intramuscular, subcutânea e hematógena (por carapatos) serem muito importantes. Depois de entrar no organismo, o vírus infecta naturalmente células do sistema imune, como monócito-macrófagos próximos ao local de inoculação do vírus^[7,9,11].

A entrada do vírus na célula ocorre por um mecanismo de endocitose mediada por receptores. A viremia inicia-se 2 a 3 dias após a infecção. O agente se dissemina pelas vias hemática (adsorvida à membrana dos leucócitos) e linfática, atingindo linfonodos viscerais, medula óssea, baço, pulmão e fígado, onde realiza a replicação secundária. As células alvo do VPSA são as pertencentes ao Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), que sofrem efeito citopático, caracterizado por arredondamento do núcleo, marginalização da cromatina periférica e vacuolização, que culmina em necrose da célula^[7,8]. Uma consequência do efeito citopático induzido pelo vírus é a hemoadsorção, ou seja, ocorre a adsorção de eritrócitos em torno de macrófagos infectados pelo vírus, o responsável pelo transporte passivo do vírus entre os eritrócitos^[1].

A infecção causa grande destruição de monócitos, linfócitos e neutrófilos maduros e severa redução no número de plaquetas. O vírus da PSA também causa uma intensa ativação e liberação de mediadores químicos inflamatórios, principalmente nas fases iniciais da doença. A lise das células do sistema reticuloendotelial contribui para diminuir a fagocitose dos fatores de coagulação, causando a disseminação da coagulação intravascular (CID). As lesões endoteliais ocasionam alterações bioquímicas, como altos níveis de fator VIII e de redução dos níveis de prostaglandinas. No quadro subagudo, não há lesão endotelial nem CID, as hemorragias estão associadas a intensa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, o que também justifica o aparecimento de edema intersticial^[2,5,8].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da PSA é realizado pela detecção do vírus e de seus抗ígenos ou ácidos nucleicos no sangue ou em amostras de tecido. No Brasil, os procedimentos são orientados por programas oficiais^[3].

a) Epidemiologia

A PSA infecta membros da família *Suidae*, tanto domésticos como selvagens. Entretanto, infecções sintomáticas somente ocorrem em suínos domésticos, porcos selvagens e javalis europeus. A infecção do javali (africano) e do porco-do-mato é assintomática, sendo essas espécies provavelmente os reservatórios do vírus no Continente Africano. Outras espécies que podem ser capazes de carrear o vírus de forma assintomática incluem os catetos (*Tayassu tajacu*) e as queixadas (*Tayassu pecari*), ambos encontrados nas Américas^[8,9].

A PSA é endêmica na maioria dos países africanos. Na Península Ibérica, após anos sofrendo com casos de PSA, a Defesa Sanitária Animal local conseguiu erradicar a doença com ações sanitárias extremas e constantes. Os animais infectados eliminam o vírus 48 horas após a infecção através de saliva, secreções oculares e nasais, urina, fezes e sêmen antes de aparecerem os primeiros sinais clínicos.

A transmissão pela via horizontal pode ocorrer de forma direta pelo contato animal-animal ou de forma indireta por fômites contaminados, bebedouros, comedouros, alimentos contaminados, veículos, trânsito de pessoas, roedores, assim como através de vetor biológico como o carapato do gênero *Ornithodoros* sp.^[14]. O vírus se mantém no carapato, onde se replica e ocorre transmissão transovariana e transestrial. A presença do carapato em determinadas regiões torna difícil a erradicação da PSA, principalmente porque o carapato pode transmitir o VPSA contráido de suínos selvagens para suínos domésticos^[2,14]. As principais características do VPSA estão explicitadas na (Tabela 42).

Tabela 42. Principais características epidemiológicas do vírus da peste suína africana.

Característica epidemiológica	Fatores relacionados
Fatores de transmissão	Contato direto entre suínos saudáveis e doentes; animais portadores; via indireta: veículos, bebedouros, comedouros, fômites, fluxo de pessoas, roedores, e vetores biológicos
Vias de eliminação	Secreções nasais, saliva, fezes, urina, exsudato conjuntival, exsudato genital, feridas com sangramento

Fonte: Adaptado de^[2, 5].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos associados à PSA podem ser bastante variados, dependendo da virulência da cepa e da raça e imunidade dos suínos. De modo geral, a doença pode apresentar-se clinicamente de forma superaguda, aguda ou crônica (Tabela 43).

Tabela 43. Características clínico-epidemiológicas relacionadas à virulência do isolado de vírus da peste suína africana

Virulência do VPSA	Período de incubação	Curso clínico	Sinais Clínicos
Alta	2 a 3 dias	1 a 4 dias	Morte súbita sem quadro clínico clássico
Moderada	2 a 3 dias	7 a 20 dias	Sinais clássicos de encefalite, febre, prostração, inapetência, alterações vasculares, aborto e alta mortalidade de reprodutores
Baixa	2 a 3 dias	15 a 21 dias	Lesões de necrose cutânea multifocal, problemas reprodutivos, animais persistentemente infectados ou com infecção inaparente e soroconversão inaparente

A **forma superaguda** ocorre quando há o envolvimento de amostras muito virulentas. Nesse caso, os animais apresentam febre alta (40 a 42°C), prostração, inapetência, anorexia, ataxia e dispneia. Os animais apresentam cianose de extremidades, e a mortalidade é próxima a 100%^[2,8].

A apresentação clínica clássica da doença é a **forma aguda**, causada por cepas altamente virulentas, e leva os animais à morte aproximadamente 7 dias após a infecção. Os sinais clínicos mais evidentes são febre alta (40 a 42°C), apatia, anorexia, prostração, diarreia, vômito, ataxia, amontoamento e secreções nasais devidas ao edema pulmonar. Na fase terminal os animais apresentam transtornos respiratórios caracterizados por dispneia e cianose de extremidades. Convulsões e coma são observados frequentemente na fase pré-agônica. A mortalidade é alta, podendo chegar a 100%, principalmente de animais jovens^[2,14]. No caso de fêmeas gestantes, a taxa de aborto é extremamente elevada.

Cepas de baixa virulência causam a **forma crônica**. Nesse caso, os animais apresentam sinais clínicos variáveis causados por infecções bacterianas secundárias. A temperatura dos animais tende a manter-se normal, mas pode-se observar dispneia moderada. O período de sobrevivência desses animais é longo, podendo tornar-se disseminadores do VPSA. Nesse caso, a mortalidade é baixa, entre 2% e 10%^[8,9].

c) Patologia

As lesões presentes na PSA são semelhantes às que ocorrem na PSC e se caracterizam por intenso quadro hemorrágico, tanto na forma superaguda quanto na aguda.

Na necropsia é possível observar cianose de extremidades, edema pulmonar severo, baço aumentado de tamanho e com coloração vermelho-escura, esplenomegalia hiperêmica ou esplenite hemorrágica característica da doença. Além disso, hemorragias petequiais nos grandes músculos, rins, bexiga, laringe, faringe, pleura, coração, hidopericárdio, ascite e hidrotórax também são frequentes. O fígado pode estar normal ou congesto^[2,9].

Na forma crônica as lesões hemorrágicas são mais concentradas nos gânglios linfáticos (principalmente gastro-hepáticos, renais, submandibulares, retrofaríngeos, mediastínicos, inguinais e mesentéricos), na serosa dos intestinos delgado e grosso, na mucosa fúnica do estômago e no músculo esquelético. Lesões petequiais nos rins e na vesícula biliar, pericardite serofibrinosa e focos de pneumonia necrótica podem ser observados^[8,14].

Microscopicamente, as lesões encontradas estão relacionadas à degeneração celular e ao infiltrado inflamatório. Classicamente, é possível observar, na histologia, hemorragias, especialmente nos gânglios linfáticos renais e gastro-hepáticos e nos rins. Devido à patogênese viral, ocorre ativação fagocítica das células endoteliais por causa de degeneração endotelial, aumento da permeabilidade vascular, edema intersticial e diapédese de eritrócitos. A linfopenia é decorrente de apoptose dos linfócitos e inibição, proliferação ou destruição das estruturas linfoides de baço, gânglios e tonsilas devido às lesões vasculares^[2,8,14].

d) Diagnóstico laboratorial

As técnicas mais usadas para a detecção do vírus são isolamento, imunofluorescência e PCR. Para a detecção de anticorpos contra o VPSA são empregados ensaios imunoenzimáticos ELISA e *immunoblot*.

O isolamento do agente é realizado em cultivo celular de monócitos suínos ou de células da medula óssea, com confirmação por testes de hemoadsorção. A técnica de hemoadsorção permanece até hoje como o método mais sensível e específico para a identificação do vírus da PSA, pois nenhum dos outros vírus de suínos produz esse efeito. Entretanto, essa técnica é trabalhosa e demorada, e exige pelo menos 5 dias para os resultados.

O ensaio de imunofluorescência é uma técnica rápida, sensível (85% a 95%) e econômica, porém em locais onde a PSA é enzoótica e predominam casos subagudos e crônicos tem-se uma diminuição da sensibilidade do teste devido ao bloqueio das ações de anticorpos ligados em complexos antígeno-anticorpo, diminuindo a sensibilidade do teste para 40%. A técnica se baseia na detecção de抗ígenos virais sobre cortes histológicos, esfregaços de tecido ou mesmo em culturas celulares.

Atualmente, ensaios moleculares baseados na PCR são empregados no diagnóstico definitivo, pois possibilitam a detecção do genoma viral nos tecidos e nas secreções^[13]. A técnica de PCR é muito sensível e específica, sendo utilizada em laboratórios de diagnóstico veterinário de referência, podendo ser aplicada tanto em amostras de tecidos como em amostras de soro de animais doentes devido à viremia, visto que o PSAV pode ser detectado no sangue a partir do segundo dia após a infecção e persiste durante semanas.

As técnicas mais bem estabelecidas para a detecção de anticorpos perante o PSAV são imunofluorescência (RIFI), teste de ELISA e *immunoblotting*. Os抗ígenos mais frequentemente utilizados são as proteínas recombinantes p32, p54 e pp62.

e) Diagnóstico diferencial

Diferenciar de outras doenças que cursam com quadro agudo, alta mortalidade e hemorragias, principalmente diferenciar de PSC, erisipela, carbúnculo hemático, salmonelose, nefropatia, pasteurelose, envenenamento por cumarínicos e doença de Aujeszky (Tabela 44).

Tabela 44. Sinais clínicos e lesões diferenciais da PSA e enfermidades com quadro clínico-lesional semelhante.

Enfermidade	Sinais Clínicos diferenciais	Lesões diferenciais
Peste porcina clásica	Curso clínico menos severo e mais longo, principalmente em animais de crescimento, de terminação e reprodutores	Úlceras no ceco e cólon, infartos nas bordas do baço, parênquima renal pálido, meningoencefalite purulenta.
Salmonelose aguda (<i>S. cholerasuis</i>)	Diarreia líquida amarelo-esverdeada; curva com baixa morbidade e alta mortalidade	Necrose hepática focal, enterocolite mucosserosa ou necrótica
Erisipela	Artrite crônica, morbidade e mortalidade baixas	Lesões losangulares bem definidas características na pele e artrite e endocardite vegetativa
PDNS (circovírus)	Sinais inespecíficos de doença imunossupressora, debilidade e refugagem	Lesões associadas à vasculite necrotizante; rins pálidos, com a presença de pontos brancos e, às vezes, petéquias
Doença de Aujeszky	Sinais nervosos	Lesões hemorrágicas menos expressivas, mortalidade concentrada em leitões jovens

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Nos casos de suspeita de PSA, deve-se notificar os órgãos de Defesa Sanitária oficiais e o encaminhamento do material suspeito ao laboratório deve ser realizado pelo Médico Veterinário oficial, obedecendo aos procedimentos predefinidos pelo PNSS^[3]. Para o diagnóstico sorológico, deve ser enviada ao laboratório credenciado, no mínimo, uma amostra de 3-5mL de soro por animal, apresentando características de limpidez e ausência de hemólise. As amostras de soro podem ser congeladas.

Além disso, devem ser submetidos à eutanásia animais doentes ou com suspeita clínica e colher amostras de tecidos, como tonsilas palatinas, baço, gânglios faríngeos e mesentéricos e porção distal do íleo, contemplando alíquotas de, no mínimo, 20g de cada órgão ou tecido. As amostras clínicas devem ser armazenadas em sacos plásticos individualmente, devidamente identificados. As amostras de sangue e tecidos destinadas ao isolamento viral devem ser enviadas ao laboratório oficial sob refrigeração^[1]. Caso o tempo entre a coleta e a chegada ao laboratório ultrapasse 48 horas, todo o material deve ser congelado.

Para exame histopatológico, providenciar alíquotas de tonsilas palatinas, gânglios linfáticos (faríngeos e mesentéricos), baço, rins, íleo distal e encéfalo. Fixar os órgão/tecidos em solução tamponada de formalina a 10%.

Referências bibliográficas

1. ALONSO, F. et al. African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (VP32). **Virus Research**, v. 49, p. 123-30, 1997.
2. AYOADE, G.O.; ADEYEMI, I.G. African swine fever: an over-view. **Revue Élev Méd vét Pays Trop.**, v. 56, p. 129-134, 2003.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19 de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01de março de 2002, Seção 1, p. 3.
4. CASTELLO, A. et al. Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.

5. DIXON, L.K. et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 100, p. 117-134, 2004.
6. DIXON, L.K. et al. Family *Asfarviridae*. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al (Eds). **Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses**, San Diego: Academic Press, p. 159-165. 2000.
7. GIL, S. et al. Expression at mRNA level of cytokines and A238l gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Archives of Virology*, v. 148, p. 2077-2097, 2003.
8. KLEIBOEKER, S.B. Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 18, p. 431-51, 2002.
9. LEITÃO, A.; MARTINS, C. Algumas considerações sobre a infecção pelo vírus da peste suína africana. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 93, p. 3-23, 1998.
10. LEITÃO, A. et al. Bacterial lipoprotein based expression vectors as tools for the characterisation of African swine fever virus (ASFV) antigens. *Archives of Virology*, v. 145, p. 1639-1657, 2000.
11. LEITÃO, A. et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 513-523, 2001.
12. SHIRAI, J. et al. Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62, p. 85-92, 2000.
13. ZSAK, L. et al. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact exposed swine by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 112-119, 2005.
14. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

2.5 Gastroenterite transmissível

Conceito

Gastroenterite transmissível suína (TGE) é uma doença entérica altamente contagiosa que afeta principalmente leitões lactentes com menos de duas semanas de idade, causando grandes perdas por diarreia, desidratação, vômitos e altas taxas de morbidade e mortalidade.

Etiologia e Patogênese

O vírus da gastroenterite transmissível (TGEV) pertence ao gênero *Coronavirus*, família *Coronaviridae*, ordem Nidovirales^[5,11] (Tabela 45). O TGEV é um RNA-vírus de fita simples, grande, pleomórfico, envelopado com três proteínas estruturais majoritárias (N, S e M). A proteína N está associada ao RNA formando o nucleocapsídeo. As proteínas S e M são glicoproteínas e constituem o envelope. A proteína S forma os peplômeros (ou espículas) característicos da família *Coronaviridae* que se projetam para o exterior dando característica de coroa, responsável pela ligação do vírus na célula alvo. Quanto à proteína M, apesar de sua função ainda não estar bem definida, acredita-se que esteja associada à indução da produção de interferon- α (IFN- α)^[4,8,11].

Tabela 45. Principais características epidemiológicas do vírus da gastroenterite transmissível (TGEV).

Propriedade	Características
Classificação	Vírus da gastroenterite transmissível (VTGE); gênero <i>Coronavirus</i> ; família <i>Coronaviridae</i> ; e ordem Nidovirales
Características estruturais	Envoltório lipídico nuclear; pleomórfico; mede de 120 a 160nm; possui espículas que dão morfologia de coroa; somente um sorotipo
Outras doenças dos coronavírus	Outras enfermidades nos suínos: diarreia epidêmica suína e coronavírus respiratório do suíno
Características físico-químicas	Sensíveis a solventes de lipídios; calor, fenol 0,5%; formalina 0,05%; éter; clorofórmio; luz UV; resistente a congelação (2 anos a -20°C); 30min a 56°C; 10 dias em temperatura ambiente; pH entre 5 e 8

A principal forma de entrada do vírus da TGE no organismo do leitão é a ingestão. Por ser resistente à ação do pH gástrico e à ação das enzimas proteolíticas, atinge rapidamente o intestino delgado, principalmente o jejuno e a porção inicial do íleo, onde faz adesão^[3,6,8]. O vírus penetra mediante a interação da proteína viral S e receptores específicos da superfície celular, como aminopeptidase ou ácido siálico, permitindo a fusão do vírus à membrana celular. Posteriormente ocorre a liberação do genoma vírico para o interior da célula, seguido da replicação viral^[8,10].

Os enterócitos maduros, que recobrem o pico das vilosidades intestinais, são as células prediletas para infecção pelo VTGE^[1,6]. A replicação viral e a saída do vírus da célula causam lise massiva dos enterócitos, destruição e atrofia das vilosidades e, na tentativa de compensar a destruição e a descamação celular, hiperplasia das criptas com a presença de grande quantidade de células epiteliais imaturas. Como consequência das lesões e dos processos fisiológicos de reestruturação tecidual, ocorrem alterações nos processos de digestão, secreção e absorção. Assim, os componentes do leite ingerido pelos leitões não são hidrolisados e absorvidos. A concentração desses nutrientes e líquidos na luz do intestino exerce atividade osmótica, ocasionando um influxo de líquidos para a luz intestinal e um consequente quadro de diarreia por má digestão e má absorção. A morte do animal ocorre em consequência do desequilíbrio eletro-hídrico, da desidratação, da acidose metabólica e da disfunção cardíaca devida à hipercalemia^[3,6,8].

Devido ao tropismo do vírus pelos enterócitos maduros, a TGE é mais grave nos leitões, pois possuem um menor grau de renovação celular que animais adultos. A gravidade da doença, bem como a mortalidade, diminui conforme o aumento da idade dos animais devido ao aumento da capacidade de regeneração das vilosidades, à resistência à desidratação e ao aumento da capacidade de absorção pelo cólon.

Diagnóstico

A suspeita clínica pode surgir nos casos de diarreia aguda, alta mortalidade e ausência de resposta a tratamentos. O diagnóstico definitivo é realizado através da detecção viral por ensaios moleculares, como RT-PCR, associados às lesões observadas no exame histopatológico.

a) Epidemiologia

A transmissão do agente ocorre pela via horizontal, de forma direta ou indireta. Os animais infectados eliminam os vírus pelas fezes, o que facilita a infecção pela ingestão de material contaminado. A transmissão indireta ocorre por roupas, aerossóis, ração, veículos e fômites contamina-

dos. Não ocorre transmissão vertical; a porca contamina a progênie via fezes infectadas^[3]. Podem existir portadores assintomáticos, que atuam como reservatórios do vírus.

A TGE é uma doença com característica sazonal, com ocorrência mais elevada no inverno, visto que o vírus sobrevive melhor em ambientes com baixas temperaturas, umidade alta e pouca radiação solar. O VTGE é sensível a calor, radiação solar, solventes lipídicos, formaldeído, agentes oxidantes e detergentes não iônicos^[11].

Apesar de várias suspeitas terem sido levantadas, a doença ainda não foi diagnosticada no Brasil, mas é enzoótica na maioria dos países produtores de suínos.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, os animais doentes apresentam vômito, diarreia e desidratação. A gravidade dos sinais clínicos e a mortalidade são inversamente proporcionais à idade dos animais acometidos. Inicialmente, os leitões apresentam vômitos transitórios, seguidos de diarreia aquosa amarela a esverdeada e fétida. Com a progressão da doença ocorre perda de peso, desidratação e debilidade progressiva, levando à morte 2 a 7 dias após o início dos sinais clínicos. A presença de leite não digerido nas fezes é uma característica marcante da doença^[1,3,10]. Os leitões que sobrevivem apresentam comprometimento no crescimento, tornando a refugagem severa^[1,10].

A doença em animais na fase de crescimento ou adultos é pouco frequente. Quando ocorre, os animais apresentam diminuição do apetite, diarreia intermitente de curta duração, vômito, febre, e em alguns casos pode não haver a manifestação clínica aparente. Fêmeas infectadas no período de lactação apresentam hipogalactia ou agalactia^[2].

c) Patologia

Na necropsia, é possível observar desidratação grave e lesões de gastroenterite catarral grave concentradas principalmente no jejunoo e no íleo. No estômago há a presença de coágulos de leite não digerido, o que mostra que não há diminuição do apetite até algumas horas antes da morte. O intestino apresenta-se dilatado, com conteúdo amarelo e presença de coágulos de leite não digerido. Frequentemente, os gânglios linfáticos da cadeia mesentérica apresentam-se congestos, e em alguns casos pode ser observadas áreas esbranquiçadas de aspecto difuso no miocárdio e musculatura esquelética^[1,6,10].

No exame histológico, é possível observar marcada atrofia das vilosidades, metaplasia do epitélio com a presença de grande quantidade de células imaturas, hiperplasia das criptas, congestionamento e edema da mucosa, principalmente no jejunoo e início do íleo. Essas lesões são decorrentes da tentativa de compensar a destruição celular^[6,8,10]. Lesões inespecíficas em outros órgãos também podem estar presentes; contudo, podem estar associadas ao quadro de debilidade ou a infecções secundárias, que geralmente agravam o quadro de enterite, aumentam a taxa de mortalidade ou agravam as sequelas da doença.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo pode ser realizado pelo isolamento viral em cultivos de linhagens de células de testículo ou rim (SK6) de suínos, nos quais é possível observar o efeito citopático em 24 a 72 horas, caracterizado por arredondamento, agrandamento e desprendimento celular e formação de sincícios^[3]. Outro método passível de ser utilizado é a hemoaglutinação (HA), visto que o VTGE é capaz de aglutinar eritrócitos. Essa técnica, normalmente, é aplicada após o isolamento viral, como forma de confirmar o diagnóstico.

Ensaios baseado em RT-PCR são altamente sensíveis para a detecção do TGEV, tanto a partir de material fecal, amostras de tecido intestinal e culturas celulares, quanto como forma de confirmar a presença do agente nesses substratos^[7].

A soroconversão ocorre, geralmente, no sétimo dia após a infecção. Assim, vários ensaios de sorodiagnóstico podem ser implementados para a detecção de anticorpos, como inibição da hemaglutinação (HA), ELISA indireto e virusneutralização^[9].

e) Diagnóstico diferencial

Realizar diagnóstico diferencial de outras doenças entéricas, como colibacilose, clostridiose, rotavirose e coccidiase.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico laboratorial de TGE, como para muitas enfermidades, a colheita, a conservação e o transporte das amostras clínicas são um aspecto imprescindível. É importante considerar o número de animais a amostrar, bem como os requerimentos de temperatura, pH e período de sobrevivência do agente para garantir eficiência do teste laboratorial.

As amostras clínicas destinadas ao isolamento viral devem incluir: material fecal, colhido diretamente do reto com auxílio de suave ou massagem, e homogeneizado de tecidos ou órgãos. Jamais colher amostras de fezes do solo. As amostras deve ser conservadas sob refrigeração a 4 a 8°C para melhorar as condições de isolamento.

Para os exames sorológicos coletar sangue para obtenção de 3-5mL de soro, preferencialmente de forma pareada com intervalo de 15-21 dias, envolvendo animais das diferentes fases de produção, a fim de demonstrar a soroconversão^[9].

A colheita de amostras clínicas visando à realização do exame histopatológico deve incluir fragmentos de estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto. Devem-se incluir gânglios mesentéricos e órgãos parenquimatosos, como rim, fígado, baço, coração, e tecidos representando sistema nervoso central e músculo esquelético visando ao diagnóstico diferencial. As amostras clínicas devem ser conservados em solução tamponada de formol a 10% para posterior processamento histológico.

Referências bibliográficas

1. BERNARD, S.; et al Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis virus. **Vet. Microbiol.**, v. 21, n. 1, p. 1-8. (1989).
2. COX, E.; PENSAERT, M.B.; CALLEBAUT, P. Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs after infection with the porcine respiratory coronavirus. **Vaccine**, v. 11, p. 267-272, 1993.
3. DEWEY, C.E. et al. Endemic transmissible gastroenteritis: Difficulty in diagnosis and attempted confirmation using a transmission trial. **Swine Health Prod.**, v. 7, n. 2, p. 73-78. 1999.
4. ENJUANES, L. et al. *Coronavirus* derived expression systems. **J. Biotechnol.**, v. 88, p. 183-204, 2001.
5. ENJUANES, L. et al. *Coronaviridae*. In: VAN REGENMORTEL, M.H.C. et al. (Eds.). **Virus taxonomy**, NY: Academic Press, p. 835-849, 2000.
6. GELBERG, H.B. Alimentary system - Transmissible gastroenteritis. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. (Eds.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. St. Louis: Mosby-Elsevier, p. 375, 2007.
7. KIM, L. et al. Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 385-388, 2000.

8. KIM, L. et al. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.*, v. 145, p. 1133-1147, 2000.
9. LIU, C. et al. A serodiagnostic ELISA using recombinant antigen of swine transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 63, p. 1253-1256.
10. MOESER, A.J.; BLIKSLAGER, A.T. Mechanism of porcine diarrheal disease. *JAVMA*, v. 231, p. 56-67, 2007.
11. MURPHY, F.A. et al. Coronaviridae. In: **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, p. 495-508, 1999.

2.6 Febre aftosa

Conceito

A febre aftosa (FA) é a principal enfermidade infectocontagiosa que acomete os animais domésticos por conta da alta contagiosidade, do potencial de difusão/transmissão e pelo grande número de espécies suscetíveis. A doença afeta animais biungulados domésticos e selvagens com altíssimo impacto socioeconômico para as áreas de foco e para o mercado internacional de produtos de origem animal.

Apesar de a literatura descrever aproximadamente 40 casos de infecção pelo vírus da FA em humanos, essa doença tem pouco impacto na saúde pública.

Etiologia e Patogênese

O vírus da Febre Aftosa (VFA) pertence à família *Picornaviridae* e ao gênero *Aphtovirus*. Foi o primeiro agente filtrável, procedimento realizado por Löefler e Frosch no final do século XIX^[10]. Atualmente são descritos sete sorotipos imunologicamente distintos: O, A, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2 e SAT 3. Devido à grande variedade antigênica dentro de cada sorotípo, dá origem a múltiplos subtipos^[4,7]. Não há proteção cruzada entre os diferentes sorotipos, contudo existe proteção cruzada entre subtipos pertencentes ao mesmo sorotípo. O aparecimento de novos subtipos em uma região leva a falhas na estratégia vacinal utilizada e, como consequência, podem ocorrer surtos^[13, 16].

O VFA é um vírus RNA de fita simples, positiva de RNA, com 8.500 nucleótideos, com uma fase de leitura aberta entre duas zonas não codificadoras^[9,10]. É um vírus envelopado, icosaédrico, com 30nm de diâmetro, composto por quatro proteínas estruturais: VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) e VP4 (1A). As três primeiras estão presentes na superfície do vírus, enquanto a última fica internamente ao capsídeo^[9]. A proteína VP1 aparentemente é a mais importante, pois constitui um dos抗ígenos mais imunogênicos e biologicamente ativos do vírus, participando do reconhecimento dos receptores celulares e da formação de anticorpos neutralizantes. Entretanto, é uma proteína instável, altamente variável, responsável até pela variabilidade do vírus e pela origem dos diferentes sorotipos e subtipos^[2]. As proteínas VP2 e VP3 são responsáveis pelos fenômenos de reconhecimento e antigenicidade^[9].

A espécie suína é mais resistente a infecções por via respiratória que bovinos e ovinos, exigindo mais partículas virais, todavia é mais sensível pela via oral^[11]. O VFA apresenta tropismo por células epiteliais, visto que se replica rapidamente na porta de entrada (mucosas do trato respiratório superior, bucal, pele, inclusive da região interdigital) formando as aftas primárias, que geralmente passam despercebidas^[11]. Após essa primeira replicação, o vírus atinge a corrente sanguínea/linfática produzindo viremia, clinicamente evidenciada por um pico febril. Nessa fase o

VFA faz uma segunda replicação nas células reticuloendoteliais e em órgãos/tecidos como fígado, baço, coração, médula óssea e músculo estriado. Ocorre uma nova viremia 3 a 5 dias após e o VFA volta a se replicar nas células epiteliais produzindo vesículas secundárias, características da enfermidade, normalmente nas bandas coronárias dos cascos, na mucosa da boca, do palato e da língua^[1,2,11]. Nessas áreas do epitélio escamoso estratificado, a formação de vesículas resulta da turgescência e ruptura de queratinócitos no estrato espinhoso. Os animais apresentam quadros febris.

Diagnóstico

Todos os procedimentos de diagnóstico são regulamentados pelos órgão oficiais como OIE e MAPA, com programas internacionais e nacionais respectivamente. Todos os procedimentos devem ser realizados conforme instrução do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA).

a) Epidemiologia

O VFA é altamente contagioso e pode infectar um grande número de espécies de animais domésticos e selvagens (biungulados), principalmente ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, suíños. Cervídeos, camelídeos e proboscídeos também devem ser incluídos^[5,7]. A doença cursa com alta taxa de morbidade e baixa taxa de mortalidade, exceto em animais jovens, em que a taxa de mortalidade tende a ser elevada.

Convencionalmente, a distribuição geográfica tradicional dos diferentes sorotipos víricos é Europa, tipos A, O e C; Oriente e Ásia, tipos A, O, C, Asia1; África, tipos A, O, C (somente no norte), SAT1, SAT2 e SAT3; e nas Américas, os sorotipos A, O e C^[7,12,17].

A transmissão do VFA ocorre principalmente pela via horizontal direta ou indireta, pelo contato direto de animais doentes com animais saudáveis, por meio de fômites contaminados, veículos, pessoas ou produtos e animais infectados^[3,10,17] (Tabela 46). O vírus se dissemina muito rapidamente por aerossóis^[5,7]. Produtos de origem suína curados, defumados e processados industrialmente não veiculam o VFA, visto que ele é inativado pelos processos tecnológicos^[3,9].

Tabela 46. Características epidemiológicas e fatores associados aos mecanismos de transmissão e fontes de infecção.

Característica epidemiológica	Fatores associados aos mecanismos de transmissão e fontes de infecção
Mecanismos de transmissão	Contato direto entre animais saudáveis e enfermos; contato com produtos de origem animal, como carnes, leite, pele de animais contaminados; via aerógena, que pode chegar a até 60km em terra e 300km sobre o mar; sêmen (cópula e inseminação artificial); contato com objetos contaminados (veículos, fômites, pessoas)
Fontes de infecção	Convalescentes; doentes; portadores; ar expirado; saliva; fezes; urina; leite; sêmen (até 4 dias antes de iniciar os sinais clínicos); produtos e derivados de origem de animal infectado em que o pH se manteve > 6; o VFA sobrevive por semanas ou meses na medula óssea, nos gânglios linfáticos, em coágulos sanguíneos de grandes vasos, e em órgãos internos devido à presença de ácido láctico sua viabilidade é comprometida.

Os suínos são extremamente importantes na disseminação do VFA, pois são denominados amplificadores, por produzirem grandes quantidades de vírus durante o pico de viremia, chegando a 10^8 UFP nos aerossóis por dia, aproximadamente 1.500 vezes mais vírus do que a quantidade

produzida pelos bovinos^[11,17]. A eliminação do vírus ocorre por secreções nasais, saliva, sêmen, urina e fezes, porém esse período de eliminação é curto: aproximadamente 1 mês desde o início dos sinais clínicos. Por esse fato, muitos autores não consideram o suíno um animal portador^[10].

O vírus da febre aftosa é sensível em pH menor que 6 e maior que 9, aos desinfetantes químicos como carbonato de sódio a 4%, formol a 10%, hidróxido de sódio a 2% e meios físicos como calor, radiação ultravioleta, ionização por raios gama e luz solar. O vírus é resistente aos iodóforos e aos compostos quaternário de amônio, hipoclorito e fenol^[14,17]. O vírus residual pode sobreviver por um período considerável quando associado com proteínas animais, e é preservado por refrigeração e congelamento. É inativado em temperaturas superiores a 50°C. O vírus da FA pode persistir por longos períodos em coágulos sanguíneos, medula óssea, gânglios linfáticos, fragmentos ósseos e vísceras, pois esses tecidos não sofrem a queda de pH que acompanha o *rigor mortis*^[5,10].

b) Sinais clínicos

O período de incubação varia de 3 a 5 dias^[10]. Inicialmente, os suínos apresentam claudicações ou andar rígido com aumento de temperatura e prurido. Posteriormente, há o aparecimento de aftas esbranquiçadas no dorso da língua, e no focinho; essas aftas podem romper-se formando úlceras que remetem a uma salivação intensa. As vesículas também podem ser encontradas no úbere, entre os cascos e na coroa do casco. Nos cascos normalmente ocorre contaminação secundária, agravando a cladicação. Eventualmente, os suínos perdem os cascos. Em leitões de matrizes contaminadas pode ocorrer mortalidade alta. Em leitões pode ocorrer miocardite, levando a óbito sem que ocorram manifestações de sinais clínicos. Fêmeas gestantes podem abortar, e lactantes são levadas a uma diminuição na produção de leite. Os animais também se apresentam apáticos e não se alimentam^[10,11].

A morbidade é alta, chegando a 100%. A mortalidade é variável de acordo com o sorotipo envolvido e a idade dos animais, podendo chegar a 100% em leitões na fase de maternidade^[11].

c) Patologia

Macroscopicamente, observam-se vesículas ou aftas na língua, na faringe, no focinho e, principalmente, nos espaços interdigitais^[2,10]. Na forma superaguda, mais frequente em animais jovens, é associada a alta mortalidade de leitões e, devido ao miotropismo do vírus, causa miocardite e, consequentemente, a morte do animal. Em geral, a única lesão perceptível é o “coração tigrado”, caracterizado por áreas amarelo-esbranquiçadas decorrentes das alterações degenerativas do miocárdio^[1,2].

No exame histopatológico observa-se tumefação, degeneração celular, edema intra- e extracelular no estrato espinhoso do epitélio estratificado e estrato germinativo intacto. Com o progresso ocorre picnose nuclear e aumento da degeneração celular e formação de pústulas contendo grande quantidade de partículas virais. Essas lesões podem apresentar diferentes localizações, entretanto tendem a concentrar-se basicamente nas mucosas ou regiões de transição, principalmente na região coronariana do casco, na região interdigital, no focinho e na mucosa da boca^[1,2,10,17]. No miocárdio é possível observar degeneração dos cardiomiócitos, picnose e aumento do espaço extracelular^[1,10,11].

d) Diagnóstico laboratorial

No caso de amostras destinadas ao diagnóstico de febre aftosa, devem ser inoculadas em linhas celulares estabelecidas como BHK-21 e IBRS-2, e cultivos de células primários de tireoide bovina nas quais o vírus produz efeito citopático (ECP)^[8,15]. Em seguida, o sobrenadante deve ser utilizado para detecção do vírus ou de抗ígenos virais.

A RT-PCR é um método altamente sensível e específico, que permite a detecção do RNA viral mediante a amplificação de fragmentos específicos de genoma do VFA a partir de amostras de fluidos vesiculares, epitélio das aftas/vesículas, saliva, suabes nasofaríngeos, soro ou sangue total provenientes de animais infectados ou a partir do isolamento em cultura celular para a identificação do vírus^[15]. O teste permite a detecção do genoma viral no sangue total 2 dias após a infecção. *Primers* específicos, baseados no gene que codifica a proteína estrutural VP1, foram desenhados para distinguir cada um dos sete sorotipos. Um multiplex-PCR para o diagnóstico simultâneo das três mais importantes doenças vesiculares (febre aftosa, doença vesicular do suíno e estomatite vesicular) também está disponível.

As técnicas mais utilizadas para a detecção de anticorpos específicos ante o VFA são virus-neutralização (VN) e teste de ELISA. A VN é uma técnica sorológica quantitativa de alta sensibilidade e especificidade que permite identificar o sorotipo envolvido. Devido ao fato de ser demorada e laboriosa, é recomendada apenas para os casos de confirmação dos resultados dos testes de ELISA. A técnica de ELISA permite a detecção de animais positivos a partir do quarto dia após a infecção viral^[17].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir todas as doenças que produzem um quadro clínico que cursa com o aparecimento de vesículas nos epitélios da boca, do focinho e dos cascos como exantema vesicular dos suínos, doença vesicular dos suínos e estomatite vesicular. Nas espécies ovina e bovina o diagnóstico diferencial deve incluir ectima contagioso, varíola ovina e caprina e língua azul.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Todos os procedimentos de colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais nos casos de suspeita de FA devem ser realizados conforme instrução do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA)^[6,8]. Nos casos de suspeita de FA o Médico Veterinário deve notificar os órgãos de Defesa Sanitária oficiais e o encaminhamento do material suspeito ao laboratório deve ser realizado pelo Médico Veterinário oficial, conforme instrução do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA)^[6,8].

Conforme PNEFA, as amostras de eleição para o diagnóstico da FA são: (i) **vesículas**: o epitélio e o líquido contêm grande quantidade de partículas virais, sendo consideradas amostras de eleição para detecção do VFA em laboratório pelas técnicas de RT-PCR, ELISA de captura de antígeno ou isolamento em cultivo celular. As vesículas podem ser coletadas usando pinça e retirando a vesícula inteira, ou somente retirando o líquido com auxílio de seringa e agulha. Se necessário, sedar os animais. O VFA é muito sensível a variações de pH; (ii) **sangue**: as amostras de sangue devem ser coletadas usando anticoagulante (EDTA). É mais eficiente em animais que não manifestam de forma expressiva as vesículas e aftas (ovinos e caprinos). No caso de suínos, por terem um período de viremia curto (3 a 4 dias), 2 a 7 dias dpi, sua opção é limitada. Para a sorologia, coletar sangue sem anticoagulante para a obtenção de soro. A soroconversão ocorre 4 dias dpi; (iii) **saliva**: útil em ovinos, que, apesar de não mostrar lesões muito intensas, mantêm o vírus na saliva por semanas. A saliva pode ser utilizada tanto para isolamento viral quanto para a detecção do vírus através da PCR; (iv) **suabes nasofaríngeos**: suabe nasal ou faríngeo é representativo, visto que é o local em que normalmente o vírus faz a primeira replicação, sendo adequado para o diagnóstico virológico, detecção (PCR) ou isolamento; (v) **tecidos**: coração, rim, gânglios linfáticos e fígado devem ser coletados por ocasião da morte ou eutanásia. Esses tecidos podem ser submetidos tanto ao exame histológico quanto ao exame virológico para a detecção do VFA; (vi) **leite**: o VFA pode ser detectado no leite 4 dias antes da manifestação clínica da doença. É im-

portante salientar que as amostras clínicas destinadas ao isolamento viral devem ser colhidas de forma estéril e com cuidado para que não entrem em contato com desinfetantes e haja comprometimento do isolamento viral.

Para o exame histopatológico, coletar estômago, intestino, linfonodos pulmonares e mesentéricos, rim, fígado, baço, coração e alíquotas representativas do sistema nervoso central e do músculo esquelético. Nesse caso, as amostras devem ser fixadas em solução tamponada de formol a 10%^[8].

O VFA é muito sensível a variações de pH. Todas as amostras clínicas destinadas ao isolamento viral (epitélio de vesícula, vesícula ou líquido vesicular e amostras de eleição) devem ser acondicionadas em “Meio de Transporte Essencial Mínimo” (MEM) ou meio contendo glicerina fosfatada (líquido de Vallée) com pH entre 7,4 e 7,6, para garantir a estabilidade do pH. Todas as amostras devem ser mantidas sob refrigeração a 4°C, e no caso de amostras de leite, estas também podem ser congeladas^[5,6,17].

Amostras clínicas destinadas à detecção do vírus ou da presença do genoma viral por meio de ensaios baseados na PCR podem tanto ser mantidas sob refrigeração (4°C) ou ser congeladas, e não há a necessidade de usar meio de transporte específico.

Referências bibliográficas

1. ALEXANDERSEN, S.; MOWAT, N. Foot-and-Mouth Disease: Host Range and Pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and immunology**, v. 288, p. 9-42, 2005.
2. ALEXANDERSEN, S.; ZHANG, Z.; DONALDSON, A.I. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. **J. Comp. Pathol.**, v. 129, n. 1, p. 1-36, 2003.
3. ALEXANDERSEN, S.; ZHANG, Z.; DONALDSON, A.I. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals – the carrier problem. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1099-1110, 2002.
4. AMASS, S.F. et al. Procedures for preventing transmission of foot-and-mouth disease virus (O/TAW/97) by people. **Vet. Microbiol.**, v. 103, p. 143-149, 2004.
5. BARTLEY, L.M.; DONNELLY, C.A.; ANDERSON, R.M. Review of foot-and-mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites. **Vet. Rec.**, v. 151, p. 667-669. 2002.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA). **Relatório Anual**, 2004.
7. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. **Manual de procedimientos para la prevención y erradicación de las enfermedades vesiculares de los países**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-OPAS/OMS, 1996.
8. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. **Procedimiento para la colecta y remisión de muestras para el Diagnóstico de enfermedades vesiculares y su diferencial**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA/SPV/OPAS/OMS, 2003.
9. DOEL, T.R. FMD vaccines. **Virus Res.**, v. 91, p. 81-99, 2003.
10. GRUBMAN, M.J.; BAXT, B. Foot-and-mouth disease. **Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 465-93, 2004.
11. KITCHING, R.P.; ALEXANDERSEN, S. Clinical variation in foot and mouth disease: pigs. **Rev. Sci. Tech.**, v. 21, p. 513-518, 2002.
12. LYRA, T.M.P.; SILVA, J.A. A febre aftosa no Brasil, 1960-2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 5, 2004.
13. McCullough, K.C. et al. Protective immune response against foot-and-mouth disease. **Journal of Virology**, v. 66, p. 1835-1840, 1994.

14. MUSSER, J.M. A practitioner's primer on foot-and-mouth disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 224, p. 1261-1268, 2004.
15. OLEKSIEWICZ, M.B.; DONALDSON, A.I.; ALEXANDERSEN, S. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p. 23-35, 2001.
16. SAMARA, S.I. et al. Implicações técnicas da vacinação na resposta imune contra o vírus da febre aftosa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 6, 2004.
17. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

2.7 Doença vesicular do suíno

Conceito

A doença vesicular do suíno é uma doença infectocontagiosa vírica, clinicamente indistinguível da febre aftosa. Foi diagnosticada pela primeira vez na Itália na década de 60 e, apesar de ser uma doença exclusiva de suínos, pode afetar também o homem, causando um quadro clínico similar à gripe, com sinais respiratórios moderados. No Brasil, ainda não há registros da doença.

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da doença vesicular do suíno, pertencente à Família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, denominado vírus da Doença Vesicular do Suíno (VDVS)^[6]. O VDVS é um vírus RNA de fita simples, esférico e não envelopado. Como outros membros da Família *Picornaviridae*, codificam quatro proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 (proteínas de superfície) e VP4 (interior do capsídeo). As proteínas VP1, VP2 e VP3 possuem distintos sítios抗原icos, implicando a indução de anticorpos neutralizantes. Suas propriedades estão descritas na (Tabela 47). O VDVS está intimamente relacionado com o vírus coxsackie B5 do homem. Atualmente, está descrito somente um sorotipo do VDVS^[11].

Tabela 47. Propriedades estruturais e físico-químicas do vírus da doença vesicular do suíno.

Propriedade	Características do vírus
Tamanho da partícula viral	28 a 30nm
Massa molecular	8 a 9 x10 ⁶
Coeficiente de sedimentação	140 a 165 S
Densidade em CsCl	1,33 a 1,45g/ml em CsCl
Genoma	Molécula de ARN de banda simples e polaridade positiva, de 7.400 nucleótidos
Resistência	Fatores ambientais; desinfetantes de uso comum; solventes lipídicos
Estabilidade	Meses em fezes; mantém-se em pH de 3 a 12 por horas
Sensibilidade	Sensível a clorofórmio, éter, detergentes não iônicos, hidróxido sódio a 2%, formol a 10%; álcool 70%, e calor a 69°C
Vias de infecção	Contato direto entre animais saudáveis e doentes; excreções e secreções; ingestão de alimentos contaminados; feridas e erosões de pele; fômites

O VDVS é um vírus epiteliotrópico que tem como sítio primário de replicação o epitélio es-camoso estratificado da pele e da mucosa^[8]. No caso da infecção via oral, o VDVS atinge o epitélio oral, as tonsilas e chega ao intestino, onde ocorre a primeira replicação e a formação das lesões primárias. Em seguida, passa para os gânglios mesentéricos regionais^[2,8]. Na infecção cutânea envolvendo erosões, feridas na pele ou mucosas, ocorre a replicação primária no epitélio de contato, formação das lesões primárias e disseminação por via linfática até os linfonodos regionais. Tanto pela via digestiva quanto pela linfática, após atingir a rede de linfonodos regionais ou de drenagem, o vírus vai para a corrente sanguínea, causa viremia e se distribui de forma sistêmica pelo organismo fazendo a segunda replicação nos diferentes epitélios^[3,4,9].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento e identificação do VDVS ou por meio de provas imunológicas. Todos os procedimentos devem ser realizados conforme instrução do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA).

a) Epidemiologia

A transmissão da DVS ocorre pela via horizontal, principalmente de forma direta, pelo contato entre animais doentes e animais saudáveis. Indirectamente, através de fômites, veículos e alimentos contaminados também pode ocorrer a transmissão. Ao contrário do vírus da febre aftosa, a transmissão via aerógena não possui importância. Os animais infectados eliminam o vírus principalmente no líquido das vesículas, da saliva, da urina e pelas fezes^[1,2,4].

O enterovírus é muito resistente, no ambiente, a solventes lipídicos e estável em meio ácido. É sensível a clorofórmio, éter, detergentes não iônicos, hidróxido sódio a 2%, formol a 10% e álcool 70%, e temperatura de 69°C. A morbidade da doença vesicular do suíno é variável, sendo, em geral, baixa^[10,12]. Na (Tabela 48) estão informações sobre diferentes doenças com características vesiculares, quais espécies animais são mais comumente acometidas e as vias de transmissão.

Tabela 48. Diferentes doenças com características vesiculares, considerando espécies acometidas e vias de transmissão.

Agente	Espécies animais acometidas	Vias de transmissão
Vírus da estomatite vesicular suína	Suínos e humanos	Contato, alimentos contaminados e fômites
Vírus da febre aftosa	Suínos, bovinos, ovinos, caprinos, animais silvestres	Aerógena (aerossóis), contato, alimentos contaminados e fômites
Vírus do exantema vesicular suíno	Suínos	Contato direto, alimentos contaminados e fômites
Vírus da estomatite vesicular	Suínos, equinos, bovinos, humanos, algumas espécies silvestres	Contato direto, picadura de insetos

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos são indistinguíveis dos da febre aftosa, o que dificulta a diferenciação entre as duas doenças no campo. O período de incubação da doença vesicular do suíno varia de 3 a 7 dias. Inicialmente, os animais apresentam hipertermia e claudicação, que coincidem com o aparecimento das vesículas no espaço interdigital e na coroa dos cascos, na mucosa da boca, lín-

gua e focinho^[4,5]. Com o passar do tempo, os animais se tornam apáticos, apresentam inapetência e sialorreia. Fêmeas gestantes podem abortar^[8].

Alguns leitões podem desenvolver necrose no miocárdio, o que ocasiona um quadro de morte súbita. Uma pequena parcela dos animais acometidos pode manifestar sinais nervosos em decorrência das lesões no SNC. Os sinais nervosos mais frequentes são: pedalagem, rotação ocular, movimentos repetitivos (como esfregar o focinho) e mordedura. Os leitões lactentes que manifestam sinais nervosos normalmente morrem devido à inanição.

Os animais acometidos, exceto nos casos de miocardite e lesões nervosas, recuperam-se em duas a três semanas. A taxa de mortalidade é normalmente baixa e varia de acordo com a fase em que atinge os animais e com a virulência da cepa^[2,4,9]. Em alguns casos podem ocorrer infecções subclínicas ou inaparentes^[4,12].

c) Patologia

Macroscopicamente, as vesículas estão presentes no focinho, na mucosa da boca, na língua, e principalmente na coroa dos cascos^[10]. O VDVS atinge o epitélio escamoso estratificado, apresentando zonas de tumefação de coloração pálida com acúmulo de líquido seroso no interior formando vesículas. As vesículas aparecem 48 horas após a exposição do vírus e medem de 1 a 5cm, primeiramente no rodete coronário e depois em outras regiões^[3]. O líquido no interior das vesículas tem aspecto serossanguinolento.

No local da lesão, o epitélio apresenta-se tumefato, pálido, e de forma progressiva vai se separando do estrato basal, sendo o espaço ocupado por líquido serossanguinolento ou incolor, formando vesículas pequenas. As vesículas vão confluindo até formar grandes aftas que, entre 6 a 24 horas após a aparição, se rompem formando áreas de erosão, com perda do epitélio. Ocasionalmente, alguns animais podem apresentar lesões cardíacas, como coração tigrado, semelhante ao que ocorre na febre aftosa^[3,4].

Microscopicamente, observam-se as lesões no estrato espinhoso, ocorre degeneração hidrópica e edema intercelular, as células epiteliais adotam formas esféricas e, conforme a expansão do epitélio, vão se rompendo e formando microvesículas. Aos poucos, as microvesículas vão confluindo e formando vesículas maiores. O estrato basal permanece intacto e, nos casos de infecções secundárias, é possível observar infiltrado de neutrófilos e macrófagos^[3,4,5].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é baseado na detecção do vírus ou de anticorpos contra o vírus. A soroneutralização ocorre 4 a 7 dias após a infecção e persiste por vários meses^[1,2].

A detecção do RNA viral pode ser realizada a partir de amostras de líquido das vesículas, epitélio das aftas, suabes das lesões, fezes, soro e sangue total (coletado com EDTA) através da RT-PCR e qPCR. As técnicas de detecção de anticorpos empregadas são: virusneutralização (VN) e teste de ELISA.

e) Diagnóstico diferencial

Realizar o diagnóstico diferencial de outras doenças vesiculares, como exantema vesicular dos suínos, estomatite vesicular e, principalmente, febre aftosa.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Como a DVS é semelhante à febre aftosa (*Ver item: Febre aftosa*), sempre que suspeitar de DVS se deve suspeitar de febre aftosa também. Como se trata de uma doença de notificação compulsória, devem-se notificar os órgãos de Defesa Sanitária Oficiais.

Para isolamento viral, proceder à coleta de epitélio de vesícula, líquido vesicular, suabe nasofaríngeo, fezes ou tecidos, que devem ser acondicionados em meio de transporte. Todas as amostras devem ser mantidas sob refrigeração a 4°C, exceto amostras de leite, que podem ser congeladas^[7,12]. Além disso, as amostras clínicas devem ser colhidas de forma estéril e com cuidado para que não entrem em contato com desinfetantes e, assim, não se comprometa o isolamento viral.

Os ensaios moleculares baseados na PCR a partir do sangue total permitem detectar o vírus a partir do segundo dia após a infecção, entretanto a viremia somente permanece por, no máximo, 3 a 5 dias. Tanto as amostras destinadas ao exame bacteriológico quanto as utilizadas para ensaios moleculares, devem ser mantidas sob refrigeração a 4°C até o processamento pelo laboratório de diagnóstico veterinário.

Para o estudo histopatológico, colher pulmão, pleura e pericárdio, tendo o cuidado de contemplar a região limítrofe da lesão, incluindo tecido aparentemente normal. Nesse caso, o material deve ser fixado e conservado em solução tamponada de formol a 10%. Linfonodos, SNC, fígado, baço, rim, intestino, coração, pleura, pericárdio e meninges também devem ser colhidos para o diagnóstico diferencial/definitivo.

A colheita de sangue/soro para os testes sorológicos deve contemplar uma amostragem significativa de animais da(s) fase(s) que se quer estudar. Coletar no mínimo 3 a 5mL de soro, devendo este ser mantido sob refrigeração a 4°C. Se o tempo até o processamento ultrapassar 48 horas, o material pode ser congelado.

Referências bibliográficas

1. DEKKER, A. et al. Isotype specific ELISAs to detect antibodies against swine vesicular disease virus and their use in epidemiology. **Epidemiology and Infection**, v. 128, n. 2, p. 277-284, 2002.
2. DEKKER, A. et al. Pathogenesis of swine vesicular disease after exposure of pigs to an infected environment. **Veterinary Microbiology**, v. 45, n. 2-3, 1995, p. 243-250.
3. ESCRIBANO-ROMERO, E.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M.A.; LEY, V. Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 1, p. 119-26, 2000.
4. FERNÁNDEZ, J. et al. Rapid and differential diagnosis of foot-and-mouth disease, swine vesicular disease, and vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. **J. Virol. Methods**. 2007.
5. GARNER, G.; SAVILLE, P.; FEDIAEVSKY, A. **Manual for the recognition of exotic diseases of livestock: A reference guide for animal health staff**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2003. 1016p.
6. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV]. Universal virus database, version 4. 00.052.0.01. **Enterovirus**. ICTV, 2006.
7. KITCHING, R.P.; DONALDSON, A.I. Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 6, p. 263-272, 1987.
8. LIN, F.; KITCHING, R.P. Swine vesicular disease: an overview. **Vet. J.** v. 160, p. 192-201, 2000.
9. LOXAM, J.R.; HEDGER, R.S. Swine vesicular disease: clinical signs, diagnosis, epidemiology and control. **Rec. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 2, p. 11-24, 1983.
10. MEBUS, C.A. Swine vesicular disease. In: **Foreign animal diseases**. Richmond, VA: United States Animal Health Association, 1998. 378p.

11. VERDAGUER, V. et al. Structure of Swine Vesicular Disease Virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine. *J. Virol.* v. 77, n. 18, p. 9780-9789, 2003.
12. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

2.8 Rotavirose suína

Conceito

A rotavirose suína é uma doença infecciosa viral aguda, que afeta leitões jovens, principalmente entre 5 e 13 dias de idade. As perdas econômicas com a doença estão relacionadas com a mortalidade dos leitões, a desuniformidade do lote, os gastos com o controle da doença e a predisposição a infecções secundárias por cepas de *E. coli* enterotoxigênicas, clostridioses e coccidiose, que elevam os índices de mortalidade. Apesar de a rotavirose ter sido diagnosticada em diversas granjas de suínos no Brasil, seu diagnóstico atualmente é subestimado.

Etiologia e Patogênese

A rotavirose suína é causada por um vírus pertencente à Família *Reoviridae*, denominado *Rotavirus* (RTSV). O RTSV é um vírus RNA de fita dupla, com capsídeo proteico não envelopado e diâmetro de 75nm^[9].

O RTSV é dividido em 7 grupos antigênicos, também chamados de espécies, classificados de A a G. A maioria dos isolados pertence ao grupo A, no qual são conhecidos 14 sorotipos (G1 a G14)^[1,2,5,6]. Os principais antígenos específicos do grupo são a glicoproteína VP4 (87kDa), proteína de aderência, e VP7 (37kDa), que induzem a anticorpos neutralizantes específicos ao sorotipo^[8].

O RTSV penetra no organismo através da via oral. Uma vez no trato gastrointestinal, tem tropismo pelos enterócitos maduros e células M, principalmente na região do ápice até a porção intermediária das vilosidades do intestino (jejuno, íleo, ceco e cólon), onde se replica e causa a lise dos enterócitos^[9,12].

A entrada do RTSV no enterócito pode ocorrer de forma direta ou por endocitose. Na forma direta ocorre a penetração do genoma e da parte interna do capsídeo no citosol da célula, e a camada externa (VP7) fica na membrana celular. Nos casos em que ocorre a entrada por endocitose, esta é mediada por fatores de adesão, como a proteína VP4, que, quando clivada pela tripsina pancreática no aminoácido arginina em VPS e VP8, se liga facilmente a receptores específicos do enterócito, principalmente gangliosídeos GM3 (galactosa, glucosa, esfingosina e ácido siálico, que pode ser ácido glicolíneuramínico ou ácido acetilneuramínico), induzindo a um processo de endocitose. Após a entrada no enterócito e a formação do fagolisosomo, ocorre a proteólise da VP6, com consequente liberação do genoma viral e ativação da transcriptase reversa (RT), dando início à replicação. O ciclo de replicação termina quando o vírus é liberado na luz intestinal em decorrência da lise celular^[4,9,12]. A diarreia é causada por má absorção pela destruição dos enterócitos, alterações no balanço de fluidos transepiteliais e isquemia venosa local.

O RTSV também possui uma proteína não estrutural, a NSP4, que se comporta como uma “enterotoxina viral multifuncional” que aumenta os níveis de cálcio intracitoplasmático, a ativação de AMPc e a secreção de cloro^[7,8,12]. Como consequência, ocorre aumento na secreção de cloro, alteração nos processos de absorção de água, nutrientes e eletrólitos, bem como redução da

secreção de enzimas como a lactase, produzindo uma diarreia tanto do fundo secretório quanto por má absorção. Na patologia ocorre atrofia e fusão das vilosidades intestinais e uma intensa reação inflamatória.

O agente é muito resistente no ambiente, e resistente à maioria dos desinfetantes comuns. Pode sobreviver a temperaturas de 18 a 20°C, e nas fezes por 7 a 9 meses. É sensível a fenóis, hipoclorito de sódio 1%, formalina 3,7% e álcool etílico 70%^[1,12].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo pode ser realizado pela detecção do agente associado às lesões histopatológicas e aos sinais clínicos.

a) Epidemiologia

A rotavirose acomete principalmente leitões entre três e cinco semanas de idade. A gravidade da infecção depende da virulência da cepa, da faixa etária dos animais, do estado imunológico, de fatores ambientais, da deficiência no manejo e do envolvimento de agentes secundários. Filhos de primíparas tendem a desenvolver a doença com maior frequência e maior gravidade.

A infecção dos animais ocorre principalmente pela ingestão de fezes, alimentos e água contaminados^[12]. Animais doentes e portadores assintomáticos são os principais responsáveis por manter o vírus na granja, visto que eliminam grande quantidade de partículas virais nas fezes. As matrizes também podem ser consideradas uma fonte potencial de infecção para a leitegada, pois, devido ao estresse no período periparto, ocorre a eliminação do vírus nas fezes, contaminando as instalações e, indiretamente, os leitões.

A taxa de morbidade é alta, atingindo frequentemente 80%, enquanto a taxa de mortalidade varia de 20% a 50%. Esses valores podem variar de acordo com a imunidade dos leitões, desafio, e a presença de infecções secundárias, como *E. coli* enterotoxigênicas, que podem tanto preceder a infecção por rotavírus quanto ser secundária^[1,3,14]. Em ambas as situações os surtos cursam com alta mortalidade.

É importante considerar que os anticorpos maternos podem permanecer por três a seis semanas, possibilitando proteção parcial ao filhote^[8].

b) Sinais clínicos

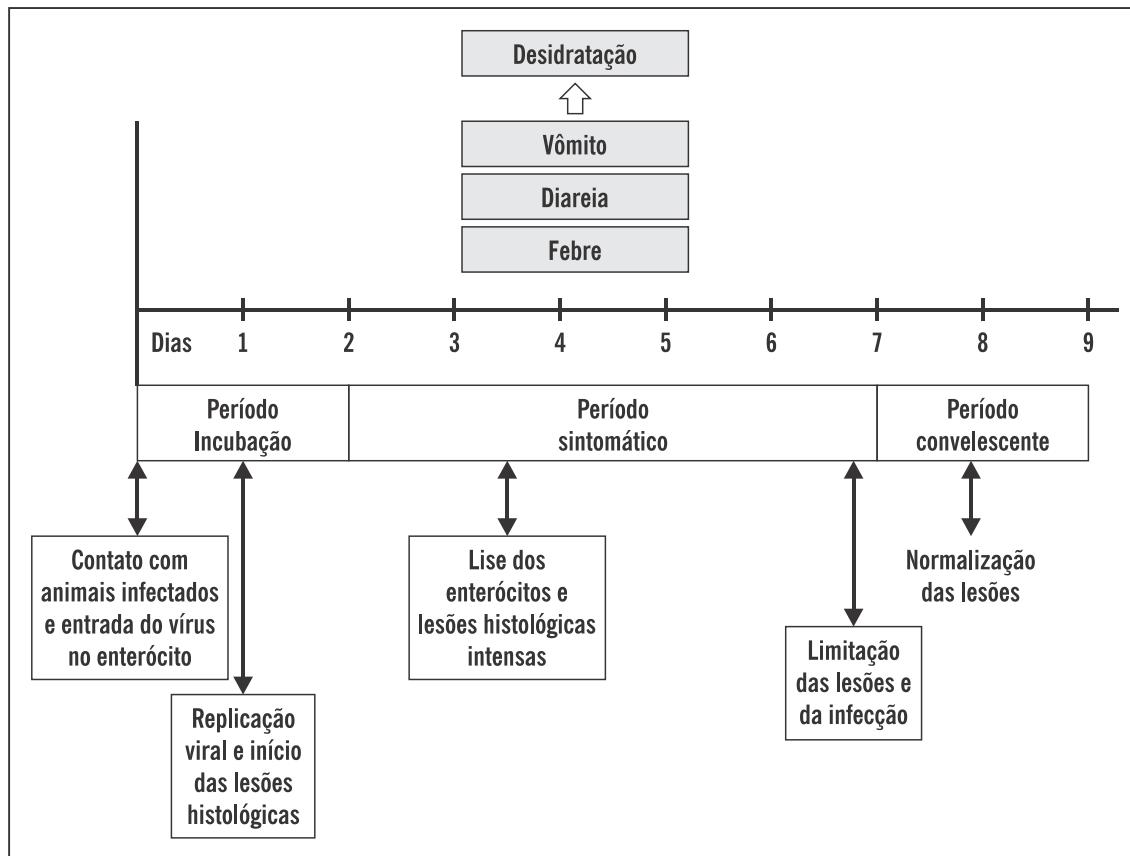
O período pré-patente é de aproximadamente 12 a 96 horas. Os animais apresentam anorexia, vômito, diarreia de aquosa a cremosa e de coloração amarela a esverdeada, contendo leite não digerido (Figura 6). Há desidratação intensa. A diarreia pode durar 4 a 7 dias, e os leitões que sobrevivem apresentam retardo no crescimento^[3,12]. Agentes secundários podem agravar os sinais clínicos.

c) Patologia

Durante a necropsia é possível observar lesões concentradas principalmente no intestino delgado, que se apresenta com as paredes adelgaçadas e flácidas, com conteúdo intestinal líquido e aspecto cinza-amarelado^[12,14]. No estômago se nota a presença de alimento não digerido e paredes flácidas.

Na histologia se observa degeneração hidrópica e descamação dos enterócitos, atrofia das vilosidades, necrose e atrofia das vilosidades com a presença de células cuboides ou achatadas (imaturas), hiperplasia das criptas, presença de infiltrado linfocitário nos espaços intraepiteliais e presença de linfócitos, células plasmáticas e granulócitos na lâmina própria^[9,14].

Figura 6. Relação entre os sinais clínicos e achados histológicos na infecção por rotavírus.



d) Diagnóstico laboratorial

A detecção do vírus pode ser realizada por ferramentas moleculares e isolamento viral. É prudente realizar exame bacteriológico visando estabelecer diagnóstico diferencial, ou detectar infecções secundárias por *E. coli*, clostridioses enterotoxigênicas e coccidiose^[9,11].

Ensaios baseado na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR e qPCR) podem ser utilizados com sucesso á partir do conteúdo intestinal ou fezes^[13].

Exames sorológicos não têm muita valia para o diagnóstico da doença, seja para o diagnóstico individual, seja para o do rebanho, visto que a presença de anticorpos pode chegar a 100% em animais de abate em algumas granjas, mesmo sem a manifestação clínica da doença^[9,10]. Mesmo assim, para efeito de interpretação de exames sorológicos, é importante considerar que os anticorpos maternos podem permanecer até três a seis semanas de idade.

e) Diagnóstico diferencial

Diferenciar de outras doenças que cursam com diarreia na fase do aleitamento. Muitas vezes, agentes secundários como *E. coli*, clostridioses enterotoxigênicas, coccidiose podem agravar o quadro clínico e dificultar o diagnóstico clínico e o laboratorial.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A detecção do vírus pode ser realizada a partir da colheita de material fecal diretamente do reto, utilizando suave ou, no caso da necropsia, a partir de fragmento do intestino delgado^[11].

No caso de necropsia, é conveniente fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou “bolsa”), realizando os cortes entre estas e evitando o extravasamento do conteúdo, preservando o conteúdo da luz. Quando se deseja coletar amostras do conteúdo intestinal durante a necropsia utilizando suave, deve-se abrir um pequeno orifício, introduzir o suave e girar suavemente para colher uma amostra clínica em quantidade satisfatória. Tanto as amostras destinadas ao exame bacteriológico quanto as utilizadas para ensaios moleculares, devem ser mantidas sob refrigeração a 4 a 8°C até o processamento laboratorial. Para garantir a fiabilidade do isolamento, é importante que o tempo entre a coleta e o processamento não ultrapasse 24 horas. Não congelar as amostras clínicas destinadas ao isolamento viral.

As amostras clínicas dos diferentes órgãos/tecidos (inclusive fragmentos intestinais do duodeno, jejuno, íleo e cólon) destinadas a exame histopatológico devem ser fixadas em solução tamponada de formol a 10%.

A colheita de soro para os testes sorológicos deve contemplar uma amostragem significativa de animais da(s) fase(s) que se quer estudar. Coletar sangue para obtenção de uma quantidade mínima de 3 a 5mL de soro, devendo este ser mantido sob refrigeração a 4 a 8°C. Se o tempo até o processamento ultrapassar 48 horas, o material pode ser congelado.

Referências bibliográficas

1. DEWEY, C. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Can. Vet. J.**, v. 44, n. 8, p. 649-653, 2003.
2. GREGORI, F. et al. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n. 9, 2009.
3. KHAMRIN, P. et al. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**. v. 361, p. 243-252, 2007.
4. LONIEN, S.C.H. et al. The *in vitro* comparative cytopathology of a porcine rotavirus and the simian prototype (SA-11). **Arq. bras. med. Zootec.**, v. 53, n. 4, p. 406-409. 2001.
5. RACZ, M.L. et al. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2443-2446, 2000.
6. PARRA, G.I. et al. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: Increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 243-2501, 2008.
7. COOK, N. et al. The zoonotic potential of rotavirus. **J. Infect.**, v. 48, n. 4, p. 289-302, 2004.
8. DENNEHY, P.H. *Rotavirus vaccines: An overview*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 198-208, 2008.
9. ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses, In: Knipe D.M. et al. (Eds). **Fields Virology**. 5. ed., Philadelphia: Lippincott. p. 1917-1974, 2007.
10. GREGORI, F. et al. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arq. Inst. Biol.**, v. 67, n. 2, p. 191-194, 2000.
11. RASOOL, N.B.G.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. Determination of a universal nucleic acid extraction procedure for PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens. **J. Virol. Methods**, v. 100, n. 1-2, p. 1-16, 2002.
12. SAIF, L.J.; ROSEN, B.I.; PARWANI, A.V. Animal rotaviruses, In: KAPIKIAN, A.Z. (Ed.). **Viral Infections of Gastrointestinal Tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 279-367, 1994.
13. SUJI, P.; VERGHESE, S. Detection of porcine rotavirus from tissue and faecal specimens. **Indian Journal of Medical Microbiology**, n. 27, v. 2, p. 149-52, 2009.

14. JONES, T.; HUNT, R.D; KING, N.W. **Veterinary Pathology**. 6. ed., USA: Hardback. 1997. 1392p.

2.9 Síndrome reprodutiva e respiratória suína

Conceito

A síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS) é uma doença infecciosa de origem viral, altamente contagiosa e de grande impacto econômico para a suinocultura mundial. Apesar de não ser diagnosticada no Brasil, a doença está amplamente difundida nos Estados Unidos e na Europa.

Etiologia e Patogênese

O vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae*, gênero *Arterivirus*. É um vírus RNA envelopado de fita simples positiva com aproximadamente 15kb, já sequenciado na sua totalidade (Tabela 49)^[7,12]. Como característica comum dos arterivírus, o PRRSV apresenta grande variabilidade genética e antigênica, o que limita a eficácia das vacinas^[2,16]. Mesmo assim, existem várias marcas comerciais disponíveis no mercado com boa eficácia.

Tabela 49. Propriedades das partículas virais e características físico-químicas do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína.

Propriedade	Características
Genoma	RNA fita simples positiva com 15kb, formado por 8 ORFs
Estrutura	Tamanho da partícula viral: 50 a 72nm Tamanho do capsídeo: 20 a 30nm
Densidade	1,18 a 1,19g/ml em CICs 1,13- a 15g/ml em gradiente de sacarose
Estabilidade	Temperaturas de -70 a -20°C; pH 6,5 a 7,5;
Sensibilidade	pH < 6 a > 7,5 e temperaturas > 4°C
Inativantes/Desinfetantes	Clorofórmio, éter e detergentes

O vírus pode infectar suínos de todas as idades^[1,4,5]. A infecção pode ocorrer pela via oronasal ou pela reprodutiva, através da mucosa vaginal. A replicação ocorre no citoplasma das células do sistema mononuclear fagocítico (monócitos, macrófagos e células dendríticas), principalmente macrófagos alveolares, pelos quais o vírus possui tropismo, causando a lise celular. Os virions se acumulam no citoplasma das células infectadas e saem por exocitose 9 a 12 horas após a infecção e atingem os linfonodos regionais, onde ocorre a segunda replicação^[3,14]. Em seguida, o vírus atinge a corrente sanguínea, produz viremia e se dissemina de forma sistêmica, geralmente ligado a monócitos e macrófagos do sistema reticuloendotelial, para os diferentes tecidos e órgãos, como coração, fígado, rins, cérebro, pulmão, nódulos linfáticos peribronquiais, timo, tonsilas, medula óssea e baço^[7,11]. Em fêmeas gestantes o vírus ultrapassa a barreira placentária e infecta os fetos. Quando a infecção ocorre até o 35º dia de gestação, ocorre reabsorção fetal, repetição de estro e baixa concepção. Entre o 36º e o 85º dia ocorre baixa taxa de concepção e aumento da taxa de mumificados, e a partir dos 85 dias ocorre aborto, aumento da taxa de mumificados e de natimortos^[3,4,7,8,13].

Diagnóstico

O diagnóstico clínico da PRRS é dificultado pela ausência de sinais clínicos característicos. O diagnóstico definitivo pode ser realizado pelo isolamento e identificação do vírus, e pela detecção por meio de técnicas moleculares ou exames sorológicos.

a) Epidemiologia

O PRRSV pode ser transmitido pelas vias horizontal (transplacentária) e vertical, sendo o contato direto entre animais doentes e sadios uma das principais vias de transmissão (Tabela 50)^[5,6,10,13,15]. Os animais infectados eliminam o vírus principalmente pela saliva, pela urina, pelo sêmen e pelas secreções mamárias, podendo disseminar o vírus durante até 8 semanas após a infecção. Animais recuperados atuam como reservatório do vírus^[6,9,11,13,15].

Tabela 50. Características epidemiológicas e fatores associados aos mecanismos de transmissão e fontes de infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV)

Propriedade epidemiológica do PRRSV	Fatores de transmissão e infecção do PRRSV
Vias de eliminação do vírus	Saliva, urina e sêmen
Vias de transmissão do PRRSV	Contato direto entre animais doentes e sadios, introdução de animais positivos, vertical transplacentária, sêmen e fômites contaminados
Persistência do vírus na granja	Animais infectados; introdução de animais de reprodução; portadores inaparentes após a infecção, que se mantêm virêmicos durante semanas ou meses, atuando como reservatórios; infecção vertical intrauterina e pós-parto; leitões que nascem e permanecem persistentemente infectados

b) Sinais clínicos

A intensidade dos sinais clínicos depende da virulência da cepa, da imunidade do rebanho, de fatores ambientais e das condições de manejo^[2,7,11].

No quadro agudo da doença, os animais apresentam anorexia, letargia, hipertermia, dispneia e cianose de orelhas, focinho, mamas e vulva. Podem ocorrer partos prematuros, nascimento de leitões fracos, natimortos, mumificados ou abortos no final da gestação^[1,3,7]. A mortalidade de fêmeas está associada a edema pulmonar, cistites e pielonefrites^[1,13]. Os machos apresentam letargia, anorexia, sinais respiratórios, diminuição da libido e do volume e viabilidade do sêmen^[7,9]. Leitões lactentes apresentam alta mortalidade, sendo maior na primeira semana de vida; posteriormente; tende a diminuir. Manifestam dispneia, apatia, diarreia, edema de pálpebras e conjuntiva ocular, lesão patognomônica, tremores, *splay-leg* e, ocasionalmente, hemorragias, principalmente no umbigo. Infecções bacterianas secundárias agravam o quadro, podendo ocorrer poliartrite, meningite e epidermite exsudativa. Leitões na fase de crescimento e engorda apresentam retardos no desenvolvimento, desuniformidade no lote, anorexia, dispneia, letargia e hiperemia cutânea^[3,7]. A mortalidade é variável entre 10% e 20% e está relacionada com a ocorrência de infecções secundárias. A PRRS pode também apresentar-se na forma subclínica. Nesse caso, os animais permanecem portadores por longos períodos^[4,5,8,10].

Frequentemente, podem ocorrer infecções secundárias por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella Cholerasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e doença de Aujeszky^[12,13].

c) Patologia

Macroscopicamente, as lesões pulmonares são mais evidentes em leitões jovens, que apresentam consolidação pulmonar difusa com aspecto manchado, de coloração variando de roxa a marrom^[7]. Em condições de campo, os suínos infectados pelo PRRSV normalmente se apresentam coinfectados por outros patógenos, o que dificulta o diagnóstico baseado em lesões^[7,12,13].

As lesões histopatológicas são bastante inespecíficas; geralmente estão localizadas no pulmão e no tecido linfoide e se caracterizam por pneumonia intersticial multifocal com a presença de infiltrado mononuclear perialveolar, hiperplasia e hipertrofia dos pneumócitos tipo 2, acúmulo de exsudato inflamatório e necrótico alveolar. Os gânglios linfáticos apresentam hiperplasia folicular e focos de necrose^[2,3,7].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento viral é uma técnica laboriosa, demorada, e o vírus da PRRS é facilmente inativado com variação de temperatura. Nas culturas de células infectadas o efeito citopático é visível entre 2 e 7 dias após a inoculação; entretanto, a detecção deve ser realizada pelas técnicas moleculares baseadas na PCR ou na imunofluorescência direta.

O exame sorológico para detecção de anticorpos específicos para o PRRSV deve ser considerado quando o rebanho, em teste anterior, revelou resultado negativo ou, nos casos de coleta pareada, ocorrer aumento expressivo nos títulos. O pico de IgG ocorre aos 30 a 50 dias após a infecção. O teste de ELISA é o método de eleição para diagnóstico da PRRS, pois possibilita a detecção de anticorpos 9 a 13 dias após a infecção^[11].

e) Diagnóstico diferencial

É imprescindível diferenciar PRRS de outras doenças que também cursam com quadros reprodutivos, como parvovírus suíno, PCV-2, leptospirose, doença de Aujeszky, doença de Glässer, peste suína clássica, influenza suína, toxoplasmose, micotoxinas (zeralenona) e intoxicação por cobre^[7,12].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras para diagnóstico laboratorial devem ser obtidas, preferencialmente, de animais jovens, pois esses apresentam viremias mais intensas e mais duradouras.

Apesar de o isolamento viral ser pouco utilizado na rotina de diagnóstico laboratorial da PRRS, quando desejado, colher amostras clínicas de tonsilas, pulmão, gânglios linfáticos, rins, coração e fígado. Como o PRRSV é muito sensível à variação de temperatura, as amostras clínicas devem ser mantidas sob refrigeração a 4°C ou congeladas a uma temperatura de -20°C, devendo ser submetidas ao processamento laboratorial imediato. As mesmas amostras destinadas ao isolamento viral, juntamente com sangue total (com EDTA) ou soro, podem ser destinadas ao diagnóstico por meio de ensaios moleculares.

A colheita de amostras clínicas visando ao exame histopatológico deve incluir fragmentos de estômago, intestino, linfonodos pulmonares e mesentéricos, rim, fígado, baço, coração, sistema nervoso central e músculo esquelético. Os materiais devem ser conservados em solução tamponada de formol a 10%.

Para o sorodiagnóstico, enviar ao laboratório 3 a 5ml de soro, devendo este ser mantido sob refrigeração a 4 a 8°C. Se o tempo até o processamento ultrapassar 48 horas, o material pode ser congelado. A amostragem do rebanho para diagnóstico sorológico deve ser significativa e incluir animais de diferentes fases de produção.

Referências bibliográficas

1. CANO, J.P. et al. PRRSV vertical transmission dynamics in an endemically infected sow herd. In: INTERNATIONAL PRRS SYMPOSIUM (IPRRSS), 2007, Chicago, EUA. **Proceedings...** Chicago. 2007. p. 112-113.
2. BALKA, G. et al. Evaluation of lung lesions after PRRSV (Type I) challenge in vaccinated and non-vaccinated pigs. In: INTERNATIONAL PRRS SYMPOSIUM (IPRRSS), 2007, Chicago, EUA. **Proceedings...** Chicago. 2007. p. 421-422.
3. CHRISTIANSON, W.T.; CHOI, C.S; COLLINS, J.E. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. **Can. J. Vet. Res.**, v. 57, p. 262-268, 1993.
4. DEE, S.A.; MOLITOR, T.W.; ROSSOW, K.D. Epidemiological and diagnostic observations following the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a breeding herd of pigs by the test and removal protocol. **Vet. Rec.**, v. 146, p. 211-213, 2000.
5. DEE, S. et al. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. **Can. J. Vet. Res.**, v. 67, n. 12-19, 2003.
6. DEE, S.A.; DEEN, J.; PIJOAN, C. Evaluation of four intervention strategies to prevent the mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Can. J. Vet. Res.**, v. 68, p. 19-26, 2004.
7. DONE, S.H.; PATON, D.J.; WHITE, M.E.C. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. **British Vet. J.**, v. 152, n. 2, p. 153-174, 1996.
8. DREW, T.W. A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. **Veterinary Research**, v. 31, p. 27-39. 2000.
9. GREISER-WILKE, I. et al. Molecular epidemiology of German and European PRRSV isolates In: INTERNATIONAL PRRS SYMPOSIUM (IPRRSS), 2007, Chicago, EUA. **Proceedings...** Chicago. 2007.
10. JONG, M.C.M. et al. Epidemiological studies: Can they help to improve PRRSV eradication efforts? In: INTERNATIONAL PRRS SYMPOSIUM (IPRRSS), 2007, Chicago, EUA. **Proceedings...** Chicago. 2007.
11. LUNNEY, J.K. et al. Swine immunity and resistance to persistent PRRSV infection In: INTERNATIONAL PRRS SYMPOSIUM (IPRRSS), 2007, Chicago, EUA. **Proceedings...** Chicago. 2007.
12. MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, p. 3-16, 1995.
13. MORTENSEN, S. et al. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. **Prev. Vet. Med.**, v. 53, n. 1-2, p. 83-101, 2002.
14. WAGNER, J. et al. Pulmonary dysfunctions in pigs experimentally infected with PRRSV. In: INTERNATIONAL PRRS SYMPOSIUM (IPRRSS), 2009, Chicago, EUA. **Proceedings...** Chicago. 2009.
15. YANG, J.S. et al. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock breeding farm and a supplying boar stud by a modified test and removal method. **Vet. Rec.**, v. 162, p. 333-337, 2008.
16. YOON, K.J. et al. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 305-312.95.

2.10 Influenzasuína

Conceito

A influenza suína (IS), também denominada gripe suína, é uma doença respiratória altamente contagiosa, causada pelo vírus influenza tipo A. A enfermidade tem caráter sazonal, em forma de surtos com rápida transmissão entre os animais do rebanho, com maior ocorrência nos períodos mais frios. A doença foi descrita primeiramente no EUA, em 1918, e possui um importante potencial zoonótico, podendo ser associada com quadros respiratório em humanos^[8].

A influenza suína ocorre em diversos países produtores de suínos, porém até o momento não foi diagnosticada em plantéis suinícolas no Brasil.

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da influenza suína é um vírus RNA pertencente à família *Orthomyxoviridae* e gênero *Influviruses* tipo A. Os subtipos mais frequentemente associados aos casos clínicos da doença são H1N1, H1N2, H1N7, H3N2, H3N1, H4N6 e H9N2. Os influenzavírus tipos B e C são encontrados somente em humanos^[1,8,14].

No ano de 2009, o influenzavírus tipo A H1N1 foi associado a uma pandemia denominada Gripe A, ou influenza A (H1N1) em humanos, caracterizada por um quadro respiratório grave, causando centenas de mortes no mundo, inclusive no Brasil. Outro subtipo envolvido com a doença clínica em suínos é o H3N2, porém esse parece ter uma maior especificidade por hospedeiro, tendo sido isolado somente de suínos até o momento^[12].

Os influenzavírus são estruturalmente esféricos e envelopados e possuem o genoma composto por uma fita simples de RNA segmentada^[9] (Tabela 51). Os três tipos virais (A, B e C) podem ser distinguidos pela base antigenica das nucleoproteínas (NP) e proteínas da matriz (M). O envelope contém projeções rígidas compostas por hemaglutininas (H) e neuramidase (N). As hemaglutininas são responsáveis pela ligação do virion a receptores específicos na superfície da célula alvo, pela atividade hemaglutinante do vírus e pela indução de anticorpos neutralizantes. Já as neuraminidases podem ser classificadas em 9 tipos e são responsáveis pela saída (exocitose) de novos virions da célula do hospedeiro^[6,7,11,13].

Tabela 51. Propriedades das partículas virais e características físico-químicas do vírus da influenza suína

Propriedade	Características
Genoma	RNA fita simples
Estrutura	Tamanho da partícula viral: 80 a 120nm
Estabilidade	Temperaturas de -70 a -20°C; pH 6,8 a 8;
Sensibilidade	pH 6,8 a 8 e temperaturas > 8°C
Inativantes/Desinfetantes	Dodecil sulfato de sódio, detergentes, formalina e iodados

A especificidade pela célula alvo do hospedeiro está associada à presença de resíduos do ácido siálico, que atuam como receptores para as hemaglutininas e outras glicoproteínas da superfície viral. Os suínos expressam sialoglicoproteínas (receptores siálicos) nas células epiteliais do trato respiratório, o que permite a ligação do influenzavírus tipo A. Por esse motivo, os suínos são considerados *mixing vessels*, ou receptores mistos, pois permitem o reordenamento genético viral

e o surgimento de vírus “híbridos” ou, como definido por alguns grupos de pesquisa, supervírus. Esse parece ser o fator de maior importância na relação suínos-vírus da influenza suína, e possivelmente um dos responsáveis pelo surto de influenza A ou gripe A de 2009^[5,8,11].

O alto nível de recombinação genética, especialmente entre integrantes dos influenzavírus tipo A, é consequência do genoma segmentado, que permite permutações de genes. Cada vez que há recombinação de seu genoma entre si ou com vírus de outra espécie animal, como, por exemplo, vírus da influenza aviária, ou mesmo quando sofre mutações pontuais, surge um vírus cujo efeito na população é desconhecido. A adaptação a um novo hospedeiro significa, principalmente, alteração rápida das glicoproteínas da superfície, especialmente da hemaglutinina (H). Inúmeros subtipos, representados por diferentes isolados do influenzavírus circulam entre diversas espécies animais ao redor do mundo.

A replicação do vírus influenza A ocorre na mucosa nasal, na traqueia, nas tonsilas e no linfonodo traqueobronquial, mas o órgão alvo é o pulmão^[1,2,9].

Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada com o isolamento e identificação do agente.

a) Epidemiologia

A influenza suína ocorre de forma endêmica no Canadá, USA, México e em países da Europa. A doença também tem sido descrita na África do sul, na China, no Japão e na América do sul^[14]. A transmissão ocorre por contato direto suíno-suíno pela rota nasofaringiana ou pelo contato com secreções que contêm o vírus influenza A, como aerossóis produzidos pela tosse, espirros ou descargas nasais. A difusão do agente é facilitada por fatores pré-disponentes, como diminuição de temperatura, superlotação e má ventilação. Os animais soropositivos podem eliminar o vírus no ambiente por 20 a 30 dias^[1,5,14].

b) Sinais clínicos

O período de incubação é de 1 a 3 dias e frequentemente 50% do rebanho passa a apresentar os sinais clínicos 24 horas após o primeiro caso. Clinicamente, os animais doentes apresentam febre, prostração, inapetência, intolerância à movimentação, dificuldade respiratória, respiração abdominal, tosse, descargas nasais e oculares, conjuntivite, rinite e perda de peso. Os sinais são mais evidentes e mais agressivos em animais mais jovens, nos quais a morbidade pode chegar próximo a 100%, e a mortalidade em torno de 1%. A taxa de mortalidade pode ser mais expressiva à medida que ocorrem infecções secundárias^[2,5,10]. Os sinais clínicos se mantêm por 5 a 7 dias e em seguida regredem, porém os animais soropositivos podem eliminar o vírus no ambiente por 20 a 30 dias^[1]. Infecções secundárias ou coinfeções por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis* tipo 2 estão quase sempre presentes, agravando o quadro clínico e aumentando a severidade da doença e a taxa de mortalidade^[10]. Economicamente, as maiores perdas para a indústria suinícola são diminuição do crescimento, redução do ganho de peso e perda de desempenho do lote.

c) Patologia

As lesões estão concentradas no sistema respiratório. Na necropsia é possível observar hipoperfusão da mucosa e presença de grande quantidade de muco no trato respiratório superior, consolidação do parênquima pulmonar, principalmente nos lobos apicais e cardíacos, edema e enfisema pulmonar, presença de exsudato fibrinossanguinolento na cavidade pleural e pleurite fibrinosa^[2,5,7]. Nos casos fatais podem ser observados casos de pneumonia intersticial aguda.

No exame histopatológico podem ser observadas áreas de degeneração e necrose do epitélio dos brônquios e bronquiolos, e exsudato inflamatório no lúmen dos brônquios e bronquiolos. Também podem ser observados infiltrado linfocítico peribronquial e perivascular, atelectasia, pneumonia intersticial e enfisema^[1,5,7,9].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento viral pode ser realizado em cultivos celulares ou em ovos de galinha SPF (*specific pathogen free*) embrionados. Quatro dias após a inoculação em ovos SPF, retira-se o fluido alantoides e realiza-se o teste de hemoaglutinação (HA) para confirmar o diagnóstico.

A partir do tecido fixado em formalina pode ser realizado o exame histopatológico e a detecção de抗ígenos virais através da imuno-histoquímica^[3]. Em tecidos frescos a detecção do vírus pode ser realizada pela imunofluorescência direta, RT-PCR^[4] e testes imunoenzimáticos, como cELISA (ELISA de captura).

Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra o vírus influenza A podem ser realizados pelo teste da inibição da hemoaglutinação (HI). Esse teste deve ser realizado utilizando amostras de soro colhidas de forma pareada com intervalos de 21 dias. Um aumento de quatro vezes ou mais entre o título da primeira colheita e a segunda sugere uma infecção recente pelo vírus influenza A.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir infecção por PCV-2, rinite atrófica, doença de Aujeszky, pneumonia enzoótica, pasteurelose e *Haemophilus parasuis*.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O isolamento do vírus influenza A é facilitado quando são colhidas amostras clínicas de animais 24 a 48 horas após o início dos sinais clínicos, como febre e corrimento nasal seroso. Deve-se colher parênquima pulmonar, traqueia, suabes nasotraqueais ou nasofaríngeos e lavado pulmonar. O material coletado deve ser mantido sob refrigeração a 4 a 8°C. Caso o período de armazenagem ultrapassar 48 horas, as amostras devem ser congeladas a -20°C. É prudente que essas mesmas amostras clínicas sejam submetidas ao exame bacteriológico para a realização do diagnóstico diferencial ou determinação da presença de coinfeções ou infecções secundárias.

As amostras clínicas destinadas ao exame histopatológico devem incluir traqueia e tecido pulmonar (fragmentos dos lobos apicais e diafragmáticos), fragmentos de estômago, intestino, linfonodos pulmonares e mesentéricos, rim, fígado, baço, coração e alíquotas representativas do sistema nervoso central e músculo esquelético. Os materiais devem ser conservados em solução tamponada de formol a 10%. As mesmas amostras podem ser utilizadas para a realização do ensaio de imunohistoquímica.

Para a realização dos testes sorológicos devem ser colhido sangue sem anticoagulante para a obtenção de aproximadamente 3 a 5mL de soro, límpido e sem hemólise. As colheitas devem envolver animais de diferentes fases de produção e que estejam apresentando sinais clínicos sugestivos. As colheitas devem ser realizadas de forma pareada com intervalos de 21 dias.

Referências bibliográficas

1. DEE, S.A. Respiratory Disease of Pigs. In: **The Merck Veterinary Manual**. 9. ed. Pensylvania: National Publishing. p. 1228, 2005.
2. DONE, S.; IH, B. Pathogenesis of Swine Influenza. In: PROC. ALLEN D. LEMAN SWINE CONF. VET., 1994, St. Paul, EUA. **Proceedings...** St. Paul. 1994. p. 154-158.

3. HAINES, D.M.; WATERS, E.H.; CLARK, E.G. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can. J. Vet. Res.*, v. 57, p. 33-36, 1993.
4. HOFFMANN, E. et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.*, v. 146, p. 2275-2289, 2001.
5. JUNG, K.; HA, Y.; CHAE, C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *J. Comp. Pathol.*, v. 132, p. 179-184, 2005.
6. KITIKOON, P. et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 112, p. 117-1128, 2006.
7. Landolt, G.A. et al. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 1936-1941, 2003.
8. MYERS, K.P.; OLSEN, C.W.; GRAY, G.C. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, v. 44, p. 1084-1088, 2007.
9. OLSEN, C.W. et al. Swine influenza. In: STRAW B.E. et al. (Eds). *Diseases of Swine*. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 469-462, 2006.
10. THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; JANKE, B.H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Swine Influenza Virus*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 2525-2530, 2001.
11. VAN REETH, K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet. Microbiol.*, v. 74, p. 109-116, 2000.
12. ZOU, S. A practical approach to genetic screening for influenza virus variants. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 2623-2627, 1997.
13. WANG, S. et al. Hemagglutinin (HA) Proteins from H1 and H3 Serotypes of Influenza A Viruses Require Different Antigen Designs for the Induction of Optimal Protective Antibody Responses as Studied by Codon-Optimized HA DNA Vaccines. *J. Virol.*, v. 80, p. 11628-11637, 2006.
14. WEBSTER, R.; COX, N.; STOHI, K. **Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance**. World Health Organization (WHO). 2002. 67p.

2.11 Parvovirose suína

Conceito

A parvovirose suína é uma das principais causas infecciosas de transtornos reprodutivos que afeta a suinocultura moderna. O vírus da parvovirose suína foi descrito em 1967, e atualmente se encontra distribuído mundialmente, intimamente associado a falhas reprodutivas, como morte embrionária, mumificados, natimortos, retorno ao estro e leitegadas pequenas.

Etiologia e Patogênese

A parvovirose suína é causada pelo parvovírus suíno (PVSV), membro da família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae* e gênero *Parvovirus*^[4]. O PVSV é pequeno, esférico, não envelopado, com capsídeo icosaédrico que mede 18 a 26nm de diâmetro. O genoma viral é formado por uma fita simples negativa de DNA, linear, não segmentar (5kb) que congrega apenas quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes sobrepostas^[7,11].

O sequenciamento do genoma do PVSV possibilitou a identificação de duas grandes ORFs, sendo uma próximo à região terminal (5'), que codifica três proteínas não estruturais, denominadas NS-1 associada à inserção e replicação do genoma viral, NS-2 e NS-3, e outra próximo à região (3') que codifica para três proteínas do capsídeo, VP1, VP2 e VP3^[7,11,12].

As proteínas VP2 e VP3 estão associadas ao reconhecimento e à ligação a receptores da células alvo e possuem intensa propriedade antigênica e imunogênica, induzindo à formação de anticorpos neutralizantes. Apesar de terem sido identificadas variações antigênicas em amostras de PVSV, considera-se que existe somente um sorotipo de PVSV identificado em suínos. As proteínas VP2 e VP3, devido à propriedade de imunogenicidade, também são utilizadas para a produção de vacinas recombinantes^[6,11].

De maneira geral, as formas mais virulentas do PVSV multiplicam-se mais rapidamente, causando quadros clínicos graves, podendo levar à morte, inclusive fetos imunocompetentes (com mais de 70 dias)^[6,8].

O PVSV, por não ser envelopado, é muito resistente a solventes orgânicos (éter e clorofórmio) e a detergentes. Pode sobreviver no ambiente por até 4 meses, principalmente quando associado a secreções de suínos infectados. Entretanto, é sensível a pH < 3 e > 10, e a temperaturas de 60°C por duas horas, e é inativado por formalina 3% e hipoclorito de sódio (Tabela 52).

Tabela 52. Propriedades das partículas virais e características estruturais, genômicas e físico-químicas do PVSV.

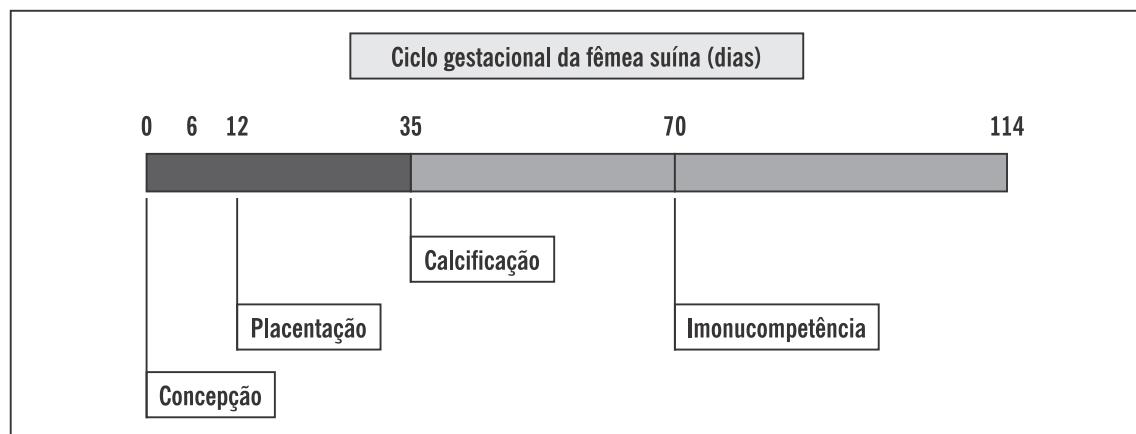
Propriedade	Características
Genoma	DNA fita simples, linear, não segmentado, 5kb
Estrutura	Tamanho da partícula viral: 16 a 20nm
Estabilidade	Temperaturas de -70 a -20°C; pH 6,8 a 8; por até 4 meses no ambiente externo
Sensibilidade	Temperatura de 60°C por 2 horas; pH < 3 e > 10
Inativantes/Desinfetantes	Dodecil sulfato de sódio, hipoclorito de sódio, formalina e iodados

A replicação viral é intranuclear. As células alvo do PVSV são células do sistema linforreticular (macrófagos, linfócitos) e células na fase S da mitose de tecidos com rápida multiplicação celular (mitose curta), medula óssea, enterócitos das criptas intestinais, células embrionárias, fetos e espermatozoides^[9]. Após a infecção, o vírus se replica primariamente nas tonsilas, na medula óssea e nas criptas intestinais e causa viremia em 2 a 5 dias após a infecção. A replicação do vírus no intestino leva à excreção de partículas virais nas fezes por longos períodos, o que contribui para a contaminação ambiental e permanência do vírus no rebanho^[7,9,10].

O período de incubação é de aproximadamente 10 a 14 dias. Em animais adultos não ocorrem sinais clínicos, entretanto nas fêmeas gestantes o vírus, associado aos monócitos/macrófagos, atravessa a barreira transplacentária e se dissemina no ambiente intrauterino, afetando os embriões e fetos^[9,10,14]. A infecção intrauterina pode ocorrer tanto na condição útero-placental quanto na condição placenta-placenta, ou mesmo de feto para feto, o que explicaria as mumificações em diferentes estágios do desenvolvimento e, consequentemente, o nascimento de leitões mumificados de diferentes tamanhos. Assim, a infecção intrauterina em diferentes fases de crescimento fetal pode levar a leitegadas desunifromes em relação ao peso e ao número de leitões. Devido à difusão lenta da infecção, é comum a presença de fetos em diferentes estágios de desenvolvimento, podendo ocorrer fetos mumificados, natimortos e normais na mesma leitegada. É importante considerar que conceptos, em diferentes estágios de desenvolvimento no interior do útero, apresentam variações significativas de sensibilidade ao PVSV. Nos fetos, a replicação viral ocorre em diferentes órgãos/tecidos, como intestino, coração, fígado, pulmão, rim, baço, timo, gônadas, cérebro, endotélios e placenta, causando necrose, hemorragias, edema e morte embrionária/fetal^[2,5].

Com relação à imunidade passiva, fetos acima de 70 dias são imunocompetentes e produzem imunidade ativa protetora mediada por linfócitos CD4+ e CD8+. Nessa fase a produção de anticorpos (IgM) também é intensa (Figura 7). Após o nascimento, os leitões recebem grande quantidade de anticorpos (IgA) anti-PVSV através do colostrum, ficando, em geral, protegidos da infecção até 3 a 7 meses de idade. Após esse período, o título tende a decair progressivamente. Em infecções pós-natais, anticorpos anti-PVSV (IgM/IgG) são detectados a partir 7 a 14 dias após a infecção, atingindo níveis máximos em uma a duas semanas após a infecção. Por se tratar de imunidade ativa, altos títulos de IgG podem persistir por meses ou até anos, entretanto, nem sempre se mantêm em títulos acima do limiar de proteção, que é descrito por alguns autores como sendo variável de 1:80 a 1:160.

Figura 7. Diferentes fases de desenvolvimento do feto em suínos.



Diagnóstico

Deve-se suspeitar de parvovirose sempre que houver sinais de transtornos reprodutivos, principalmente aumento na taxa de mumificados em nulíparas. A confirmação da suspeita clínica deve ser realizada por exames laboratoriais como sorologia do rebanho associado ao exame histopatológico ou detecção viral. Como frequentemente os fetos se encontram autolisados, torna-se importante a utilização de técnicas sorológicas para o diagnóstico do rebanho.

a) Epidemiologia

A parvovirose está amplamente disseminada nas criações de suínos do mundo. No Brasil, estima-se que a grande maioria das granjas comerciais apresente título sorológico para o PVSV. Os principais reservatórios do PVSV são os próprios suínos e roedores. A infecção do rebanho ocorre principalmente pela introdução de reprodutores infectados que eliminam o vírus através de secreções nasais e geniturinárias, sêmen, placenta, fetos abortados e fezes^[9,14].

A infecção dos animais ocorre principalmente via oronasal através de aerossóis, pelo contato direto animal-animal, por inseminação artificial, e pelo contato com secreções e excreções como sêmen, envoltórios fetais e fetos^[2,9]. As transmissões transplacentárias e intraplacentárias também são de extrema importância.

As principais portas de entrada para o vírus são a mucosa oral, respiratória e o trato reprodutivo. Os animais mais suscetíveis são fêmeas reprodutoras primíparas não imunes. À medida

que o número de partos por fêmea aumenta, o contato com amostras de vírus circulantes na granja melhora o nível de imunidade ativa, o que tende a diminuir os problemas reprodutivos.

Leitões filhos de porcas infectadas antes dos 56 dias de gestação podem tornar-se imuno-tolerantes e podem nascer infectados, tornando-se fonte de infecção potencial e persistente. A infecção de fêmeas acima de 65 a 70 dias de gestação leva ao nascimento de leitões não infectados, com imunidade contra o vírus, pois nessa fase os fetos já têm atividade imunocompetente^[6,9].

Os machos reprodutores podem infectar-se por ocasião da cobertura de fêmeas infectadas que mantêm o PVSV nas secreções vaginais. Através do sêmen, o macho reprodutor infectado durante a fase de viremia dissemina o vírus no rebanho, seja por ocasião da monta natural, seja por inseminação artificial^[7,9].

b) Sinais clínicos

O diagnóstico clínico-epidemiológico concentra-se na presença de falhas reprodutivas sem abortamentos, principalmente em fêmeas nulíparas e primíparas. A ausência de anticorpos anti-PVSV é considerada um fator de risco, pois expressa sensibilidade do rebanho.

As principais manifestações clínicas estão relacionadas com transtornos reprodutivos sem abortamentos, como morte embrionária e reabsorção, nascimento de fetos mumificados de diferentes tamanhos, e neonatos fracos ou desuniformes em uma mesma leitegada. Outras manifestações, como retorno ao estro, leitegadas pequenas, e períodos gestacionais mais longos, também são muito frequentes.

Após a infecção da fêmea gestante, o PVSV leva cerca de três semanas para ultrapassar a barreira transplacentária, e dependendo do período em que a infecção ocorre, diferentes transtornos reprodutivos podem ser clinicamente evidenciados (Tabela 53).

Tabela 53. Relação entre o momento da infecção uterina pelo parvovírus, sua ação e o efeito sobre o andamento da gestação na fêmea.

Momento da infecção	Consequências	Andamento da gestação
Da cobertura até 35 dias de gestação	Morte de todos os (ou de alguns) embriões/fetos (ocorre reabsorção)	Retorno ao cio e nascimento de leitegadas pequenas (4 a 6 leitões); pode ocorrer falsa gestação ou gestação contínua; nascimento de leitões fracos, com baixo peso ou malformados
De 35 a 65 dias de gestação	Morte de todos os (ou de alguns) fetos (fetos mumificados)	Aumento na taxa de mumificados e natimortos; gestação prolongada (124 dias); nascimento de leitões normais junto com leitões fracos e inviáveis, com baixo peso e malformados; os leitões que sobrevivem apresentam imunotolerância (infecção com menos de 56 dias de gestação) e são considerados portadores sãos
De 65 dias de gestação até o parto	Ocorre infecção dos fetos, entretanto, por serem imunocompetentes (acima de 65 a 70 dias), não se evidencia efeito sobre eles, que passam a produzir anticorpos	Nascimento de leitões normais com imunidade ativa contra parvovírus suíno; os leitões apresentam soroconversão

Quando a infecção transplacentária ocorre logo após a fecundação, e os blastocistos são infectados até 9 a 12 dias de idade, se permanecerem menos que quatro blastocistos viáveis, número mínimo para que ocorra o reconhecimento da gestação, esses blastocistos serão reabsorvi-

dos pela fêmea, que iniciará um novo ciclo estral três a quatro semanas mais tarde. Se após a infecção permanecerem viáveis mais de quatro embriões, a gestação poderá manter-se, porém terá como consequência uma leitegada pequena. Quando a morte dos fetos ocorre após o 35º dia de gestação, período em que já houve deposição de cálcio nos ossos fetais, somente os tecidos fetais moles serão reabsorvidos. Nesse caso, permanecerá o arcabouço rígido com calcificação, dando origem aos fetos mumificados^[6,7,9].

A infecção dos fetos entre 35 e 70 dias de gestação leva a: aumento na taxa de mumificados e natimortos; gestação prolongada, que pode chegar a 124 dias; nascimento de leitões normais junto com leitões fracos e inviáveis, com baixo peso ou malformados. Os leitões que sobrevivem apresentam imunotolerância e são considerados infectados de forma persistente sem interferência do sistema imune. Após 65 a 70 dias de gestação, os fetos são considerados imunocompetentes, capazes de produzir imunidade ativa, apresentam soroconversão e nascem normais sem efeito do PVS^[2,6,14]. Em machos reprodutores adultos a parvovirose é assintomática e não tem efeito sobre a qualidade do sêmen ou da libido.

c) Patologia

Nenhuma lesão macroscópica é observada no animal adulto. Eventualmente, pontos de necrose focal no útero de fêmeas reprodutoras podem ser observados. Classicamente, a evidência macroscópica é a ocorrência de fetos mumificados que, quando infectados antes dos 65 a 70 dias de gestação, podem apresentar-se edemaciados, com dilatação de vasos sanguíneos superficiais e hemorragias. Fetos imunocompetentes, infectados após 65 a 70 dias de gestação, não apresentam lesões aparentes^[1,7].

O exame histopatológico em fetos imuno incompetentes revela diferentes graus de mumificação, congestão, edema, hemorragia, infiltrado inflamatório mononuclear perivasculares, hiperplasia endotelial e, eventualmente, inclusões intranucleares^[1,2,14]. Fetos infectados acima dos 65 a 70 dias (imunocompetentes) podem apresentar infiltrado mononuclear leve e inclusões intranucleares no SNC^[9].

Em fêmeas as lesões normalmente restringem-se ao útero, no qual, ocasionalmente, pode ser observado infiltrado linfocitário perivasculares “manguito perivasculares” no miométrio e no endométrio, e infiltrado mononuclear na lâmina própria. Eventualmente, pode ser observado infiltrado linfocítico no sistema nervoso central, na medula e na coroide ocular^[7,9].

d) Diagnóstico laboratorial

Como os fetos mumificados, em geral, estão em estado avançado de autólise, uma solução para garantir a eficiência e a representatividade do diagnóstico é dar preferência às técnicas de diagnóstico indireto por meio de provas sorológicas. O estudo sorológico é uma prática usual em explorações comerciais de suínos, utilizada principalmente para o monitoramento do título de anticorpos anti-VPVS no rebanho suíno. Apesar de a maioria dos rebanhos de suínos ser sorologicamente positiva para PVS, a avaliação sorológica permite estabelecer critérios para vacinação do plantel e estudo da eficiência do programa de vacinação e da suscetibilidade do rebanho.

O ensaio de inibição de hemoaglutinação (IH), embora não permita diferenciar animais vacinados daqueles infectados naturalmente, permite fazer um monitoramento da suscetibilidade do rebanho, da atividade do vírus e da eficiência do programa vacinal. Consideram-se animais reagentes aqueles com título igual ou superior a 1:8, e positivos animais não vacinados que apresentam título sorológico superior a 1:80. No monitoramento sorológico através da inibição da hemoaglutinação, de forma prática, títulos baixos, 1:8 a 1:160, são considerados títulos vaci-

nais (rebanho vacinados), enquanto animais com títulos sorológicos altos, superiores a 1:1000, caracterizam infecção ativa pelo PVSV de campo (Tabela 54). A detecção de anticorpos no soro de leitões nascidos mortos ou vivos, mas que não ingeriram colostrum, permite um diagnóstico seguro da infecção intrauterina por PVSV. A partir do 5º dia após a infecção já é possível detectar anticorpos circulantes.

Tabela 54. Título sorológico no teste de inibição da hemoaglutinação (IH) para animais vacinados e não vacinados em diferentes fases de produção.

Animal	Título	Interpretação
Matrizes não vacinadas	Negativo	Suscetível a infecção pelo VPVS e falhas reprodutivas
Matrizes não vacinadas	$\geq 1:8$	Sororreativo
Matrizes não vacinadas	$\geq 1:80$	Positivo
Matrizes vacinadas	$\geq 1:2$ e $\leq 1:160$	Protegida contra atividade do VPVS
Matrizes (vacinadas e não vacinadas)	$\geq 1:640$	Imunidade ativa devida à infecção pelo VPVS wt (<i>vírus selvagem</i>).
Leitões	$\geq 1:4$ a < 320	Imunidade passiva protetora, entretanto decresce com o passar do tempo

Ensaios baseados na reação em cadeia da ploimerase (PCR e qPCR) podem ser usados com sucesso para detecção do agente em diferentes tecidos, como por exemplo tecidos e órgãos fetais^[3,13].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir enfermidades associadas a problemas reprodutivos de caráter infeccioso, como: PRRS, leptospirose, brucelose, doença de Aujeszky, peste suína clássica, circovirose, peste suína africana, endometrite e causas não infecciosas, como: infertilidade estacional, intoxicação com zearalenona (estrogênica), altas temperaturas ($> 32^{\circ}\text{C}$); sprays à base de cresóis, dicumarol, excesso de nitratos, deficiência de vitamina A e riboflavina. Falhas de manejo também devem ser consideradas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para os exames diretos (isolamento viral, hemoaglutinação, imunofluorescência e PCR), coletar fetos mumificados inteiros ou realizar a necropsia dos fetos e coletar órgãos como pulmão e rim dos fetos, mantidos sob refrigeração a 4 a 8°C . Amostras destinadas exclusivamente para ensaios baseados na PCR podem ser congeladas.

Rotineiramente, para o diagnóstico diferencial, incluir urina de fêmeas que abortaram ou que apresentam transtornos reprodutivos para exame microbiológico e fetos abortados/mumificados para histopatologia.

Quando objetivo é o exame histopatológico, coletar fetos abortados e mumificados, acondicionados em um frasco do tipo “boca larga” com rosca, contendo solução tamponada de formol 10%. É importante abrir as cavidades abdominal e torácica do feto para que ocorra rápida fixação de todos os órgãos e tecidos.

Para realizar o estudo sorológico do rebanho, colher amostras de sangue, sem anticoagulante, para a obtenção de aproximadamente 3 a 5mL de soro. As amostras de soro podem ser manti-

das sob refrigeração a 4 a 8°C. Se o intervalo entre a coleta e o processamento for superior a 48 horas, o soro pode ser congelado. Recomenda-se, para um diagnóstico mais consistente, realizar ao menos duas colheitas de sangue com intervalos de 21 a 30 dias e amostrar ao menos 15% das fêmeas da granja que está sendo investigada, contemplando diferentes fases de gestação. É aconselhável que os animais que estão sendo introduzidos na granja, inclusive marrãs e machos reprodutores para reposição do plantel, também sejam testados.

Referências bibliográficas

1. ALLAN, G.M. et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **J. Comp. Pathol.**, v. 121, p. 1-11, 1999.
2. BOLT, D.M. et al. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. **J. Comp. Pathol.**, v. 1172, p. 107-118, 1997.
3. CAO, S. et al. Detection of *Porcine Circovirus* type 2, porcine parvovirus and *Porcine pseudorabies virus* from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. **Veterinary Research Communications**. v. 29, p. 263-269, 2005.
4. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Taxonomy and index to virus classification and nomenclature taxonomic lists and catalogue of viruses**, 2008.
5. KENNEDY, S. et al. Reproduction of lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with *Porcine parvovirus*. **J. Comp. Path.**, v. 122, p. 9-24, 2000.
6. LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J. A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with *Porcine parvovirus*. **Viral Immunology**, v. 15, p. 373-384, 2002.
7. MENGELING, W.L. *Porcine parvovirus*. In: STRAW B.E. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 373-386, 2006.
8. ORAVAINEN, J. et al. High *Porcine parvovirus* antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 40, p. 57-61, 2005.
9. ORAVEERAKUL, K.; CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W. Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. **Archives of Virology**. v. 130, p. 377-389, 1993.
10. PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; BROWN, T.T. Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**. v. 25, p. 1003-1007, 1979.
11. SHANGJIN, C.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from *Porcine parvovirus*. **Virus Research**. v. 140, p. 209-215, 2009.
12. SOARES, R.M. et al. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 1505-1515, 2003.
13. WILHELM, S. et al. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. **Journal of Virological Methods**. v. 134, p. 257-260, 2006.
14. WOLF, V.H.G. et al. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. **Genetics and Molecular Research**. v. 7, p. 509-517, 2008.

3. PRINCIPAIS DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS SUÍNOS

3.1 Coccidiose suína

Conceito

A coccidiose suína é uma das causas mais comuns de diarreia em leitões entre 5 e 15 dias de idade, caracterizada por diarreia não hemorrágica, amarelada, aquosa e fétida, que se manifesta, em geral, na primeira ou segunda semana de vida dos leitões.

Etiologia e Patogênese

A coccidiose em suínos é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Isospora suis*, que pertence ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, gênero *Isospora*^[3]. Outros coccídios, como o gênero *Eimeria*, entre eles as espécies *E. debbieki*, *E. suis*, *E. polita*, *E. scabra*, *E. spinosa* (moderada patogenicidade), *Eimeria cerdonis*, *E. guevarai*, *E. neodebliecki*, *E. perminuta*, *E. porci*, *E. scrofae*, *E. betica* e *E. residuale* (baixa patogenicidade), também podem estar associados a transtornos entéricos em leitões entre 1 e 3 meses de idade^[3,7]. *Cryptosporidium parvum*, apesar de possuir pouca expressão clínica, também pode estar envolvido em alguns casos clínicos de coccidiose^[3].

No caso de infecção por *I. suis*, os leitões ingerem os oocistos esporulados presentes em superfícies contaminadas (instalações e úbere das porcas). Sob condições adequadas de umidade e temperatura os oocistos podem permanecer no ambiente por períodos de até 10 anos. As porcas não mantêm nem multiplicam a população de parasitos, não desempenhando papel epidemiológico no processo de transmissão^[4,9,12].

As etapas de desenvolvimento do agente compõem uma fase no ambiente (ciclo exógeno) e uma fase do ciclo no animal (ciclo endógeno).

Ciclo do *I. suis*

O ciclo de vida pode ser dividido em três fases conforme descrito por estudo prévios^[2,3,5,9,10,12]:

Fase de esporogonia (esporulação): fase exógena do ciclo pelo qual o oocisto passa de um estágio não esporulado, não infeccioso, para um estágio infectante ou esporulado. Os oocistos sob temperatura de 20 a 37°C rapidamente esporulam em aproximadamente 12 horas. A forma esporulada é resistente a fatores químico-físicos e biológicos e à maioria dos desinfetantes utilizados nos programas tradicionais de limpeza e desinfecção. Nessa fase, o oocisto esporulado, diferentemente dos outros coccídios, apresenta dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um.

Fase de excistação: ocorre imediatamente após os oocistos infectantes serem ingeridos pelo leitão. Durante a passagem dos oocistos pelo trato digestório, enzimas digestivas e sais biliares atuam sobre a parede do oocisto ativando os esporozoítos que são liberados no lúmen intestinal. Os esporozoítos ativos penetram nos enterócitos dando início à multiplicação do parasita no trato gastrointestinal do leitão (fase endógena).

Fase endógena (multiplicação parasitária): Nessa fase, o parasita se multiplica nos enterócitos, principalmente na região do jejuno e do íleo. No interior dos enterócitos os esporozoítos se dividem por endodiogenia e dão origem aos merontes (ciclo de multiplicação assexuada, ou merogonia). Os merontes crescem, formam merontes binucleados (geração esquizogônica tipo I) que rompem a célula epitelial e liberam merozoítos móveis. Estes invadem outras células epiteliais e produzem duas gerações de merontes multinucleados (geração esquizogônica tipo II), os quais, em 2 a 3 dias, dão lugar a 2 a 16 merozoítos de primeira geração e 4 a 16 merozoítos de segunda geração. Os merozoítos de segunda geração penetram nos enterócitos e se diferenciam sexualmente, produzindo um estágio sexual. O merozoíto masculino, microgameta, após

uma multiplicação mitótica, evolui para um microgameta biflagelado; ao mesmo tempo; o gameta feminino se diferencia em macrogameta. Os microgametas invadem os enterócitos infectados por macrogametas, fecundam-no, e dão origem a um zigoto (gametogonia), os oocistos. Estes, ao romper o enterócito, alcançam a luz intestinal e são liberados nas fezes, em maior intensidade do 5º até o 7º dia, podendo estender-se até o 9º dia após a infecção (Figura 8). Pode ocorrer nova fase de eliminação 11 a 14 dias após a infecção. O ciclo endógeno do *Isospora suis* leva de 5 a 8 dias, entretanto o período pré-patente é de 5 dias.

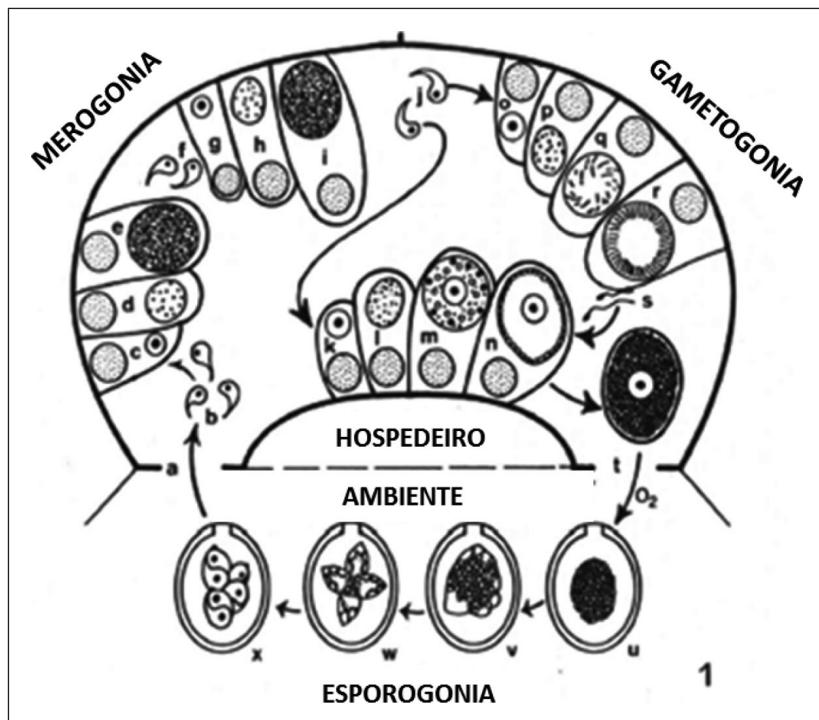


Figura 8. Ciclo da coccidiose no hospedeiro suíno e no ambiente.

A gravidade da forma clínica depende da quantidade de oocistos ingeridos e da idade do leitão. A ingestão de apenas 100 oocistos já pode dar origem à doença clínica^[10,12]. A fase endógena se desenvolve no interior do citoplasma de enterócitos, principalmente dos segmentos do jejunum e do íleo. Em condições de infecção maciça podem estar envolvidos o ceco e o cólon. A proliferação e o desenvolvimento do estágio endógeno ocorrem normalmente na porção distal das vilosidades, a partir da adesão e formação do vacúolo parasítóforo próximo ao núcleo da célula hospedeira. Eventualmente, em infecções severas, também pode localizar-se nas criptas ou regiões adjacentes^[2,5]. A multiplicação desse parasita determina a destruição e a descamação dos enterócitos da extremidade das vilosidades ou das regiões mais profundas, dependendo da gravidade da infecção. A erosão dos enterócitos provoca um quadro de diarreia por má absorção, com a perda da capacidade de absorção de nutrientes e de água, desencadeando desidratação, perda de eletrólitos e consequente diarreia. De forma bastante precoce, podem ser observados oocistos nas fezes dos leitões 3 a 5 dias após a infecção^[6,9].

Diagnóstico

O diagnóstico da coccidiose deve ser baseado em sinais clínico-epidemiológicos, presença de formas endógenas do parasita em esfregaços da mucosa e cortes histológicos, presença de oo-

cistos em amostras de fezes, e histórico de diarreia em leitões entre 5 e 15 dias de idade que não respondem ao tratamento com antibacterianos.

a) Epidemiologia

As fezes das porcas lactantes podem ser fonte de infecção para os leilões na maternidade. Entretanto, fundamentalmente, são as fezes de leitões infectados, de lotes anteriores, que contaminam o ambiente. Essa condição aumenta a carga de oocistos nas salas de maternidade, o que parece ser o principal fator de contaminação das leitegadas^[2,4,5].

A capacidade do *I. suis* de sobreviver por meses no meio ambiente está associada a programas de limpeza e desinfecção deficientes, condições de instalações que não permitem adequada remoção de matéria orgânica e ausência de vazio sanitário^[4,9].

A infecção ocorre pela ingestão de água, fezes ou detritos de lotes anteriores contaminados com oocistos. A maior incidência e gravidade dos casos tendem a concentrar-se nos períodos mais quentes e úmidos do ano, visto que temperaturas preferencialmente entre 32 e 35°C facilitam a esporulação^[10,12]. A transmissão pode envolver também moscas e outros insetos, circulação de pessoa e compartilhamento de utensílios utilizados entre lotes.

O período pré-patente varia de 5 a 8 dias. Em granjas com falhas no programa de limpeza e desinfecção das instalações e com histórico da doença, a taxa de morbidade pode chegar a 100%. A taxa de mortalidade, em geral, varia de 20-40%, podendo ser mais elevada se agentes secundários estiverem associados^[5,8,12].

b) Sinais clínicos

Aparentemente a doença clínica é dependente da dose infectante (carga parasitária) e da idade do animal. Estima-se que apenas 100 oocistos esporulados podem determinar uma forma severa da doença. Em contrapartida, quanto mais jovens os leitões, mais suscetíveis eles são e mais severo é o quadro clínico^[1,5,11]. Devido às lesões de perda de epitélio intestinal, ocorre manifestação de diarreia amarelo-clara, pastosa a aquosa, de odor fétido (rancoso ou azedo) e, eventualmente, com coágulos branco-amarelados nas fezes mais aquosas^[2,4]. Os animais apresentam apatia, cerdas arrepiadas, diminuição no crescimento em torno de 15%, perda de apetite e desuniformidade. O quadro diarréico persiste por 5 a 8 dias, não havendo resposta a tratamento utilizando antibacterianos^[4,12]. A doença é mais frequente nos meses quentes e úmidos, que favorecem a esporulação dos oocistos.

c) Patologia

Aparentemente, a idade do leitão e a quantidade de oocistos ingeridos determinam o grau de lesões morfológicas. Atualmente, essa é a explicação mais provável para as variações de sinais clínicos e as diferenças de desenvolvimento dentro de uma leitegada.

As lesões são concentradas no intestino delgado dos leitões. Na necropsia é possível observar hiperemia, enterite catarral e, nos quadros de maior gravidade, formação de pseudomembranas fibrinonecróticas amareladas, localizadas basicamente no jejun e no íleo e, eventualmente, no duodeno, no ceco e no cólon^[5,12]. O conteúdo intestinal apresenta-se cremoso a aquoso. No exame histopatológico, observa-se necrose, atrofia, encurtamento e fusão das vilosidades, necrose focal no topo das vilosidades, metaplasia epitelial (epitélio cilíndrico a cúbico) e hiperplasia do epitélio das criptas^[1,5,10,12]. Na maioria dos casos observa-se, concomitantemente, a presença de formas endógenas de coccídeos em diferentes estágios evolutivos nos enterócitos^[2,3,11]. Edema e congestão da lâmina própria, submucosa e tecido linfoide associado à mucosa (GALTs) também podem estar presentes.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo pode ser obtido através do exame histopatológico para a demonstração de formas endógenas do parasita no interior dos enterócitos e lesões microscópicas compatíveis. Esfregaços da mucosa também permitem identificar formas endógenas e merozoítos, principalmente no jejuno e no íleo.

O estudo coprológico permite avaliar a carga parasitária/g de material fecal, todavia possui valor limitado no diagnóstico da doença, pois as lesões causadas na mucosa intestinal e consequente diarreia ocorrem antes da presença dos oocistos nas fezes. Além disso, em infecções intensas, formas assexuadas podem causar uma grande destruição da mucosa intestinal, impedindo a progressão do ciclo evolutivo ou os leitões podem morrer antes do aparecimento dos oocistos nas fezes.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir doenças que cursam com quadro de enterite, devendo ser considerados os quadros de infecções causadas por *E. coli*, clostridioses enterotoxigênicas, PCV-2 e infestação por endoparasitos^[2,10,12].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O exame histopatológico é o exame de eleição para o diagnóstico de coccidiose em suínos, haja vista a simples presença do agente não assegura sua participação no quadro clínico. Sendo assim, o diagnóstico definitivo é conseguido com a realização do exame histopatológico associado ao exame coprológico.

A amostra clínica destinada à histopatologia deve contemplar obrigatoriamente diferentes segmentos intestinais (jejuno, íleo, ceco e cólon espiral), preferencialmente com lesões macroscópicas sugestivas. As amostras clínicas devem ser fixadas em solução tamponada de formol a 10%. Para fundamentar o diagnóstico diferencial, os diferentes órgãos/tecidos devem ser amostrados e submetidos ao exame.

Para o exame coprológico, colher aproximadamente 25g de fezes diretamente do reto de leitões com diarreia, procurando amostrar o máximo de leitões possível, na faixa etária entre 5 e 21 dias de idade. As fezes devem ser armazenadas em sacos plásticos limpos sob condições de refrigeração a 4-8°C.

Com o intuito de assegurar o diagnóstico diferencial para as doenças bacterianas, é prudente realizar o exame bacteriológico do conteúdo entérico. Para obter de forma correta os diferentes segmentos intestinais, seja para realização do esfregaço de mucosa, seja para exame microbiológico, é recomendado fazer ligaduras duplas, mantendo o conteúdo em um compartimento fechado (alça ou “bolsa”) e realizar a incisão entre elas, evitando o extravasamento do conteúdo. Todas as amostras clínicas destinadas ao isolamento bacteriológico devem ser mantidas permanentemente sob refrigeração, a uma temperatura de 4 a 8°C, desde a colheita até o processamento laboratorial. O material não deve ser congelado.

Referências bibliográficas

1. GREIF, G. Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. **Parasitology Research**, v. 86, n. 10, p. 787-790, 2000.
2. LINDSAY, D.S. Biology of *Isospora* spp. from humans, non human primates, and domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 10, n. 1, p. 19-34, 1997.
3. LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. Biology of mammalian Isospora. **Parasitol. Today**, n. 10, p. 214-219, 1994.

4. MARTINEAU, G.P.; CASTILLO, J. Epidemiological, clinical and control investigations on field porcine coccidiosis: clinical, epidemiological and parasitological paradigms. **Parasitology Research**, v. 86, n. 10, p. 834-837, 2000.
5. MUNDT, H.C. et al. *Isospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. **Parasitology Research**. v. 98, n. 2, p. 167-175, 2006.
6. SANTOS, N.M.; LOPES, C.W.G. Morfologia dos oocistos das espécies da família *Eimeriidae Minchin*, 1903 (Protozoa: Apicomplexa) Parasitos de Suínos. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 41-44, 1988.
7. SARTOR, A.A. et al. Prevalência das espécies de *Eimeria Schneider*, 1875 e *Isospora Schneider*, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de suínos do município de Videira, SC, Brasil. **Rev. C. Agrovet.**, v. 6, n. 1, p. 38-43, 2007.
8. SAYD, S.M.O.; KAWAZOE, U. Prevalence of porcine neonatal isosporosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 169-174, 1996.
9. SOTIRAKI, S. et al. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling piglets under on-farm conditions. **Parasitology**. v. 135, p. 395-405, 2008.
10. Stuart, B.P. et al. Coccidiosis in swine: dose and age response to *Isospora suis*. **Can. J. Comp. Med.**, v. 46, p. 317-320, 1982.
11. WORLICZEK, H.L. Changes in lymphocyte populations in suckling piglets during primary infections with *Isospora suis*. **Parasite Immunology**. v. 32, n.4, p. 232-244, 2010.
12. WORLICZEK, H.L. et al. Porcine isosporosis: Infection dynamics, pathophysiology and immunology of experimental infections. **Wiener klinische Wochenschrift**. v. 119, p. 33-39, 2007.

3.2 Triquinose

Conceito

A triquinose é uma zoonose com ampla distribuição mundial causada por parasitos do gênero *Trichinella* spp., nematódeos intracelulares (larvas L1) capazes de infectar fibras musculares de carnívoros e onívoros de sangue quente. Em suínos e humanos a espécie prevalente é *T. spiralis*. Apesar de não haver registros da doença no Brasil, nem em animais nem em humanos, é um problema sanitário importante em outros países da América do Sul, como Uruguai, Bolívia, Argentina e Paraguai, onde a doença é endêmica e representa um risco iminente para nosso país.

Etiologia e Patogênese

O gênero *Trichinella* sp. pertence ao filo *Nemathelminthes*, ordem *Enoplida*, superfamília *Trichinelloidea*, família *Trichinellidae*, e compreende o grupo de nematelmintos que atingem os tecidos e não propriamente o tubo gastrointestinal. Os nematódeos desse gênero, também chamados de vermes cilíndricos, são considerados o grupo de metazoários mais abundante na biosfera^[1,12].

São reconhecidas oito espécies de *Trichinella* spp. (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* e *T. zimbabwensis*). Todas as espécies causam doenças em humanos. A espécie *T. spiralis* tem distribuição mundial, principalmente em países de clima temperado, sendo a espécie mais frequentemente associada aos suínos domésticos. Os adultos dessa espécie, macho e fêmea, medem aproximadamente 2mm e 5mm de comprimento respectivamente. Já as larvas encistadas medem em torno de 1mm^[4,11].

O ciclo de vida do parasito é direto. As fêmeas são ovovivíparas e vivem aderidas à lâmina própria no intestino delgado, onde depositam as larvas de primeiro estágio (L1). Uma fêmea põe de 1.000 a 10.000 larvas em um ciclo de vida. As larvas atingem a corrente linfática e alcançam a circulação venosa/arterial. Em 8 a 25 dias as larvas se estabelecem, preferencialmente, nos músculos estriados (mais frequentemente no diafragma, na língua e nos masseteres). Em 15 a 21 dias as larvas se encistam e tornam-se infectantes^[5,12]. A ingestão de tecido com as larvas encistadas transmite o agente a outro hospedeiro. As formas adultas do parasito no intestino morrem ou são eliminadas.

Diagnóstico

Em face da importância para a saúde pública, tem sido cada vez mais presente a preocupação das autoridades dos países importadores de carne suína quanto à inspeção e ao monitoramento para a presença de larvas de *T. spiralis* como requisito para a compra ou importação.

a) Epidemiologia

Os suínos domésticos constituem o reservatório principal do parasito. Os suínos podem infectar-se pelo consumo de produtos de origem animal contaminados com o parasita, pela exposição a roedores ou outros animais infectados, ou por canibalismo envolvendo animais infectados^[12].

A importância da infecção por *Triquinella* spp. em animais destinados à produção de carne está relacionada ao risco de transmissão do agente e consequente desenvolvimento da doença em humanos que consomem a carne crua ou mal cozida. Além disso, subprodutos de origem animal, como salames, linguiça e bacon, elaborados com carne suína contaminada também podem ser considerados veículos na transmissão^[1,5].

b) Sinais clínicos

Devido à inexistência de registros de diagnóstico da infecção em suínos vivos, é sugerido apenas quadro de enterite devido à presença do agente no jejuno e no íleo^[5,12].

c) Patologia

Na patologia pode-se observar, eventualmente, enterite transitória, principalmente envolvendo jejuno e íleo, e separação das fibras musculares com a formação de cistos com o parasita envoltos pelo sarcolema ou mesmo cistos calcificados^[7,12].

d) Diagnóstico laboratorial

Os métodos empregados para detectar a infecção por *Trichinella* spp. em suínos são baseados em dois grupos: a) exame direto para a detecção do parasito em amostras de tecido submetido a digestão; e, b) exame indireto por exames sorológicos para a detecção de anticorpos contra *Trichinella* spp. no sangue ou nas amostras de fluido tecidual.

A prova de digestão artificial (DA) é o método direto oficial utilizado para detecção e controle de *T. spiralis* em matadouros universalmente aceito^[12]. Segundo a International Commission on Trichinellosis (ICT), o teste é capaz de detectar a presença de larvas 17 a 21 dias após a infecção, sendo a sensibilidade do teste diretamente proporcional à quantidade de tecidos avaliada e ao local de obtenção da amostra. Nesse teste ocorre a digestão artificial das células musculares, possibilitando a observação das larvas de primeiro ciclo (L1) com aproximadamente 1mm de comprimento e 0,03mm de diâmetro. A característica mais marcante das larvas de *Trichinella spiralis* é o esquistossoma, formado por células discoides dispostas ao longo do esôfago e ocupam a me-

tade anterior do corpo da larva. As larvas podem apresentar-se enroladas (em baixa temperatura), móveis (temperatura ambiente) e em forma de meia lua (larvas mortas). Em caso de dúvida, as larvas devem ser visualizadas em maior aumento e devem ser avaliadas mais amostras de tecidos da carcaça estudada^[1,3].

Outro método direto alternativamente aceito é a separação por funil, que envolve, inicialmente, um processo de digestão seguido de passagem em funil (177 a 180µm) para separação e sedimentação das larvas e posterior identificação em placas de petri^[3,6].

Ensaios moleculares baseados na PCR são uma alternativa que permite identificar sequências específicas do DNA do parasita na musculatura do animal infectado. Entretanto, essa técnica, até o momento, oferece pouca praticidade para a rotina de avaliação em abatedouros^[8,9].

Com relação ao diagnóstico indireto, o único teste imunológico aceito pelo ICT e pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) é o teste de ELISA, com alta sensibilidade, é capaz de detectar anticorpos associados a baixa taxa infecção (1 larva/100g de tecido), oferecendo alto índice de sensibilidade^[2,10]. Esse método é muito eficiente para identificar infecção e transmissão de *Trichinella* sp. em granjas de suínos ou programas de controle. Esse teste não é recomendado para o diagnóstico individual em carcaças, visto que a soroconversão só ocorre três a cinco semanas após a exposição, não devendo esse método ser utilizado em substituição aos métodos diretos atualmente empregados para exame de carcaças de animais abatidos destinados ao consumo.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir outros endoparasitas que atingem os tecidos, e não propriamente o trato digestivo.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para os testes diretos, usualmente são coletados os pilares diafragmáticos, a língua e os músculos masseteres. O tamanho da amostra pode variar, sendo indicadas amostras individuais de 100g de um único animal ou um *pool* de 100g envolvendo vários animais. O ICT recomenda, no mínimo, 5g de tecido muscular/carcaça para a realização do *pool*. É importante frisar que a sensibilidade do teste é diretamente proporcional à amostragem (número de músculos e quantidade amostrada). As amostras devem ser acondicionadas em sacos plásticos de forma individualizada e devidamente identificadas. Quando não for possível o processamento laboratorial imediatamente após a coleta, estas podem ser conservadas sob refrigeração a 4 a 8°C.

O uso do teste de ELISA detecta a presença de anticorpos específicos para o parasito. O teste pode ser realizado a partir do soro ou plasma coletado de animais vivos ou após o abate ou a necropsia. Nesse caso, enviar ao laboratório de diagnóstico veterinário aproximadamente 3 a 5ml de soro ou plasma.

Referências bibliográficas

1. EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) N. 2075. **Off. J. European Union**, v. 338, p. 60-82, 2005.
2. FORBES, L.B.; APPLEYARD, G.D.; GADJADHAR, A.A. Comparison of synthetic tyvelose antigen with excretory-secretory antigen for the detection of trichinellosis in swine using enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Parasitol.**, v. 90, p. 835-840, 2004.
3. FORBES, L.B.; GAJADHAR, A. A. A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. **J. Food Prot.**, v. 62, p. 1308-1313, 1999.

4. FORBES, L.B.; PARKER S.; SCANDRETT, W.B. Comparison of a modified digestion assay with trichinoscopy for the detection of *Trichinella larvae* in pork. **J. Food Prot.**, n. 66, p. 1043-1046, 2003.
5. GAJADHAR, A.A.; SCANDRETT, W.B.; FORBES, L.B. Overview of food and water-borne zoonotic parasites at the farm level. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 25, n. 2, p. 595-606, 2006.
6. GAMBLE, H.R. Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 295-298, 1996.
7. GAMBLE, H.R.; PATRASCU, I.V. Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. **J. Food Prot.**, v. 59, p. 1213-1217, 1996.
8. NOCKLER, K. et al. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. **Vet. Parasitol.**, v. 132, p. 85-90, 2005.
9. POZIO, E.; LA ROSA, G. PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. **Methods Mol. Biol.**, v. 216, p. 299-309, 2003.
10. POZIO, E. et al. Evaluation of ELISA and Western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. **Vet. Parasitol.**, v. 108, p. 163-178, 2002.
11. POZIO, E.; ZARLENGA, D.S. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1191-1204, 2005.
12. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

3.3 Cisticercose

Conceito

A cisticercose suína faz parte do complexo teníase-cisticercose, uma ciclozoonose com distribuição mundial, principalmente em países da América Latina, África subsaariana e Ásia. A alta prevalência da enfermidade nos países em desenvolvimento está associada às deficientes condições higiênico-sanitárias e socioculturais da população. No caso dos suínos, a doença está associada às formas larvais, ou cisticercos, da *Taenia solium* ou *Cysticercus cellulosae* (sem caracterização taxonômica). No Brasil a infecção é considerada extinta das produções comerciais de suínos, ficando restrita em algumas áreas com criação de suínos para subsistência.

Etiologia e Patogênese

Os membros do gênero *Taenia* spp. pertencem à classe *Cestoda*, ordem *Cyclophyllidea* e família *Taenidae*. São platelmintos grandes, compostos por escólex, colo e estróbilo constituído por proglótides. *Taenia solium* é responsável pela teníase ou cisticercose/neurocisticercose no homem e cisticercose em suínos. Eventualmente, pode estar envolvida a espécie *Taenia hydatigena* (*Cysticercus taenuicollis*)^[3,16].

A espécie *T. solium* é um helminto achatado, em forma de fita, menor que a *T. saginata*, que mede, normalmente, 3 a 5 metros de comprimento, podendo atingir 8 a 9 metros. O escólex (cabeça) tem 4 ventosas e rostro armado com dupla coroa de ganchos, onde o número e tamanho dos ganchos pode ajudar a diferenciar as diferentes espécies de *Taenia* spp.^[5,16]. Os metacestódeos (cisticercos) podem apresentar-se nos músculos e sistema nervoso central dos suínos (cisticercose suína) ou no tecido subcutâneo, na base ocular e no sistema nervoso central do homem (neurocisticercose)^[1,4,5].

Os ovos da espécie *T. solium* não podem ser diferenciados das outras espécies de *Taenia* ssp. e *Echinococcus*. Medem aproximadamente 30 a 45µm de diâmetro, com uma oncosfera (embrião hexacanto) com: três pares de ganchos, um embrióforo marrom, grosso e radialmente estriado, e uma capa membranosa oval (casca) ausente nos ovos fecais^[1,3,13].

Diagnóstico

A cisticercose é uma ciclozoonose com distribuição cosmopolita e de muita importância para a saúde pública. O diagnóstico da enfermidade nos suínos baseia-se na identificação da presença dos cisticercos, na caracterização posterior à necropsia, durante a inspeção nos animais por ocasião do abate ou necropsia^[1,6,15].

a) Epidemiologia

Considerando o ciclo do parasito e hospedeiro, há três fases: (i) adulto no hospedeiro definitivo (fase adulta do parasito), (ii) ovos no ambiente (fase de vida livre) e (iii) cisticercos (fase larval) no suíno (hospedeiro intermediário).

O homem pode desenvolver tanto o quadro de teníase quanto de cisticercose. Por ser o único hospedeiro definitivo da *Taenia solium*, o homem abriga, em geral, apenas um único parasito (adulto) no intestino delgado, desenvolvendo o quadro de teníase, decorrente da ingestão de cisticercos^[4,5]. Entretanto, o homem também pode tornar-se hospedeiro intermediário e desenvolver o quadro de cisticercose/neurocisticercose a partir da ingestão de ovos do parasito^[3].

Teníase: o homem, ao ingerir cisticercos presentes na carne crua, mal cozida, sem processamento, fica propenso a desenvolver o quadro de teníase^[5,16]. Durante a digestão, os cisticercos são liberados e, sob a ação dos sais biliares, ocorre a desenvaginação do escólex seguida da fixação na parede do intestino delgado, em geral, de um único parasito. Em um período de 60 a 70 dias ocorre o início da eliminação, nas fezes, de proglotes grávidas, repletas de ovos infectantes. A permanência de um único parasito deve-se, possivelmente, à atuação de fatores imunes^[3,10].

Cisticercose: o homem pode desenvolver a cisticercose pela ingestão de proglotes ou ovos do parasito presentes em vegetais (verduras/saladas), maus hábitos de higiene, retroperistaltismo ou incubação interna dos ovos^[3,5,10]. Em um período de 1 a 3 dias após a ingestão dos ovos ocorre a liberação das oncosferas, e as larvas alcançam a circulação sanguínea localizando-se nos mais diversos tecidos, o que categoriza a cisticercose de acordo com a localização dos cisticercos: neurocisticercose, sistema nervoso central, com localização espinhal e cerebral; oftalmocisticercose, nos olhos e na órbita; e disseminada (com localização nas vísceras, na pele e nos músculos)^[4,9,10]. Por ser uma doença de caráter crônico, o período de incubação pode variar de meses a anos, sendo mais comum 5 a 9 anos^[10].

Os suínos são considerados hospedeiros intermediários e desenvolvem o quadro de cisticercose a partir da ingestão de fezes humanas ou substratos (água e alimento) contaminados por essas fezes, contendo as proglotes grávidas ou ovos do parasito^[11]. A infecção do suíno é facilitada pelo hábito coprofágico dos suínos e pela viabilidade dos ovos do parasito no meio ambiente, que predispõem suínos criados sob condições de “fundo de quintal” a desenvolver a infecção^[7,11]. Após a ingestão dos ovos, em 1 a 3 dias ocorre a liberação das larvas, que alcançam a circulação sanguínea e localizam-se no tecido muscular, onde são envolvidas por uma cápsula de tecido fibroso (adventícia) formando o cisticerco^[5,10,14].

b) Sinais clínicos

Em geral, os suínos infectados não manifestam sinais clínicos evidentes. É possível que animais intensamente infectados se movimentem menos ou mais lentamente, sejam menos ativos,

e apresentem dificuldades de mastigação e deglutição devido ao comprometimento da musculatura pela presença dos cisticercos^[7,11,12].

c) Patologia

Apesar de ser um procedimento violento e traumático para os suínos e desgastante para o Médico Veterinário, a inspeção da língua por palpação, principalmente em sua parte ventral, continua sendo o principal método para diagnóstico em campo de cisticercose em animais vivos^[15,16].

Considerando a inspeção da carcaça, a presença de cisticercos é identificada pela visualização de pequenos cistos (1mm) a partir do corte do órgão no laboratório. Os cistos podem ser observados duas semanas após a infecção, sendo mais claramente identificados em seis semanas, quando se apresentam de forma oval, como pequenas vesículas arredondadas, visíveis como um ponto branco. Apesar de ser possível encontrar cistos em qualquer músculo do corpo do animal, os sítios preferenciais de localização e que devem ser obrigatoriamente inspecionados são coração, língua, masseteres, pilares do diafragma, paleta e coxa, possivelmente porque esses sítios recebem maior aporte sanguíneo^[5,11,15]. Na infecção por *Taenia hydatigena*, os cisticercos podem apresentar-se, com frequência, aderidos ao peritônio^[13,16].

d) Diagnóstico laboratorial

As formas adultas são reconhecidas no exame *post mortem* ou por ocasião da abertura das vísceras (Tabela 55). Testes baseados na PCR e de imuno-histoquímica a partir de tecidos a fresco de cortes histológicos, respectivamente, também possibilitam um diagnóstico bastante seguro, inclusive podem ser utilizados no diagnóstico diferencial. Entretanto, esses métodos não são utilizados rotineiramente^[2,8,14].

Tabela 55. Características consideradas na identificação do escólex e segmentos das diferentes espécies de *Taenia* spp.

Espécie parasita	Número de ganchos (acúleos)	Tamanho dos acúleos (μm)		Número de anéis	Escólex	Proglotes (Número de ramas uterinas)	<i>Cysticercus</i>
		Acúleos grandes	Acúleos pequenos				
<i>T. hydatigena</i>	28 a 36	191 a 218	118 a 143	600 a 700	—	6 a 10, que se subdividem	—
<i>T. ovis</i>	30 a 34	170 a 191	111 a 127	350 a 750	—	11 a 20, que se subdividem	—
<i>T. multiceps</i>	22 a 30	157 a 177	98 a 136	284 a 388	—	14 a 20, que se subdividem	—
<i>T. saginata</i>	Não possui rostelo	—	—	765 a 1200	Não possui rostelo nem acúleos. Possui formato quadrangular	14 a 32, que se subdividem	<i>C. bovis</i>
<i>T. solium</i>	22 a 36	139 a 200	93 a 159	375 a 575	Possui rostelo e dupla fita de acúleos. Possui formato globular	7 a 16, que se subdividem	<i>C. cellulosae</i>
<i>T. asiatica</i>	Alguns com rostelo	—	—	868 a 904	—	12 a 32, que se subdividem	

Os metacestódeos, ou cisticercos, são claramente visíveis no exame *post mortem* por ocasião da inspeção da carcaça. Entretanto, são frequentes os casos envolvendo infecções leves que passam despercebidas. Esses “parasitos vesiculares” estão contidos individualmente em uma rede cística na interface parasito-hospedeiro compreendendo o cisticerco, ou cenuro.

Até o momento, não se utilizam provas sorológicas para detecção de anticorpos específicos no soro, a fim de diagnosticar cisticercose em animais, exceto com caráter epidemiológico. No entanto, o diagnóstico definitivo é obtido a partir da inspeção dos músculos ou tecidos.

e) Diagnóstico diferencial

No caso de teníase, devem ser consideradas as características das diferentes espécies de tênia para diferenciação entre elas. No caso de cisticercose, deve-se caracterizar o “parasito vesicular”^[5,16].

Coleta e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os parasitos adultos, ou proglotes, devem ser coletados e conservados em solução de álcool 70% para a classificação. Quando o objetivo é o exame histopatológico, os tecidos sugestivos da presença de metacestódeos devem ser conservados em solução tamponada de formol a 10%, devidamente identificados, para avaliação histológica e caracterização do “parasito vesicular”.

Para exame sorológico, coletar sangue sem anticoagulante para a obtenção de 3-5mL de soro límpido refrigerado a 4 a 8°C, ou mesmo congelado a -20°C.

Referências bibliográficas

1. ABUSEIR, S. et al. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal? **Parasitol. Res.**, v. 99, p. 405-409, 2006.
2. Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 352-356, 1996.
3. DEL BRUTTO, O.H. et al. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, v. 57, p. 177-183, 2001.
4. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. The Cysticercosis Working Group in Peru. **Am. J. Epidemiol.**, v. 135, p. 875-882, 1992.
5. DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Detection and diagnosis. In: WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis. Paris: OIE, p. 45-55, 2005.
6. FATZER, R.; VANDEVELDE, M.; GOTTSSTEIN, B. Cerebral *Taeniidae* oncospherical lesions in two BSE suspects. **Vet. Rec.**, v. 150, p. 46-47, 2002.
7. GONZALEZ, A.E. et al. Secondary transmission in porcine cysticercosis: description and their potential implications for control sustainability. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, p. 501-503, 2005.
8. GONZALEZ, L.M. et al. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica* taeniasis through PCR. **Diagn. Microbial. Infect. Dis.**, v. 49, p. 183-188, 2004.
9. LESCANO, A.G. et al. *Taenia solium* Cysticercosis Hotspots Surrounding Tapeworm Carriers: Clustering on Human Seroprevalence but Not on Seizures. **PLoS - Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, 2009.
10. Swine cysticercosis hotspots surrounding *Taenia solium* tapeworm carriers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 376-383, 2007.

11. LLOYD, S. Cysticercosis and taeniosis *Taenia saginata*, *Taenia solium* and Asian Taenia. In: PALMER, S.R.; LORD-SOULSBY, E.J.L.; SIMPSON, D.I.H. (Eds.). **Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control**. Oxford: Oxford University Press, p. 635-649, 1998.
12. LLOYD, S. Other cestode infections. Hymenolepisis, diphyllobothriosis, coenurosis, and other adult and larval cestodes. In: PALMER, S.R.; LORD-SOULSBY, E.J.L.; SIMPSON, D.I.H. (Eds.). **Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control**. Oxford: Oxford University Press, p. 635-649, 1998.
13. OGUNREMI, O. et al. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis by immunohistochemical test on formalin-fixed and paraffin-embedded bovine lesions. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 16, p. 438-444, 2004.
14. WANZALA, W. et al. Control of *Taenia saginata* by post-mortem examination of carcasses. **Afr. Health Sci.**, v. 3, n. 2, p. 68-76, 2003.
15. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

3.4 Toxoplasmose

Conceito

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição mundial com grande impacto na saúde pública. Em suínos a doença normalmente cursa com caráter subclínico, associada a infecções congênitas, abortamentos, fetos mumificados e leitões natimortos. Eventualmente, pode causar necrose hepática, meningoencefalite, coriorretinite, miocardite, linfoadenopatia e miosite.

Etiologia e Patogênese

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao Filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa* e família *Sarcocystidae*^[3]. O ciclo de vida do parasito é facultativamente heteróxeno. Possui como hospedeiro definitivo os felídeos, nos quais desenvolve uma fase sexuada do ciclo, e como hospedeiros intermediários outras espécies de mamíferos e aves, nos quais desenvolve a fase assexuada^[2].

(i) **Ciclo de vida do *T. gondii*:** O parasito faz um ciclo de reprodução assexuada em todas as espécies. O cisto tecidual ou a parede do oocisto é dissolvido durante a digestão, liberando bradizoítos e esporozoítos, que entram na lâmina própria do intestino delgado e começam a se multiplicar como taquizoítos. Os taquizoítos podem disseminar-se para os diferentes tecidos em poucas horas após a infecção através da corrente sanguínea ou linfática. Podem entrar em quase qualquer célula e multiplicar-se. O hospedeiro desenvolve imunidade humoral ao parasito cerca de três semanas após a infecção; a partir dessa fase os taquizoítos começam a desaparecer do tecido visceral e dão origem aos bradizoítos, os cistos teciduais. Esses cistos são encontrados no cérebro e, mais frequentemente, nos músculos esqueléticos e do miocárdio. Eles geralmente não causam reação inflamatória e podem persistir por toda a vida.

(ii) **Hospedeiro definitivo:** os felídeos são considerados hospedeiros definitivos, visto que neles os parasitas desenvolvem um ciclo de replicação sexuada e um ciclo assexuado. Os felídeos se infectam pela ingestão de cistos presentes na carne crua, mal cozida ou deficientemente processada de hospedeiros intermediários (suínos, ratos, coelhos) infectados, pela ingestão de oocistos esporulados ou pela via transplacentária (transmissão vertical)^[5].

Em felídeos o período de incubação é semelhante ao período em humano: varia de 5 a 23 dias. O período pré-patente depende da forma como se dá a infecção. Quando há ingestão de cistos teciduais, o período pode variar de 6 a 10 dias. Já nos casos em que ocorre a ingestão de oo-

cistos, esse período pode ser ampliado para 18 a 26 dias^[2,4]. Um animal infectado elimina, pelas fezes, cerca de 500 milhões de oocistos a cada defecação^[1,12].

(iii) **Hospedeiro intermediário:** como hospedeiro intermediário, podem ser considerados praticamente todos os animais de sangue quente, incluindo suínos, ovinos, caprinos, equinos e humanos (carnívoros, herbívoros e onívoros), que, em geral, se infectam pela ingestão de material contaminado com oocistos esporulados ou maduros (infectantes) provenientes das fezes de gatos, presentes na água ou no alimento contaminado ou em cistos presentes na carne mal cozida ou inadequadamente processada^[9].

Em suínos a infecção é mais frequente pela via digestiva, pela ingestão de oocistos do *T. gondii* em alimentos ou água contaminados ou pela ingestão de cistos em carne contaminada. A partir da replicação nas células enteroepiteliais ocorre a disseminação dos protozoários pela corrente sanguínea ou linfática atingindo os tecidos como linfonodos, cérebro, olhos, musculatura e trato reprodutivo, porém a infecção, muitas vezes, é inaparente ou subclínica^[1,12]. Quando o parasita (taquizoítos) atinge o útero, é capaz de atravessar a barreira placentária provocando transtornos reprodutivos. Em leitões com menos de oito semanas de idade a infecção leva a sinais clínicos, e em animais de outras faixas etárias a infecção geralmente é inaparente^[2,11,13].

À medida que há a ingestão dos cistos ou oocistos, devido à ação de enzimas digestivas, ocorre a ativação e liberação dos esporozoítos, que penetram no epitélio intestinal, formam vacúolos citoplasmáticos e, por conseguinte, acontece a multiplicação intravacuolar e a formação de pseudocistos. Nesse caso, os esporozoítos replicam-se assexuadamente por várias gerações, por endodiogenia, endopoligenia e merogonia, dando origem aos merontes, que contêm os merozoítos. Os merozoítos rompem a célula infectada e rapidamente mudam para o estágio de taquizoítos, que se distribuem por vários tecidos, como linfonodos, cérebro, olhos, musculatura e trato reprodutivo através das vias linfática e hematógena^[6,10]. Após a fase aguda da infecção, quando o hospedeiro desenvolve imunidade, desaparecem as formas circulantes ativas e os taquizoítos que atingiram os tecidos se diferenciam e formam cistos teciduais compostos por bradizoítos (fase crônica da doença). Os bradizoítos são formas de reprodução lenta presentes no interior dos cistos encontrados aos milhares, preferencialmente nos músculos e no tecido nervoso, e estabelecem uma infecção persistente^[2,6].

Os oocistos são altamente resistentes às condições ambientais e podem permanecer infeciosos por até 18 meses em ambientes úmidos e quentes e por semanas em fluidos corpóreos à temperatura ambiente e em carnes ou subprodutos cárneos *in natura* ou processada inadequadamente^[2,13]. Os taquizoítos são mais frágeis, sobrevivem cerca de um dia em fluidos corpóreos ou 50 dias no sangue a 4°C. Se forem ingeridos, são destruídos pelo suco gástrico. Em ovinos, caprinos, suínos, equinos e seres humanos os cistos com bradizoítos podem permanecer para o resto da vida, porém após a morte do animal sobrevivem nos tecidos por apenas alguns dias, mas são facilmente destruídos pelo congelamento a -14°C por 24 horas ou pelo cozimento a 58°C por 10 minutos^[6,12].

Diagnóstico

A suspeita de toxoplasmose em suínos deve ser investigada sempre que forem observados transtornos reprodutivos, nascimento de leitões fracos e dados epidemiológicos que apontam a presença de felídeos de forma corrente na unidade de produção.

a) Epidemiologia

A importância da toxoplasmose está relacionada às perdas reprodutivas e às implicações em saúde pública, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de carne crua ou mal cozida ou de embutidos crus contaminados (cistos) seja uma importante via de transmissão

do *Toxoplasma gondii* para a população humana. Os cistos podem permanecer viáveis na carne suína por até 2 anos e meio em cortes comerciais; já os oocistos podem permanecer viáveis no ambiente por até 5 anos em condições de alta umidade^[1].

Para os suínos, a eliminação de oocistos pelos gatos e a consequente contaminação da ração, do solo e, muitas vezes, da água, parece ser de extrema relevância na cadeia de transmissão do parasita. A transmissão direta pode ocorrer pela ingestão de roedores contaminados, restos de alimentos contaminados ou, ainda, por via transplacentária^[9]. Especula-se a possibilidade de moscas, baratas e minhocas carrearem mecanicamente os oocistos e, consequentemente, contaminarem os alimentos. Apesar de os gatos serem a principal fonte de contaminação para os suínos, guaxinins, gambás, ratos e camundongos também podem estar envolvidos^[10].

A frequência de animais soropositivos no rebanho brasileiro é bastante variável, e considera-se que a prevalência do agente varie de 8% a 60%^[8,11]. Em estudo realizado no Estado de Goiás em 1998, a frequência de suínos positivos variou de 1,2% a 58,3%^[2,8].

b) Sinais clínicos

A maioria das infecções são assintomáticas, passando despercebidas. Sendo assim, os sinais clínicos, quando ocorrem, dependem da idade dos animais, da imunoatividade e da virulência do agente.

Em fêmeas gestantes, na primoinfecção o agente é capaz de atingir o útero causando abortos, partos prematuros e nascimento de leitões fracos, natimortos ou mumificados. De modo geral, infecções transplacentárias entre 30 e 60 dias de gestação têm como consequência o aborto. Já no período entre 60 e 90 dias de gestação leva ao nascimento de leitões fracos ou natimortos. Eventualmente, podem ocorrer transtornos na fase inicial de gestação com morte e reabsorção embrionária^[1,9].

Quando ocorre a infecção congênita, os leitões podem nascer fracos, apresentar quadros de febre, anorexia, dispneia, tremores e diarreia. Os leitões que sobrevivem normalmente desenvolvem sinais nervosos, como incoordenação, mioclonias e deficiência visual. A infecção de leitões lactentes de até 2 semanas de idade tende a ser fatal. Em leitões entre 20 e 70 dias de idade a doença pode manifestar-se por debilidade, febre, anorexia, dispneia, tosse e tremores, podendo ocorrer diarreia, lesões no trato digestivo associadas à diarreia, e sinais nervosos caracterizados por incoordenação e deficiência visual^[1]. Os animais que se recuperam do quadro clínico (estágio agudo da doença) parecem desenvolver imunidade protetora, mas podem apresentar e manter o parasita na forma de cistos, principalmente no cérebro e nos músculos^[6,8].

c) Patologia

Macroscopicamente, durante a fase aguda da doença em leitões, é possível observar áreas de pneumonia, focos necróticos acinzentados no fígado, enterite, linfoadenopatia, coriorretinites e exsudato serofibrinoso nas cavidades torácica e abdominal. As lesões estão presentes durante a fase aguda da doença, visto que, com a cronificação da doença, ocorre a formação de cistos nos tecidos, sendo geralmente essa fase assintomática^[2,6].

No exame histopatológico, durante a fase aguda da infecção, é possível observar a presença das formas evolutivas do parasita, principalmente nos músculos e no cérebro. Na fase crônica da doença é possível observar a presença de cistos nos tecidos, principalmente no cérebro e nos músculos. Eventualmente, lesões de caráter necrótico ou inflamatório, principalmente no SNC e nos olhos, podem estar presentes na fase crônica da doença. Em leitões natimortos e fetos infectados é possível observar focos microgliais típicos com centro necrótico e, às vezes, mineralizado, frequentemente associado a uma meningite com infiltrado linfoide focal leve^[1,6].

d) Diagnóstico laboratorial

Diante da suspeita de um caso de toxoplasmose, com sinais clínicos-patológicos, dados epidemiológicos individuais ou de população, é imprescindível fazer o diagnóstico definitivo utilizando técnicas laboratoriais.

O isolamento pode ser realizado pela inoculação em camundongos por via intraperitoneal de exsudatos, tecidos, líquido cefalorraquidiano e cérebro fetal. Deve-se ter cuidado para usar amostras frescas livres de contaminação. As amostras não devem ser congeladas.

Exames histológicos de tecidos devem ser interpretados como diagnóstico presuntivo, visto que o diagnóstico somente deve ser confirmado pela identificação da presença do parasito ou de抗ígenos específicos do *T. gondii* nos tecidos pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) ou imunofluorescência.

Vários métodos têm sido descritos com base na reação da cadeia da polimerase (PCR e qPCR) para detectar o DNA do *T. gondii*^[7].

Testes sorológicos têm sido empregados para detecção de anticorpos contra o *T. gondii*. As principais metodologias utilizadas são ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). A presença de suínos soropositivos em diferentes faixas etárias deve ser interpretada com cautela, pois indicam a exposição dos animais ao parasito e não necessariamente a infecção. Entretanto, a presença de anticorpos em natimortos, fetos ou em líquidos fetais indica infecção transplacentária e, portanto, a atividade do parasito na unidade de produção.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve considerar doenças que cursam com falhas reprodutivas, morte fetal, mumificação, natimortalidade e abortos, como leptospirose, parvovirose e erisipela, *Brucella suis* e clamidiose, ou com sintomatologia nervosa, como doença de Aujeszky, meningite estreptocócica e hipoglicemia neonatal.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o isolamento e diagnóstico direto do parasito, colher sangue, líquido cefalorraquidiano, lóquios, fragmentos de músculo (inclusive cardíaco), cérebro e placenta. No caso de fetos, colher fragmentos do cérebro e de músculo cardíaco. As amostras não devem ser congeladas em nenhum momento, uma vez que o parasita não suporta temperaturas abaixo de 15°C.

Para proceder ao exame histopatológico ou realizar ensaios de imuno-histoquímica (IHQ), coletar fragmentos de músculo esquelético e cardíaco, cérebro e placenta. Conservar em frascos com solução tamponada de formol a 10% devidamente identificados. Em se tratando de fetos, estes podem ser enviados inteiros ou submetidos a necropsia e realizada a coleta de cérebro e músculo cardíaco. No caso de fetos inteiros, é importante abrir as cavidades abdominal e torácica para que ocorra rápida e eficiente fixação de todos os órgãos e tecidos.

Para a realização do diagnóstico utilizando como base a reação em cadeia da polimerase (PCR ou *real time PCR*), colher placenta, sistema nervoso central, coração e músculo esquelético e manter o material refrigerado. Caso o tempo entre a colheita do material e o processamento laboratorial ultrapasse 24 horas, as amostras de tecidos podem ser submetidas ao congelamento a -20°C, o que possibilita o armazenamento por mais tempo.

Para realizar o exame sorológico do rebanho, colher amostras de sangue sem anticoagulante, para a obtenção de aproximadamente 3 a 5mL de soro, que deve ser límpido e livre de derivados de hemólise. As amostras de soro devem ser conservadas sob refrigeração a 4 a 8°C ou, se necessário o armazenamento por tempo prolongado, estas podem ser congeladas a uma temperatura de -20°C. Amostrar ao menos 15% das fêmeas da granja, de forma pareada, com intervalo de 21 a 30 dias.

Referências bibliográficas

1. DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89-103, 2009.
2. DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2. ed. Florida: CRC Press, 2009. 467p.
3. DUBEY, J.P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 104, p. 190-195, 2009.
4. DUBEY, J.P. et al. Endemic toxoplasmosis in pigs on a farm in Maryland: isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.**, v. 94, p. 36-41, 2008.
5. DUBEY, J.P. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. **Vet. Parasitol.**, v. 126, p. 57-72, 2004.
6. DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
7. ELLIS, J.T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1053-1060, 1998.
8. GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. Duration of maternally derived antibodies in *Toxoplasma gondii* naturally infected piglets. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 2, p. 134-136, 2010.
9. KIJLSTRA, A. et al. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. **Invest. Ophthal. Vis. Sci.**, v. 45, p. 3165-3169, 2004.
10. LEHMANN, T. et al. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. **Infect. Genet. Evolution**, v. 3, n. 2, p. 135-141, 2003.
11. MILLAR, R.P. et al. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 693-706, 2008.
12. TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1217-1228, 2000.
13. VILLARI, S. et al. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. **Vet. Parasitol.**, v. 161, p. 1-8, 2009.

3.5 Sarna sarcóptica

Conceito

A sarna sarcóptica, ou escabiose, possui distribuição mundial, e é considerada uma das mais importantes e comuns causas de irritação e desconforto para os suínos. A doença é causada pelo acaro *Sarcoptes scabiei* var. *suis*.

Etiologia e Patogênese

Sarcoptes scabiei var. *suis* é um ácaro pequeno, com 0,4 a 0,5mm, de coloração branca a acinzentada, corpo globoso, rosto curto e largo. Tanto as fêmeas quanto os machos possuem quatro pares de patas curtas, grossas e cônicas. Os machos são menores e possuem ventosas ambulacrárias nas patas 1, 2 e 4; já as fêmeas as possuem nas patas 1 e 2^[1,15]. O ácaro vive em galerias na região intradérmica, escavada pelas larvas, ninhas e adultos, que se alimentam das células epidérmicas. Uma fêmea pode escavar 0,5 a 5mm por dia, produzindo galerias profundas que podem chegar a alguns centímetros de extensão^[8].

O tempo de vida da fêmea adulta é de aproximadamente 2 meses, e nesse período põe cerca de dois ovos por dia. O período de incubação varia de 3 a 5 dias^[1,3]. As larvas, 3 a 4 dias após a

eclosão, sofrem uma muda para ninfa e, em um período de 3 a 5 dias se transformam em adultos. O ciclo evolutivo, de ovo até chegar a fêmea adulta ovígera, é de 10 a 15 dias (Figura 9). A proliferação do ácaro somente ocorre no hospedeiro, e o período entre a infecção e o início dos sinais clínicos varia de 15 a 70 dias^[10,13,15].

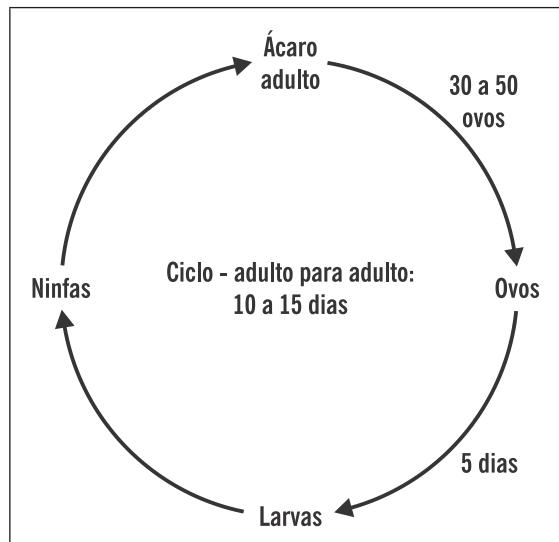


Figura 9. Ciclo de vida do ácaro *Sarcoptes scabiei* var. *suis*.

Após o contato com a pele, *S. scabiei* multiplica-se: inicialmente na superfície e, em seguida, inicia a escavação de galerias onde as fêmeas realizam a postura dos ovos e, em consequência, acontece a multiplicação efetiva dos ácaros. Durante a multiplicação, diferentes formas evolutivas (larvas, ninfas e adultos) participam das escavações, que afetam a camada epidérmica da pele até o extrato germinativo^[1,3,10]. Esse processo de destruição da epiderme é resultado da ação mecânica das peças bucais, da ação das secreções salivares esfoliativo-celulolíticas e dos metabólitos, que também são responsáveis pela irritação, pela coceira e pelo prurido, que obriga os suínos a se roçarem. Em uma fase mais adiantada da doença as pápulas e vesículas que se formam são decorrentes do exsudato da linfa, de lesão direta do ácaro e da ação alérgena de ovos, exúvia, metabólitos e fezes do ácaro, que se acumulam e induzem a um processo inflamatório (hipersensibilidade tipo I). A partir dessa fase o tecido conectivo da pele se queratiniza, tornando-a espessa e rugosa^[3,7,8,9].

Os animais infectados apresentam soroconversão em torno de cinco a sete semanas após o contato com o ácaro. Animais submetidos a tratamento eficaz e livres do parasito mantêm-se sorologicamente reativos por 9 a 12 meses. A imunidade passiva persiste até o terceiro ou quarto mês de vida^[4,11].

A baixa viabilidade dos sarcoptídeos no ambiente e a incapacidade desses em se multiplicar fora do seu hospedeiro são fatores importantes a serem considerados para o controle da doença em um rebanho de suínos. Desse ponto de vista, assim que um rebanho está livre de sarna, uma importante ferramenta para manter esse *status* é o controle no transporte e na introdução de animais na unidade de produção suinícola^[6,7]. Entretanto, é importante ressaltar que, uma vez introduzido o agente em uma granja, ele tende a tornar-se endêmico em praticamente todas as fases de produção e dificilmente será erradicado em um curto período de tempo.

Diagnóstico

Considerando a necessidade de manter um nível sanitário adequado nas granjas de reprodutores suídeos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu a Instrução Normativa N° 19, de 15 de fevereiro de 2002. Ela normatiza a certificação de Granja de Reprodutores Suídeos Certificada (GRSC) e estabelece que, na positividade no exame de raspado de pele para a presença de sarna, a certificação da granja será suspensa, devendo ser providenciada a erradicação por meio de tratamento medicamentoso, elaborado e implantado pelo responsável técnico^[5].

a) Epidemiologia

Suínos de todas as idades são suscetíveis, sendo a doença registrada em diferentes sistemas de produção de suínos, independentemente de clima ou delimitação geográfica. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que é possível observar maior incidência da sarna sarcóptica nos meses mais frios. Esse fato ocorre, provavelmente, devido à busca pelo aquecimento por parte dos animais e, consequentemente, à maior tendência ao amontoamento^[6,15].

A forma de transmissão direta, suíno-suíno, é a mais importante. Os leitões podem infestar-se a partir das matrizes com sarna durante a fase de maternidade, durante o transporte (caminhão não desinfectado) ou por ocasião do reagrupamento após o desmame envolvendo lotes livres e contaminados^[1,6,7]. O contato com superfícies recentemente contaminadas, como baias não submetidas a um programa de limpeza e desinfecção, ou a um período de vazio sanitário, ou meios de transporte (caminhões), possibilitam a transmissão a partir de ácaros presentes nas superfícies infestadas ocupadas anteriormente por animais infectados. A transmissão indireta pode ocorrer por fômites e pessoas que pode portar os ácaros^[1,6]. Os humanos podem infestar-se a partir do contato direto com animais infectados.

No Brasil, apesar de poucos estudos abordarem a prevalência da sarna sarcóptica, estima-se que 5,6% a 12,1% dos suínos estejam infestados, dependendo da região^[6,9,13]. Os prejuízos ou perdas determinados pela doença estão associados ao prurido, à irritação, ao desconforto, ao comprometimento do bem-estar, à diminuição do desempenho de crescimento, à inquietude, à perda da habilidade materna, à diminuição da produção leiteira das fêmeas, ao aumento no número de leitões esmagados, à maior suscetibilidade a infecções e a processos secundários, como fator desencadeante de canibalismo, prejuízos para a indústria por condenações devidas às lesões cutâneas ou ao mau aspecto das carcaças^[7,9].

b) Sinais clínicos

O principal sinal clínico da sarna sarcóptica é o prurido intenso, que aparece entre duas e onze semanas após a infestação. As lesões estão localizadas principalmente nas orelhas, nas axilas, no dorso, na região cervical e nas patas, mas em infestações massivas podem ocupar todo o corpo. As lesões causam irritação, coceira e prurido intensos, eritema, que obrigam os suínos a se roçarem, principalmente nas horas quentes do dia e quando os animais infectados são molhados, provocando escoriações, áreas inflamatórias, queda de cerdas, formação de crostas e lesões exsudativas^[7,8]. Na prática, a apresentação clínica da sarna sarcóptica dos suínos pode ser classificada em três formas definidas:

Sarna sarcóptica aguda: manifesta-se em criações, geralmente durante uma primoinfecção. As lesões aparecem três a quatro semanas após a infestação, depois de a fêmea adulta escavar a pele, fazer a postura dos ovos, que eclodem e possibilitam a atuação de diferentes formas evolutivas, capazes de escavar novas galerias^[9].

Sarna hiperqueratosa ou crônica: Esta forma clínica é mais frequente em fêmeas e machos reprodutores. As lesões são progressivas, dando origem a lesões exsudativas e à formação de

crostas, principal lesão observável no exame externo. Clinicamente, em consequência das lesões, os animais podem manifestar irritação, coceira, prurido intenso, inquietação, excitabilidade, ranger involuntário dos dentes, aerofagia, salivação e passam a se roçar nas instalações^[3,7,8,15]. O ato de roçar tende a ser exacerbado nas horas mais quentes do dia e quando os animais são banhados, levando a escoriações e lesões exsudativas.

Sarna hipersensível ou alérgica: é a apresentação clínica da sarna sarcóptica mais frequente. Ocorre principalmente em leitões de creche/recria e terminação, associada à hipersensibilidade I e/ou tipo IV, tendo como consequências inquietação, cerdas eriçadas, prurido, eritemas, alopecia, erosões de pele nas regiões afetadas e perda da condição corporal^[1,3,9].

c) Patologia

As lesões aparecem três a quatro semanas após a infestação e estão associadas a uma reação de hipersensibilidade do tipo imediata ou do ato de coçar-se. As primeiras lesões são pequenas pápulas vermelhas ou vesículas com eritema, perda parcial de cerdas, hiperqueratinização da pele e proliferação de tecido conectivo.

As lesões crescem gradualmente e espalham-se por todo o corpo. As manchas ocorrem predominantemente no dorso, nos flancos e no ventre, podendo ser igualmente localizadas no lombo, no pescoço e nas orelhas. A pele do hospedeiro aparece inflamada, escamosa e em carne viva e fendida^[7,8]. A pele dos leitões torna-se dura e as cerdas ficam eriçadas. O constante esfregar e morder pode lesar a pele deixando as áreas afetadas abertas a infecções bacterianas ou fúngicas, podendo aparecer áreas de alopecia. Um surto grave de sarna gera altos níveis de estresse no rebanho, que é normalmente acompanhado de perda de peso^[3].

No caso das infecções crônicas, os ácaros normalmente estão no interior das orelhas (pavilhão auricular), associados às crostas ou ao cerume, podendo passar despercebidos durante o exame clínico.

d) Diagnóstico laboratorial

- *Diagnóstico nas unidades de produção:* o diagnóstico sugestivo de sarna, em animais das fases de recria e terminação, pode ser obtido pela avaliação periódica (intervalos quinzenais) do índice de prurido (IP). Para realizar o exame, deve-se obrigar os animais a se levantarem e observar durante um período de 15 minutos o número de episódios de coçar manifestados pelos animais de uma respectiva baia^[5,15]. Para obter o IP, deve-se utilizar a seguinte fórmula:

$$IP = \frac{\text{Número de episódios de coçar durante 15 minutos}}{\text{Número de animais observados}}$$

O índice de prurido (IP), baseado na fórmula acima, deve ser interpretado conforme a (Tabela 56).

Tabela 56. Interpretação do índice de prurido.

Índice obtido	Interpretação
IP < 0,1	A granja está livre de sarna ou o problema está controlado
IP > 0,1	Há presença sugestiva de sarna na granja; não há medidas de controle ou elas não são eficientes

É importante considerar que o diagnóstico definitivo deve envolver exames complementares, como esfregaço da pele.

• *Diagnóstico em abatedouro*: é possível determinar o índice de dermatite (ID). Esse exame permite avaliar a prevalência e a gravidade da sarna sarcóptica na fase de terminação, classificando as lesões de dermatite de acordo com o grau, em uma escala de 0 a 3^[5,15]. O exame deve ser realizado nas carcaças após a saída da escaldagem e a retirada das cerdas, e antes da evisceração. O grau de dermatite zero indica a ausência de lesões. Dermatite de grau 1 envolve lesões pontuais ou focais, que podem ser facilmente confundidas com lesões de hipersensibilidade que, eventualmente, podem ser atribuídas a outros alérgenos (insetos, produtos químicos). Dermatite de grau 2 são lesões extensas, bem definidas, e a de grau 3 se caracteriza por lesões graves disseminadas, envolvendo grandes extensões da pele.

O índice de dermatite (ID) pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$ID = \frac{(1 \times \text{nº animais com lesão grau 1}) + (2 \times \text{animais com lesão grau 2}) + (3 \times \text{animais com lesão grau 3})}{\text{Nº de carcaças observadas}}$$

O índice de dermatite (ID), com base na fórmula acima, deve ser interpretado conforme a (Tabela 57).

Tabela 57. Interpretação do índice de dermatite

Índice obtido	Interpretação
ID < 0,5	Sob controle
ID > 0,5 e < 1,5	Medidas de controle insuficientes
ID > 1,5	Ausência de medidas de controle

• **Diagnóstico laboratorial**: entre os diferentes métodos propostos para o diagnóstico da sarna sarcóptica, o raspado profundo da pele apresenta-se como o teste de eleição para o diagnóstico definitivo da doença. Esse método apresenta especificidade de 100%, e o achado de um só ácaro indica que o animal e a granja são positivos. A sensibilidade dos raspados de pele tende a ser baixa nas fases iniciais da enfermidade.

A presença de *S. scabiei* no exame direto do raspado de pele possibilita um diagnóstico conclusivo de sarna, porém um resultado negativo no exame direto não exclui a suspeita de sarna. Nesse caso, se existe a suspeita clínico-patológica da sarna, recomenda-se realizar um segundo exame de raspado de pele envolvendo um número maior de animais, preferencialmente com duas semanas de intervalo. Uma granja só é considerada negativa para sarna sarcóptica quando forem realizados raspados de pele de vários animais de diferentes faixas etárias e eles forem negativos para a presença do ácaro ao exame laboratorial.

Recentemente, testes sorológicos para o diagnóstico da sarna sarcóptica baseados no teste de ELISA foram usados para a determinação de anticorpos específicos para o ácaro, todavia eles não substituem o raspado da pele para confirmação do diagnóstico^[12]. Os resultados dos testes sorológicos podem ser usados com êxito em programas de erradicação para detectar infestações subclínicas do rebanho. Os anticorpos são detectáveis três a sete semanas após a infecção e duram aproximadamente 11 meses.

Recentemente, o DNA de *Sarcoptes scabiei* foi amplificado e detectado com sucesso através da PCR^[2]. Essa técnica parece ser promissora como um procedimento complementar para a detecção específica do ácaro, sendo aplicável nos casos de monitoramento de rebanho, principalmente granjas GRSC, ou de rebanhos em que o ácaro circula com baixa intensidade e é difícil de encontrá-lo em raspados de pele.

e) Diagnóstico diferencial

Uma série de doenças deve ser considerada no diagnóstico diferencial quando nos deparamos com um caso suspeito de sarna, incluindo fungos, picadas de insetos, plantas irritantes e abrasão mecânica^[14]. Na (Tabela 58) estão relacionados os principais processos e enfermidades que devem ser considerados no diagnóstico sugestivo de sarna sarcóptica.

Tabela 58. Enfermidades e processos a ser considerados na suspeita de sarna sarcóptica.

Enfermidade	Idade	Sinais Clínicos	Lesões
Paraqueratose	2 a 4 meses de idade	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Eritema ventral e das extremidades e presença de lesões simétricas
Hiperqueratose	Adultos	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Crosta sebácea de cor cinza-escura na região das axilas e na base das orelhas
Dermatite estafilocócica	Leitões com até 60 dias	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Eritema inicial e lesões com características sebáceas
Ptiríase rosea	Leitões de creche e recria	Presença de prurido, mas sem agitação da cabeça	Pápulas extensas com bordos aumentados
Dermatomicose	Todas as idades	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Alopecia
Picadas de mosquitos	Todas as idades	Presença de prurido, mas sem agitação da cabeça	Eritema focal com ponto central
Pediculose	Todas as idades	Presença de prurido, mas sem agitação da cabeça	Pequenos focos de necrose na pele
Queimadura do sol	Todas as idades	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Grandes áreas de necrose e descamação da pele
Queimaduras de cal virgem	Todas as idades	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Grandes áreas de necrose e descamação da pele
Canibalismo	Todas as idades	Sem prurido e sem agitação da cabeça	Lesões lineares

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a realização do raspado de pele, utilizar uma lâmina de bisturi afiada, mantendo-a em ângulo reto e aprofundar o suficiente para causar um pequeno sangramento, de modo que escorra uma gota de sangue a partir do sítio de raspagem. Uma gota de óleo (ex. glicerina) pode ser colocada na lâmina de bisturi para facilitar que o produto do raspado da pele durante o procedimento fique aderido à lâmina, inclusive os ácaros.

Os raspados de pele devem ser realizados nas bordas das lesões, obviamente, nos locais de prurido, na irritação e, preferencialmente, nas lesões crostosas, visto que quanto mais crônica a lesão (crostosa), maior a concentração de ácaros. Outro procedimento bastante prático é a colheita de crostas diretamente do pavilhão auricular ou do canal auditivo, com auxílio de uma haste com algodão umedecido com glicerina ou mesmo água, em forma de um suave^[15].

O conteúdo do raspado destinado ao exame laboratorial, deve ser acondicionado em recipientes fechados e limpos, devendo a amostra ser encaminhada imediatamente para o laboratório de diagnóstico veterinário. Se o tempo entre a colheita do material e o processamento exceder a 24 horas, o material deve ser conservado e transportado em condições de refrigeração, à temperatura entre 4 e 8f) °C.

Para um diagnóstico representativo em granjas comerciais, recomenda-se, no caso de matrizes, colher amostras de um mínimo de 10% do total do plantel. Nas fases de creche, recria e terminação devem-se colher raspados de pele de aproximadamente cinco animais por baia.

No processo de certificação de granjas GRSC, devem ser realizados dois exames de raspado de pele, com intervalo de 2 a 3 meses. O número de animais a serem amostrados (colhidos) são cinco reprodutores e cinco suínos de terminação, identificados pelo médico-veterinário oficial, por meio de exame clínico, como potenciais portadores de sarna. Todos os exames deverão apresentar resultados negativos. No caso de exame positivo, a certificação será suspensa imediatamente, devendo ser providenciada a erradicação, por meio de tratamento medicamentoso, elaborado e implantado pelo responsável técnico. A granja que não cumprir integralmente essas condições perde o *status* de granja de reprodutores suídeos certificada^[5].

Referências bibliográficas

1. ARLIAN, L.G. Biology, host relations, and epidemiology of *Sarcoptes scabiei*. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 34, p. 139-161, 1989.
2. BEZOLD, G. et al. Hidden scabies: diagnosis by polymerase chain reaction. **Br. J. Dermatol.**, v. 144, p. 614-618, 2001.
3. BORNSTEIN, S.; MÖRNER, T.; SAMUEL, W.M. *Sarcoptes scabiei* and sarcoptic mange. In: SAMUEL W.M.; PYBUS M.J.; KOCAN A.A. (Eds.). **Parasitic Diseases of Wild Mammals**. 3. ed. Iowa: Iowa State University Press, p. 107-119, 2001.
4. BORNSTEIN, S.; WALLGREN, P. Serodiagnosis of sarcoptic mange in pigs. **Veterinary Record**. v. 141, p. 8-12, 1997.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DSA nº 19 de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de março de 2002, Seção 1, p. 3.
6. DAMRIYASA, M. et al. Prevalence, risk factors and economic importance of infestations with *Sarcoptes scabiei* and *Haematopinus suis* in sows of pig breeding farms in Hesse, Germany. **Medical & Veterinary Entomology**, v. 18, n. 4, p. 361-367, 2004.
7. DAVIES, P.R. Sarcoptic mange and production performance of swine: a review of the literature and studies of association between mite infestation, growth rate and mange severity in growing pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 249-264, 1995.
8. GARCIA, R. Health special: losses from skin mites. **Pig International**, v. 21, n. 11, p. 12-14, 1991.
9. MELANCON, J.J. Prevalence of Sarcoptic Mange in Pigs: An Overview of Recent Surveys. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 45, p. 219-225, 2004.
10. KLOMPEN, J.S.H. Phylogenetic relationships in the mite family Sarcoptidae (Acari: Astigmata). **Misc. Publ. Univ. Michigan, Mus. Zool.**, v. 180, p. 1-155, 1992.
11. LOWENSTEIN, M.; KAHLBACHER, H.; PESCHKE, R. On the substantial variation in serological responses in pigs to *Sarcoptes scabiei* var. *suis* using different commercially available indirect enzyme-linked immunosorbent assays. **Parasit. Res.**, v. 94, p. 24-30, 2004.

12. LOWER, K.S. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serological diagnosis of sarcoptic mange in dogs. **Vet. Dermatol.**, 12, 315-320, 2001.
13. SILVA, E.V. **Avaliação de três métodos de Diagnóstico e determinação da prevalência de sarna sarcóptica em suínos mantidos em criações intensivas na microrregião de Goiânia - GO - Brasil**, 2002, 55p. Dissertação mestrado – Universidade Federal de Goiás.
14. WALTON, S.F.; CURRIE, B.J. Problems in diagnosing scabies, a global disease in human and animal populations. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, p. 268-279, 2007.
15. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 5. ed., Paris: OIE, 2009.

CAPÍTULO 8

DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS BOVINOS

Vagner Miranda Portes

Álvaro Menin

Carolina Reck

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é um dos maiores do mundo, com grande potencial para abastecer tanto o mercado interno como o externo. A bovinocultura está distribuída por todo o território nacional, sendo caracterizada pela grande heterogeneidade quanto ao tamanho das propriedades, ao tipo de produtor, aos rebanhos e às tecnologias de produção adotadas. No setor da pecuária de corte, o País tem uma atividade de grande importância econômica, pois além de produzir alimento nobre para o mercado interno, é também um elemento importante na captação de divisas por sua inserção no mercado mundial de carne bovina.

A cadeia do leite é uma das mais importantes atividades do complexo agroindustrial brasileiro. Nela vem sendo observada uma produtividade crescente, levando o País à condição de autossuficiência, com expectativas de tornar-se um exportador de peso. Esse setor vem sofrendo profundas transformações nos últimos anos, e muitas delas ainda se encontram em andamento, buscando atender as demandas do mercado globalizado.

A inserção do Brasil na economia global a partir da década de 90, promovendo a abertura de mercados, forçou também a reestruturação dos diversos setores produtivos, buscando competitividade não só internacional, mas também no comércio interno. Uma das prioridades passou a ser o controle sanitário do rebanho bovino nacional, condição imprescindível para se conquistar novos mercados. Outros temas de relevante importância neste cenário são a rastreabilidade, a garantia de qualidade e inocuidade dos produtos produzidos, e a sustentabilidade dos sistemas de produção.

Conforme as demandas impostas pelo novo conceito de pecuária moderna, destaca-se a intensificação da produção, na qual aumentam os riscos sanitários, contextualizando com a diminuição na margem de lucro. Nesse contexto, há uma constante busca por biossegurança, e é imprescindível a utilização de tecnologias avançadas de diagnóstico, permitindo agilidade e segurança nos diagnósticos. Tudo isso leva ao apoio e à rapidez para tomadas de decisões no controle de enfermidades, minimizando os prejuízos e servindo de alicerce na busca por competitividade.

Na pecuária moderna, o sucesso de um bom programa sanitário e de biossegurança depende de um prévio conhecimento clínico patológico das injúrias que acometem a pecuária em âmbito local, estadual, nacional e mundial e de uma adequada coleta de amostras para facilitar o diagnóstico laboratorial, permitindo um diagnóstico final correto e seguro. Nessa nova ótica, fica visível a necessidade real do estabelecimento de sistemas de produção intensificados, produtivos e rentáveis, nos quais o ágil e eficaz diagnóstico das enfermidades que acometem o rebanho é imprescindível para a redução das perdas produtivas e para a geração de produtos alimentares seguros. Neste capítulo estão contempladas as principais enfermidades infecciosas e parasitárias que afetam os bovinos.

1. PRINCIPAIS DOENÇAS BACTERIANAS DOS BOVINOS

1.1 Abscessos do sistema nervoso central

Conceito

Doenças neurológicas que afetam o sistema nervoso central de bovinos, acometendo normalmente animais jovens.

Etiologia e Patogênese

Arcanobacterium pyogenes é o microrganismo mais comumente isolado dos abscessos do SNC^[1,5]. Têm importância significativa também os de agentes piogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp, *Fusobacterium necrophorum* e *Pseudomonas* spp^[4].

Podem ser intracranianos ou intramedulares, e geralmente surgem a partir de um alastramento embólico de bactérias oriundas de infecções distantes^[5]. Podem ocorrer também por extensão de lesões estruturais adjacentes, por implantação direta através de lesões penetrantes ou cirúrgicas ou por migração retrógrada via nervos periféricos^[6]. Nos bezerros, comumente estão associados à septicemia umbilical e nos animais adultos às doenças crônicas, tais como ruminite, abscessos músculo-esqueléticos crônicos e doenças por ferramenta (descorna, uso de tabuleta para desmame^[3] e colocação de argola nasal em bovino)^[5, 6].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Abscessos do sistema nervoso central (SNC) têm maior ocorrência entre animais jovens, normalmente com idade inferior a um ano^[6]. Tipicamente, em bezerros com 4 a 12 semanas de idade^[1]; ocasionalmente, afeta animais mais velhos^[4]. As espécies mais afetadas são ovinos, caprinos e bovinos^[6].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos são diversos, conforme sua localização e tamanho^[4]. O diagnóstico clínico é viável, cursa com depressão, incoordenação motora e, ocasionalmente, elevação de temperatura, sendo os sinais clínicos diretamente relacionados à região do SNC afetada.

c) Patologia

Os aspectos macroscópicos e microscópicos dos abscessos que afetam as diferentes áreas do SNC são semelhantes, independentemente de sua localização. Nos estágios iniciais, possuem uma cavidade que contém um centro liquefeito e margens pouco definidas. Seu conteúdo pode ser branco ou amarelado e fluido ou semissólido. Microscopicamente, observa-se degeneração de fibras nervosas e astrócitos.

d) Diagnóstico laboratorial

A análise do líquido cefalorraquidiano como exame complementar nem sempre é útil. Pode ficar normal em casos iniciais, porém nos casos avançados ocorre elevação nos níveis de proteína e aumento leucocitário. O exame radiológico pode auxiliar nos casos de calcificação dos abscessos ou de alteração óssea. Podem-se empregar outras técnicas avançadas, como cintilografia nuclear, tomografia computadorizada e eletroencefalografia, se o valor do animal determinar tais procedimentos^[2,5,7]. Como esses métodos dificilmente estão disponíveis em campo, o diagnóstico é confirmado por necropsia^[6]. O exame microbiológico associado ao antibiograma é importante para a identificação do agente e a determinação do tratamento para o rebanho.

e) Diagnóstico diferencial

Diferenciar de doenças que cursam com sintomatologia nervosa.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Coletar suave dos abscessos assepticamente e encaminhar ao laboratório, conservando-os sob refrigeração. A coleta de líquido cefalorraquidiano, em alguns casos, pode auxiliar no diagnóstico.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. GERRROS, T.C., MATTOON, J.S. e SNYDER, S.P. Use of computed tomography in the diagnosis of a cerebral abscess in a goat. **Vet. Radiol. Ultrasound.** v. 39, p. 322-324. 1998.
3. LORETTI, A.P., et al. Síndrome do abscesso pituitário em bezerros associada ao uso de tabuleta nasal para desmame interrompido. **Pesq. Vet. Bras.** v. 23, n. 1. p. 39-46. 2003.
4. RADOSTITS, O.M., et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
5. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
6. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
7. STRAIN, G.M., et al. Evoked potential and electroencephalographic assessment of central blindness due to brain abscess in a steer. **Cornell Vet.** v. 77, p. 374-382. 1987.

1.2 Actinobacilose

Conceito

A actinobacilose dos bovinos, uma doença infecciosa, não contagiosa, crônica e granulomatosa, afeta os tecidos moles, causando uma inflamação piogranulomatosa¹ com presença de drusas em seu interior. É com mais frequência manifestada clinicamente com o endurecimento da língua, desenvolvendo um quadro clássico denominado “língua de pau” ou “língua de madeira”, caracterizado por uma glossite difusa esclerosante^[5,7]. Lesões potencialmente importantes ocorrem no tubo esofágico, na parede ruminal e nos linfonodos regionais^[1,5], podendo ser afetados animais de qualquer idade e raça^[7]. São afetados principalmente bovinos, e com menos frequência ovinos, suínos e equinos^[4]. Porém, no Brasil, a doença só tem sido diagnosticada em bovinos^[7].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é o *Actinobacillus lignieresii*, um comensal do trato digestivo e respiratório superior dos bovinos, agente este suscetível a alterações ambientais que não sobrevive por mais de 5 dias longe do hospedeiro^[1].

A infecção se instala quando da presença de uma solução de continuidade na mucosa oral, facilitando a penetração do agente, normalmente ocasionada por alimentos fibrosos ou grosseiros, bem como a utilização de áreas de resteva ou palhadas, como nos casos pós-colheita do arroz irrigado e do milho.

Diagnóstico

O endurecimento da língua é característico da doença e pode haver um histórico de pastoreio em pastagens ásperas^[5]. O exame físico da cavidade oral, com auxílio de um abridor de boca para ruminantes, é recomendado.

a) Epidemiologia

Normalmente é de ocorrência esporádica e casos isolados, todavia, dependendo das condições epidemiológicas, podem ocorrer surtos^[1,2]. A maioria dos surtos ocorre em animais que estão em pastoreio em áreas pós-colheita, pois nelas há a presença de talos, forragens grosseiras e plantas invasoras, promovendo traumatismos na cavidade oral, favorecendo a infecção por *A. lignieresii*. O *A. lignieresii* não sobrevive por mais de 5 dias no feno ou na palha, e a presença de animais com lesões supuradas contaminando o meio ambiente favorece a disseminação da doença^[7].

b) Sinais clínicos

Animais acometidos pela “língua de pau” apresentam perda de apetite, salivação intensa, dificuldade de mastigar e se alimentar, e língua aumentada de volume, dura, dolorida. Podem ser também encontradas lesões nos lábios, no palato, na faringe, nas fossas nasais e na face. Essas lesões, quando difusas, causam um quadro clínico denominado “cara de hipopótamo”^[7]. Nesse caso, há comprometimento dos linfonodos regionais, os quais se encontram aumentados de volume, duros, frios, inodoros e, às vezes, com presença de pus^[7].

¹ Inflamação piogranulomatosa: Lesão inflamatória caracterizada por formações nodulares (granulomas), firme, persistente e com formação de pus (purulento).

c) Patologia

A doença caracteriza-se pela presença de granulomas duros, com conteúdo purulento e presença de grânulos sulfurados^[6] nos tecidos moles, principalmente nas regiões da cabeça e do pescoço. Às vezes, essas tumefações podem fistular e drenar material purulento. Frequentemente, observam-se pequenas úlceras, das quais desprende pus amarelo e inodoro. É comum a ocorrência de linfangite com linfadenite regional^[7].

Histologicamente, a lesão é uma inflamação piogranulomatosa, com focos necróticos, tendo no centro drusas com projeções radiais na forma de clavas. Ocorre proliferação de tecido conjuntivo fibroso, envolvendo todo o granuloma e, em estágio crônico, pode ocorrer mineralização das drusas^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

Através de exame direto do material purulento, pode-se ter um diagnóstico presuntivo de actinobacilose. O material deve ser primeiramente tratado com hidróxido de sódio a 5% e observado em microscopia. É possível que se verifique a presença de estruturas similares a grânulos de enxofre. Quando essas estruturas são pressionadas entre lâmina e lamínula e observadas ao microscópio, se identifica a presença de estruturas semelhantes a clavas. Quando corado esse esfregaço pela técnica de Gram, se observa a presença de cocobacilos Gram-negativos, o que pode caracterizar a actinobacilose^[3]. O diagnóstico definitivo deve ser baseado na cultura, isolamento e identificação de *A. lignieresii*^[3].

e) Diagnóstico diferencial

O exame histopatológico permite o diagnóstico diferencial com outras doenças que apresentam lesões macroscópicas semelhantes, como a tuberculose e o piogranuloma estafilocócico^[7].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Espécimes para exame laboratorial em caso de animal vivo incluem pus ou material de biopsia refrigerado. Quando de animais abatidos, remeter tecidos ou linfonodos afetados, também refrigerados.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. CAMPBELL, S.G., et al. An unusual epizootic of actinobacillosis in dairy heifers. **J Am Vet Med Associat.** v. 166, p. 604-606. 1975.
3. CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
4. LENTSCH, R.H. & WAGNER, J.E. Isolation of *Actinobacillus lignieresii* and *Actinobacillus equuli* from Laboratory Rodents. **J Clin Microbiol.** v. 12, n. 3. p. 351-354. 1980.
5. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
6. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
7. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.3 Actinomicose

Conceito

A actinomicose é uma doença infecciosa crônica dos bovinos, caracterizada por uma osteomielite rarefaciente, com granulação supurativa dos ossos da cabeça, em particular da mandíbula e da maxila. Nota-se evidente tumefação, abscessos, traços fistulosos e fibrose extensa.

Etiologia e Patogênese

A actinomicose bovina é uma doença infecciosa causada pelo *Actinomyces bovis*, bacilo Gram-positivo, não capsulado, desprovido de esporo e imóvel, que se apresenta ao microscópio com tendência a formar filamentos e ramificações. Sendo microaerófilo ou anaeróbio^[2], normalmente apresenta baixa patogenicidade e é habitante normal da cavidade oral, do trato respiratório superior e do trato digestório dos ruminantes^[3,5,8].

Esse microrganismos invadem o tecido ósseo através de abrasões ou de lesões dentárias ou alveolares durante a erupção dos dentes, ou por ferimentos causados pela ingestão de plantas ou corpos estranhos rígidos^[1,4]. O microrganismo também pode contaminar ferimentos cutâneos em comedouros comunitários^[6]. Desencadeia-se uma osteomielite rarefaciente, ocorrendo reposição por osso poroso, formando abscessos interconectados e fístulas que se abrem ao exterior. A lesão dura, imóvel e circunscrita pode atingir tamanho considerável e, por fim, interferir na mastigação^[1].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A doença afeta bovinos de diferentes idades. Normalmente é esporádica, mas pode ocorrer na forma de surto. Esse mesmo comportamento da enfermidade tem sido observado no Rio Grande do Sul, por Riet-Correa et al.^[7]. Outras espécies também podem ser afetadas, como ovinos, suínos e equinos^[6]. Uma fonte importante de infecção é a presença de animal com lesão supurativa no rebanho.

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos caracterizam-se pelo aparecimento de uma tumefação de consistência muito dura localizada na altura dos dentes molares e pré-molares, na maioria dos casos na mandíbula e com menor frequência no maxilar. Localização em outros ossos é rara. Normalmente a lesão apresenta progressão lenta durante meses e em alguns casos pode ser rápida (menos de 30 dias). Na evolução do quadro ocorre ulceração da pele e se observam trajetos fistulosos, com presença de pus amarelo com grânulos pequenos e duros semelhantes a grânulos de enxofre^[7]. Quando há envolvimento dos dentes (afrouxamento ou perda), observa-se evidência de dor à mastigação ou à ruminação, com consequente perda de peso^[8]. Com frequência ocorre fratura de mandíbula.

c) Patologia

As lesões ocorrem principalmente na mandíbula, originando neoformação óssea nodular indolor, imóvel e localizada geralmente no ramo horizontal da mandíbula. As alterações macroscópicas são características de uma osteomielite proliferativa e rarefação óssea, com foco purulento^[7]. Inicialmente não há drenagem espontânea da lesão, mas a formação de fístula e o envolvimento de raízes dentárias podem ocorrer com a evolução da doença. Não há envolvimento de linfonodos^[1].

Histologicamente, observa-se osteomielite piogranulomatosa, com proliferação de tecido fibroso e presença, no centro dos piogranulomas, de rosetas caracterizadas por uma área central onde se encontra a bactéria, e uma área periférica formada por estruturas similares a clavas^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

Em esfregaço direto do pus, colocado entre lâmina e lamínula após diluição em água ou clarificação com hidróxido de sódio 5%, ao microscópio, se observa a presença de rosetas com clavas. Demonstram-se os bastonetes filamentosos Gram-positivos. A confirmação do diagnóstico se dá por cultura e isolamento microbiológico.

e) Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser realizada com relação à actinobacilose; nesta não ocorre envolvimento ósseo, e os abscessos, que atingem os linfonodos da cabeça, não são tão duros e têm mais mobilidade^[7].

As radiografias confirmam osteomielite com zonas radioluzentes multiplas e proliferação de osso periosteal, auxiliando na diferenciação desta enfermidade das neoplasias ósseas, das infecções das raízes dentárias, das fraturas e da sinusite maxilar^[6].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se encaminhar ao laboratório, para exame microbiológico, aspirado de lesões fechadas ou tecidos de biopsia ou necropsia. O material deve ser encaminhado resfriado. Para exame histopatológico, encaminhar granuloma actinomicótico conservado em formalina.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
3. HIRSH, D.C. e ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. 446p.
4. OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária. Guia Bacteriológico Prático**. 2. ed., Canoas: ULBRA, 2002. 237p.
5. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
6. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
7. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
8. SMITH, B.P. **Large Animal Internal Medicine**. St. Louis: Mosby, 1996. 2040p.

1.4 Botulismo

Conceito

O botulismo é uma doença neuroparalítica, considerada uma intoxicação grave, potencialmente fatal, causada pela ingestão de toxinas pré-forradas. A doença é caracterizada por paralisia flácida e morte consequente de insuficiência respiratória.

Etiologia e Patogênese

O agente causador do botulismo é o *Clostridium botulinum*. Diferentes cepas desse microrganismo produzem toxinas antigenicamente distintas, e os ruminantes são acometidos pelos tipos C e D. O *C. botulinum* é um germe ubíquo, anaeróbico, Gram-positivo, formador de esporos que podem estar presentes no trato intestinal dos animais domésticos. Os esporos são altamente resistentes, podendo suportar a fervura por até várias horas. A toxina botulínica pode ser produzida a temperaturas de 30°C, em pH acima de 5, sem necessidade de ausência completa de oxigênio, e é liberada com a lise da célula. Em cadáveres o ambiente de anaerobiose é facilitado pela presença do couro, havendo grande produção de toxina que impregna ossos, tendões e ligamentos^[6]. As neurotoxinas de *C. botulinum* são as mais potentes toxinas biológicas conhecidas^[5]. Elas são resistentes aos agentes químicos, porém sensíveis ao calor e à dessecção^[6].

Após a ingestão, a toxina passa para o sangue e para a linfa através da parede intestinal. Uma vez na corrente sanguínea, a toxina chega ao sistema nervoso periférico, onde ela aparentemente se liga a gangliosídios da junção neuromuscular. Assim, impede a liberação das vesículas de acetilcolina, resultando numa paralisia flácida progressiva da musculatura estriada, sem alteração dos sentidos.

A toxina botulínica afeta apenas nervos colinérgicos do sistema nervoso periférico, e a barreira hematoencefálica protege os nervos colinérgicos do cérebro, não afetando, assim, o sistema nervoso central.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Os endósporos de *C. botulinum* estão distribuídos no solo e no meio aquático do mundo todo^[5]. O botulismo geralmente ocorre a partir da ingestão de alimentos contaminados com a toxina pré-formada. Contudo, o botulismo tóxico-infeccioso, forma incomum da doença, pode ocorrer quando esporos germinam em feridas ou no trato intestinal^[4,5]. Geralmente ocorre na forma de surto quando a fonte comum de alimentos está contaminada com toxina botulínica. Em bovinos o botulismo já foi associado à alimentação com: cama de frango, resíduos de cervejaria, silagem, feno, grãos e carcaças em putrefação, bem como a fontes de água contaminadas com a toxina^[1,3,4]. O principal fator predisponente é a deficiência de minerais, especialmente de fósforo, que leva à sarcofagia e à osteofagia em carcaças de animais mortos no campo^[6]. Geralmente animais com mais de 2 anos de idade são mais atingidos, principalmente vacas lactantes ou gestantes, provavelmente por realizarem mais osteofagia, pois apresentam maior necessidade nutricional^[6].

Para que ocorra o botulismo é necessária uma combinação de circunstâncias: contaminação de um substrato adequado para o bacilo; multiplicação do organismo e produção de sua toxina; resistência da toxina aos processos autolíticos que podem degradá-la; e ingestão da toxina pelo animal suscetível. A evolução depende da quantidade de toxina ingerida, podendo levar à morte em 24 horas ou até mais de 7 dias. Em geral, fica em torno de 2 a 6 dias.

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos do botulismo se desenvolvem de 3 a 17 dias após a ingestão da toxina^[4,5]. O efeito externo no animal afetado é uma paralisia flácida que, quando progride, envolve os músculos respiratórios e resulta em morte. Distúrbios da visão também ocorrem, a locomoção é difícil, a língua frequentemente fica paralisada, a deglutição não ocorre devido à paralisia da faringe, e a paralisia respiratória finalmente leva à morte. O animal apresenta anorexia, adipsia, temperatura normal, salivação diminuída, mucosas ressecadas, e não há perda de sensibilidade

nem alteração do psiquismo. A paralisia muscular inicia nos membros posteriores e evolui para os anteriores^[6].

c) Patologia

Não apresenta lesões características na necropsia, nem mesmo histológicas. Por vezes, podem-se encontrar pedaços de ossos no rúmen, que é um indicativo de osteofagia e não necessariamente de botulismo^[6].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é feito pela demonstração da toxina botulínica no soro ou extrato hepático ou macerados filtrados de alimentos ou conteúdo intestinal ou ruminal. Isso é feito pela inoculação do material via intraperitoneal em camundongos (ensaio biológico)^[6]. Animais passivamente protegidos por antitoxina polivalente também devem ser inoculados. Se a toxina estiver presente, apenas camundongos não protegidos apresentam “cintura de vespa” e morrem. No caso de amostras de conteúdo intestinal e alimentos, devem ser tripsinizadas antes da inoculação para que a toxina precursora seja ativada. Esse teste é considerado o mais específico^[6]. A presença de esporos do *C. botulinum* em bovinos tem pouco valor diagnóstico uma vez que ele habita o trato intestinal dos animais domésticos^[2]. Microfixação de complemento pode também ser usada para identificar a presença da neurotoxina, porém é menos sensível que a prova biológica^[6]. A reação em cadeia da polimerase e métodos com base em sondas de ácidos nucleicos têm sido usados para detectar os genes que codificam a toxina de *C. botulinum*. Métodos imunológicos usando ensaios de ELISA ou de quimiluminescência são procedimentos sensíveis e específicos para detectar toxinas^[5], sendo importantes como métodos de triagem rápida.

e) Diagnóstico diferencial

Em bovinos, deve-se fazer o diferencial de hipocalcemia periparturiente e de enfermidades que afetam o sistema nervoso, tais como: intoxicação por chumbo, cloreto de sódio, levamizole e organofosforados; listeriose; encefalite por herpesvírus bovino-5; poliencefalomalacia e raiva herbívora^[6].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O envio da maior variedade possível de amostras é importante para facilitar o diagnóstico e também propiciar o diagnóstico diferencial. Recomenda-se o envio de fragmentos de fígado (250g), conteúdo ruminal e fragmento de intestino (amarrando as extremidades), resfriados ou congelados, além de metade do cérebro congelado, e a outra metade do cérebro e fragmentos das demais vísceras conservados em formol 10%^[6]. Alimentos também podem ser encaminhados para investigação de presença de toxina botulínica.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
3. ORTOLANI, E.L.; BRITO, L.A.B. Enfermidades causadas pelo uso idadequado de “cama de frango” na alimentação de ruminantes. **Revista CRMV**. v. 7, n. 22. p. 41-48, jan./abr. 2001.

4. ORTOLANI, E.L., et al. Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three Brazilian cattle herds. *Vet. Hum. Toxicol.* v. 39, p. 89-92. 1997.
5. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
6. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.5 Brucelose

Conceito

A brucelose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa de distribuição mundial que leva a abortos e complicações reprodutivas gerais, causando uma redução drástica na eficiência da produtividade dos rebanhos bovinos em torno de 20% a 25%. Além de proporcionar sérios prejuízos ao agronegócio da bovinocultura, trata-se de uma zoonose, portanto perigosa para a saúde do ser humano. Suas manifestações clínicas promovem a incapacidade total ou parcial ao trabalho.

Etiologia e Patogênese

A brucelose bovina é causada pela *Brucella abortus*, que apresenta sete biovaras, dos quais apenas os biovaras 1, 2, 3 e 7 foram encontrados no Brasil^[6,12]. Os bovinos também são suscetíveis a infecções por *B. suis* e *B. melitensis*^[4], porém esta última ainda não foi isolada no país. As bactérias do gênero *Brucella* apresentam formato de cocobacilos, são intracelulares facultativas, Gram-negativas, aeróbias, imóveis, não capsuladas e não formadoras de esporos^[9,12,13].

A bactéria penetra no organismo pela mucosa oral, nasofaríngea, conjuntival ou genital, ou pelo contato direto com a pele^[12]. Depois de vencer as barreiras naturais, as brucelas multiplicam-se e são levadas aos linfonodos regionais, onde são “fagocitadas” pelos macrófagos e pelas células reticulares. As bactérias resistem ao mecanismo de destruição das células fagocitárias devido à inibição da fusão do lisossomo com os grânulos secundários, sobrevivendo intracelularmente por longos períodos e evitando, assim, a ação do sistema de defesa. Dos linfonodos regionais dissemiram-se pelo organismo por via linfática ou hemática. No organismo, as localizações preferenciais são: linfonodos, baço, fígado, sistema reprodutivo, úbere, útero e, raramente, nas articulações e nos ossos, causando higromas que podem supurar. Devido ao tropismo do agente por eritritol, há uma grande concentração de brucelas nos testículos e no útero gravídico.

No útero gestante ela causa uma inflamação necrosante nos placentomas, impedindo a passagem de nutrientes e oxigênio para o feto, promovendo a morte fetal e consequente aborto^[2,11]. Nas gestações subsequentes há o desenvolvimento de imunidade celular por parte da fêmea e uma redução nos casos de aborto, porém, há retenção de placenta, natimortalidade e nascimento de proles fracas^[4].

No sistema reprodutor masculino, pode permanecer na forma crônica, a qual é assintomática, ou progredir para um quadro de orquite unilateral ou bilateral, com epididimite e vesiculite, levando à infertilidade do macho.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Existe em várias partes do mundo, mas, constantemente, novos países conseguem erradicá-la. Em toda a América Latina a brucelose é endêmica, e as taxas de infecção variam entre os países e de uma região para outra, mas são sempre maiores nos rebanhos leiteiros, com raras exceções em

regiões que realizam, há vários anos, programas de controle. As brucelas resistem bem à inativação no meio ambiente desde que não ocorram temperaturas elevadas, alta incidência de luz solar e baixa umidade. Em produtos não pasteurizados elas podem persistir durante vários meses^[12]. A pasteurização é um método eficiente de destruição das brucelas, assim como as radiações ionizantes^[4].

A ocorrência de brucelose em uma propriedade, normalmente, se dá pela introdução de animais assintomáticos cronicamente infectados^[7]. A principal fonte de infecção de um rebanho é a vaca com brucelose por ocasião do aborto ou parto, quando a placenta e o próprio feto abortado ou o bezerro apresenta grande concentração de brucelas recobrindo sua superfície^[4]. Fêmeas com retenção de placenta permanecem liberando secreções antes e depois do parto e contaminam o ambiente (pastagens, cochos, água, etc.)^[1].

A transmissão tem como principal via, em bovinos, a ingestão de água e pastagens contaminadas. A transmissão transplacentária é possível, e fêmeas nascidas de vacas brucelóticas podem apresentar anticorpos somente após o primeiro parto. A transmissão por monta natural dificilmente ocorre. Já a utilização de sêmen de touros contaminados é uma fonte importante de infecção para as fêmeas inseminadas^[10].

Em humanos é uma doença predominante de pessoas que trabalham diretamente com animais infectados e seus tecidos, especialmente tratadores, proprietários, veterinários, funcionários de matadouros e laboratoristas^[12].

b) Sinais clínicos

O principal sintoma da brucelose é o aborto, que pode ocorrer durante toda a gestação e é mais frequente após o quinto mês, especialmente após o sétimo mês de gestação^[12]. Outros sintomas são a retenção de placenta e a metrite por infecções secundárias, podendo levar a fêmea à esterilidade. Também natimortos e queda na produção de leite são sintomas comuns e significativos.

A enfermidade tem caráter epidêmico quando introduzida em propriedades livres causando surto de abortos. Um a dois anos mais tarde a doença adquire um caráter endêmico e se observa uma redução nos índices de aborto entre vacas adultas, as quais desenvolvem imunidade celular contra o agente, e permanência de altos índices entre as primíparas e animais sadios recentemente introduzidos.

Em machos os sintomas evidentes são a orquite e a epididimite, com fase inicial aguda e posterior cronização assintomática. A inflamação pode ser unilateral ou bilateral, transitória ou permanente, com aumento ou diminuição dos testículos, podendo apresentar degeneração, aderência e fibrose testicular^[4]. Esporadicamente se observam higromas e artrite^[12]. O quadro clínico não é patognomônico, embora o histórico do rebanho possa ajudar^[7].

c) Patologia

Em animais infectados não se verificam lesões significativas. Em casos de aborto há uma placentite necrótica e o feto pode apresentar edemas, líquido sero-hemorrágico nas cavidades, broncopneumonia e pneumonia intersticial^[10], entretanto, a autólise é comum, pois o aborto ocorre normalmente 24 a 72 horas após a morte do feto.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de brucelose pode ser feito tanto por diagnóstico direto, com identificação do agente, como por diagnóstico indireto, pesquisando resposta imunológica à infecção.

Para diagnóstico direto de brucelose pode ser usada a cultura e o isolamento a partir de tecidos e produtos dos animais infectados. O teste imuno-histoquímico de material abortado fixado em formol e o teste de PCR em amostras de secreções e excreções buscam detectar segmentos de DNA específicos de *B. abortus*^[4].

O diagnóstico indireto baseia-se na pesquisa de anticorpos produzidos durante a infecção bacteriana. Para tal, existe uma série de testes sorológicos disponíveis em nível mundial, como os testes de aglutinação (prova do antígeno acidificado tamponado, soroaglutinação lenta com 2-Mercaptoetanol), fixação de complemento, imunodifusão em gel, ELISA (indireto ou competitivo), polarização de fluorescência, hemólise indireta e *western blotting*^[4]. Um teste intradérmico com inoculação de brucelina, um extrato de *B. abortus*, tem sido usado^[14].

Segundo a legislação nacional, o teste de rotina a ser realizado para triagem diagnóstica é o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), também chamado de “rosa de bengala”. Os positivos nesse teste são submetidos a confirmação através do teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) paralelamente associado à soroaglutinação em tudo ou lenta (SAT). Para trânsito internacional o teste de referência exigido é o de fixação de complemento (FC). E para vigilância epidemiológica de rebanho, ficou determinada a utilização do teste do anel do leite (*ring test*) a partir do leite total do rebanho^[5].

Os diagnósticos sorológicos não devem ser realizados entre duas semanas antes e quatro semanas depois do parto, evitando resultados falso-negativos, pois nesse período a imunidade da fêmea está direcionada para ao colostro e aos líquidos fetais^[8]. Animais vacinados fora do período ideal de 3 a 8 meses de idade com vacina B19 apresentam positividade aos exames sorológicos, tornando-se falso-positivos. Entretanto, não há esse risco se imunizados com vacinas produzidas a partir da cepa rugosa RB51^[7].

e) Diagnóstico diferencial

As causas de abortos em bovinos são inúmeras, e é importante considerá-las no diagnóstico diferencial de brucelose^[11]. Enfermidades que causam reações cruzadas com a brucelose, como infecções por *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp., devem ser consideradas por ocasião dos diagnósticos laboratoriais.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Na coleta de amostras, dar preferência à amostragem de animais suspeitos. Para exames diretos coletar material de fetos abortados (linfonodo bronquial, conteúdo estomacal, baço, fígado, pulmão e suave retal), placenta, exsudatos vaginais, gânglios, leite e sêmen. Para exames indiretos encaminhar leite, plasma seminal, muco vaginal e, preferencialmente, soro^[3].

Referências bibliográficas

1. ALMEIDA, R.F.C., et al. Brucelose bovina: epidemiologia e controle. In: ALMEIDA, R.F.C., SOARES, C.O. e ARAÚJO, F.R. **Brucelose e tuberculose bovina: Epidemiologia, controle e Diagnóstico**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004. 95p.
2. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
3. MADRUGA, C.R., et al. Brucelose bovina: diagnóstico. In: ALMEIDA, R.F.C., SOARES, C.O. e ARAÚJO, F.R. **Brucelose e tuberculose bovina: Epidemiologia, controle e Diagnóstico**. Brasília, DT: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 95p.
4. MAPA. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT**. Brasília: MAPA, 2004. 132p. (MAPA, Manual Técnico)
5. _____. **Programa Naciomal de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose**. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 abr. 2009.
6. OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária. Guia Bacteriológico Prático**. 2. ed., Canoas: ULBRA, 2002. 237p.

7. POESTER, F.P. Brucellose, In: **Manual de Zoonoses: Programa de Zoonoses Região Sul**. v. 1. 1. ed.: CRMV-PR/ CRMV-SC/ CRMV-RS, 2009. p. 9-20.
8. POESTER, F.P., RAMOS, E.T.; THIESEN, S.V. Application of enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul - Brazil. **International Atomic Energy Agency**. p. 63-68. 1998.
9. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
10. RADOSTITS, O.M., et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suíños, Caprinos e Equinos**, 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
11. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
12. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
13. SCHURIG, G.G. **Brucella abortus vaccines: smooth and rough strains**. 2000. Disponível em: <<http://progress.box.co.1l/brunet/public.html>>. Acesso em: 07 mar. 2007.
14. WORTHINGTON, R.W., WEDDELL, W. e NEILSON, F.J.A. A practical method for the production of *Brucella* skin test antigen. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 41, p. 7-11. 1993.

1.6 Campilobacteriose

Conceito

A campilobacteriose genital bovina, antigamente chamada de vibriose, é uma enfermidade infecciosa de caráter venéreo, sendo responsável por prejuízos econômicos devidos a infertilidade temporária, morte embrionária, abortos e esterilidade enzoótica das fêmeas infectadas. A doença normalmente resulta em infecção subclínica que, muitas vezes, passa despercebida na maioria das propriedades. É uma enfermidade característica de propriedades que trabalham com monta natural e bastante rara quando do uso de inseminação artificial.

Etiologia e Patogênese

A doença é causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, que se caracteriza como Gram-negativa, apresenta-se na forma de vírgula, é móvel, não esporulada e microaerófila^[3]. A caracterização das espécies é feita por testes de catalase, produção de ácido sulfídrico e tolerância à glicina a 1%^[3,5]. A dessecção e a luz solar inativam a bactéria em poucas horas^[4]. O agente habita as pregas e criptas epiteliais do prepúcio e do pênis, geralmente de touros mais velhos, sendo liberada para as fêmeas durante a monta natural. A contaminação do rebanho ocorre pela introdução de um animal positivo^[4]. Uma vez depositados na vagina da vaca, os microrganismos multiplicam-se, atingindo o cérvix, os cornos uterinos e o oviduto em aproximadamente três semanas. A inflamação na mucosa uterina impede a fixação do óvulo fecundado e, consequentemente, determina a morte do embrião^[4,5].

A infecção é autolimitante e, passados 60 dias, há produção de anticorpos na vagina (IgA) e no útero (IgG), devolvendo à fêmea a vida reprodutiva normal^[4,5]. Infecções sucessivas poderão promover uma infertilidade transitória ou prolongada. Se a colonização da mucosa uterina ocorrer em período mais avançado da prenhez, poderá causar aborto. Um pequeno percentual de fêmeas mantém a enfermidade no plantel, e essas são chamadas de portadoras cervicovaginais. Outro agente é o *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, que é um comensal intestinal e causa abortos espontâneos em vacas na metade da gestação, sendo transmitido por via digestiva ou por fômites^[4,5].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A campilobacteriose é uma doença cosmopolita, apresentando caráter endêmico e também epidêmico, dependendo da forma de reprodução escolhida (monta natural ou inseminação artificial). A transmissão é via venérea. O *C. fetus* mantém-se por até 6 meses no canal genital feminino^[5], porém algumas fêmeas apresentam o agente um ano após a infecção^[1]. A idade dos touros é um fator epidemiológico importante, pois touros com mais de 5 anos de idade compõem o principal grupo de risco por possuírem o prepúcio mais caído e desprotegido – condição ideal para a instalação do *Campylobacter fetus venerealis*^[5]. Um dos grandes disseminadores da enfermidade dentro de um rebanho são os “touros repasse”, pois têm contato com um grande número de vacas em um curto período de tempo.

b) Sinais clínicos

Os touros são portadores assintomáticos. A infecção limita-se à cavidade prepucial, não apresentando alterações clínicas que façam suspeitar da enfermidade, mantendo a libido e a qualidade do sêmen.

As fêmeas apresentam morte embrionária, repetição de cio, infertilidade temporária, aumento do período entre cios, aumento do intervalo entre cio e prenhez e maior período entre partos^[5]. Após 3 a 4 meses ocorre recuperação do endométrio e o animal começa a ter os ciclos novamente. O aborto é raro, ocorrendo entre o 4º e o 7º mês de gestação^[4] em 3% a 5% das fêmeas enfermas. Normalmente não há retenção de placenta^[5]. Novilhas, por serem mais susceptíveis ao agente, servem como indicadoras da enfermidade, portanto apresentam sinais clínicos antes que as vacas.

c) Patologia

Nas fêmeas, a doença caracteriza-se por infertilidade temporária como resultado de cervicitite, endometrite, salpingite e vaginite catarral. A placenta apresenta necrose de cotilédones e edema. O macho não apresenta lesões aparentes, podendo ocorrer apenas infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria da mucosa prepucial e peniana.

d) Diagnóstico laboratorial

As manifestações da campilobacteriose são pouco evidentes. Portanto, são necessários exames de laboratório para estabelecer o diagnóstico, e imunofluorescência direta é um método eficiente para a detecção de animais portadores. Porém, para identificação de subespécie, são necessários exames bioquímicos (cultivo e isolamento), mucoaglutinação, que permite avaliar a presença de IgA no muco vaginal, e PCR^[1,5].

Tanto no macho como na fêmea, para considerar o animal como negativo, é recomendado que se façam, no mínimo, três coletas sucessivas^[1,4]. Para uma maior segurança no diagnóstico de rebanho indica-se a obtenção de amostras de pelo menos 12 animais^[1].

e) Diagnóstico diferencial

Deve ser feito o diagnóstico diferencial das enfermidades que cursam com problemas reprodutivos, como brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e, principalmente, com tricomonose, que se apresenta com história clínica semelhante.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material utilizado para diagnóstico de campilobacteriose é esmegma prepucial, muco vaginal e feto recentemente abortado que não esteja em processo de autólise. O esmegma prepucial

pode ser coletado por lavado ou raspado da mucosa do prepúcio. Deve ser coletado após um período mínimo de 10 dias de descanso sexual^[5], fazer três coletas com intervalo de 5 dias. Em fêmeas, a coleta do aspirado vaginal deve ser realizada 1 a 2 dias antes ou 4 a 5 dias depois do cio.

O material coletado deve ser enviado imediatamente ao laboratório, refrigerado, ao abrigo da luz e utilizando-se meio enriquecido de transporte, que prolonga a viabilidade do agente em até 72 horas. Para coleta de material em campo o meio de cultura que se tem mostrado mais eficiente no cultivo simultâneo de *C. fetus* e *Tritrichomonas foetus* com maior tempo de sobrevivência desses agentes é o *reed orr*^[1,5]. No caso de fetos abortados, devem ser de imediato enviados ao laboratório, conservados em refrigeração, com intuito de isolamento de agentes.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
3. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
4. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
5. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 573p.

1.7 Carbúnculo hemático

Conceito

O carbúnculo hemático é conhecido também como antracose, antrax, pústula maligna, carbúnculo bacteriano e febre esplênica. Em bovinos, a infecção por *Bacillus anthracis* causa uma doença hiperaguda caracterizada por septicemia e morte súbita. A doença é uma zoonose, que normalmente ocorre por inalação, produzindo lesões cutâneas denominadas pústulas malignas. É bastante grave, porém incomum^[1]. É de difícil controle, pois os esporos formados pelos bacilos do carbúnculo na presença de oxigênio são muito resistentes. O controle da moléstia baseia-se na imunização dos animais sensíveis à doença^[2,7].

Etiologia e Patogênese

O *Bacillus anthracis* é o agente etiológico do carbúnculo hemático. É um bacilo anaeróbico, imóvel, capsulado e Gram-positivo, de extremidades cortadas em ângulo reto, isolados ou dispostos em cadeia e produtor de esporos^[8]. Em presença de ar os bacilos dão origem a corpúsculos altamente refringentes, denominados esporos, os quais se localizam no centro do bastonete sem deformar o corpo bacilar^[2].

A infecção é adquirida por ingestão. Os esporos penetram em pequenas abrasões da mucosa da boca e da faringe. Em seguida, são transportados aos linfonodos locais, onde ocorrem germinação e multiplicação, que é seguida pela passagem, através dos vasos linfáticos, para a corrente sanguínea. Lá ocasionam septicemia com invasão maciça de todos os tecidos corporais.

A forma vegetativa do *B. anthracis* produz várias toxinas. A cápsula constituída de poli-D-glutamato pode atuar como um fator de disseminação do bacilo e de inibição de leucócitos. Possui três fatores de virulência, que ainda não são totalmente caracterizados: toxina do edema, antígeno protetor e toxina letal. Provavelmente as toxinas atuam de forma sinérgica nas infecções,

pois quando injetadas separadamente não produzem lesões. A ação conjunta das toxinas causa a morte dos animais resultando em choque, insuficiência renal aguda e anoxia terminal^[1,4,6].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Os bacilos na forma vegetativa não são muito resistentes às condições ambientais ou aos agentes físicos e químicos e são rapidamente destruídos por processos putrefativos em carcaças não abertas^[1,6]. No entanto, ocorre esporulação quando as carcaças são abertas ou quando as secreções que contêm bacilos ficam expostas ao ar. Os esporos maduros são extremamente resistentes. Resistem à dessecação por muitos anos, a agentes químicos e ao calor. Resistem, também, ao calor seco por uma hora a 120°C, e à fervura por 10 minutos^[9].

O carbúnculo hemático é relatado na maior parte dos (se não em todos os) países criadores de bovinos do mundo, embora a incidência varie de acordo com solo, clima e vacinação dos rebanhos. Os surtos graves ocorrem com maior frequência em países tropicais e subtropicais, com altas densidades pluviométricas^[6]. Neles, os esporos sobrevivem por décadas no solo, representando uma importante fonte de infecção^[1]. O ciclo de esporo da forma vegetativa a esporo novamente é que mantém a contaminação presente por muitos anos nas áreas enzoóticas^[3,9]. Em áreas deficientes de fósforo essa infecção tem maior importância, pois animais desenvolvem perversão de apetite e mastigam tecidos e, em particular, ossos de carcaças em decomposição na tentativa de minimizar a deficiência, e acabam contaminando-se com esporos ali presentes. Nessas áreas, o correto destino de carcaças de animais mortos é de fundamental importância.

Em países temperados ocorrem surtos esporádicos. Normalmente, a partir da ingestão de ingredientes alimentares contaminados (farinha de carne e farinha de ossos). Às vezes, a infecção é oriunda de efluentes de curtumes e de solo em locais em que carcaças de animais mortos por *Bacillus anthracis* foram enterrados alguns anos antes^[1] e de inundações. No Brasil, surtos ocorrem de forma esporádica, sendo relatados com maior frequência no Rio Grande do Sul^[6].

b) Sinais clínicos

Todas as idades são suscetíveis à infecção. O período de incubação varia de uma a duas semanas^[4]. No início do surto é mais comum a forma hiperaguda, em que geralmente os animais são encontrados mortos em poucas horas depois de se mostrarem saudáveis. Nas raras ocasiões em que se observa o animal doente, há ocorrência de febre, tremores musculares, dispneia, colapso, convulsões terminais e morte em uma a quatro horas. Na forma aguda, com curso de 24 a 48h, os principais sintomas são febre (em torno de 42°C), depressão, respiração rápida e laboriosa, diarreia e congestão hemorrágica nas membranas mucosas aparentes. Há, também, queda na produção de leite e vacas prenhas podem abortar.

c) Patologia

Devido à natureza hiperaguda ou aguda da enfermidade em bovinos, há pouca oportunidade para realizar exames laboratoriais *ante mortem*. Antes de realizar a necropsia de um animal que morreu subitamente ou após uma enfermidade de evolução muito rápida, é fundamental que se exclua a possibilidade de carbúnculo hemático para evitar a contaminação do ambiente e assegurar um descarte apropriado da carcaça. Portanto, deve-se fazer uma avaliação cuidadosa das circunstâncias e um exame preliminar completo da carcaça. Quando da não possibilidade de eliminar a suspeita de um caso de carbúnculo hemático, pode-se coletar uma amostra de sangue de um vaso superficial ou fluido sorossanguinolento, fazer um esfregaço, corá-lo com azul de meti-

leno^[2] e examiná-lo ao microscópio, onde se diferencia o *B. anthracis* das bactérias da putrefação por possuírem uma cápsula definida, que se cora de rosa^[4]. Em animais que foram tratados com antibiótico há dificuldade na identificação do bacilo.

Suspeita-se de carbúnculo sintomático quando: ocorrer rápida decomposição da carcaça após a morte, não se constatar *rigor mortis* e se observar exsudação de sangue alcatroado escuro em todos os orifícios naturais. A carcaça incha rapidamente e assume a conformação de cavalete^[4]. Quando da abertura da carcaça, pode-se contatar fluido sanguinolento em todas as cavidades corporais e hemorragias por toda a carcaça, ausência de coagulação sanguínea e enterite. O achado mais característico é a esplenomegalia, acompanhada do amolecimento do parênquima do baço e, às vezes, com ruptura da cápsula^[1,5,6]. Em animais tratados antes da morte as lesões são pouco evidentes^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de carbúnculo hemático se baseia na demonstração de bacilos capsulados no sangue periférico ou exsudato sorossanguinolento e na confirmação subsequente por isolamento e identificação laboratorial, além de testes biológicos para comprovação da patogenicidade.

e) Diagnóstico diferencial

Há varias causas de morte súbita em bovinos, tornando difícil o diagnóstico diferencial. Acidentes por descargas elétricas são causas frequentes de morte súbita, mas nesse caso haverá histórico de tempestades e indícios de pelos chamuscados. Edema maligno e carbúnculo sintomático apresentam semelhanças, mas as lesões, os edemas e a tumefação com crepitação são característicos nessas enfermidades. Leptospirose aguda em bovinos pode cursar com hemoglobinúria e anemia. A hemoglobinúria bacilar é característica por infarto hepático e hemoglobinúria.

Cultivo de sangue e esfregaços auxiliam na diferenciação dessas doenças. Morte por timpanismo gasoso agudo apresenta distensão abdominal por gás e exsudação de sangue por orifícios naturais^[6]. Também hipomagnesemia, intoxicação por chumbo e plantas tóxicas (*Atheleia glasio-viana*) podem apresentar morte súbita, e todas elas podem ser identificadas em exames *post mortem* e em exames laboratoriais apropriados. Porém, como já salientado anteriormente, tais procedimentos não devem ser realizados antes que se exclua a possibilidade de carbúnculo hemático^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser encaminhado ao laboratório pode ser orelha ou sangue e fluidos em seringa estéril, coletados por aspiração. O material deve ser retirado com cuidado, fazendo-se uso de luva e deve ser bem acondicionado para evitar contaminações de pessoas que o manipulem até a chegada ao laboratório^[6].

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A. H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. HIPÓLITO, O. e FREITAS, M. G. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 3. ed., Belo Horizonte: Melhoramentos. 1963. 157p.
3. JONES, T.C., JUNT, R.D. e KING, N.W. **Patologia Veterinária**. Barueri: Manoel, 2000.
4. RADOSTITS, O.M., et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
5. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.

6. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
7. SANTOS, L.M., et al. Carbúnculo Hemático. **REVISTA CIENTÍFICA ELETÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. n. 10, p. 1-5. 2008.
8. SCHILD, A.L., SALLIS, E.S.V. e SOARES, M.P. Anthrax in cattle in southern Brazil: 1978 – 2006. **Pesq. Vet. Bras.** v. 26, n. 4. 2006.
9. VERONECI, R. e FOCCACIA, R. **Tratado de infectologia**. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 2000. 606.p.

1.8 Carbúnculo sintomático

Conceito

O carbúnculo sintomático é uma doença infecciosa aguda causada pelo *Clostridium chauvoei* e caracterizada por inflamação dos músculos, toxemia grave e alta mortalidade. É comum em bovinos, podendo porém ocorrer também em ovinos e caprinos.

Etiologia e Patogênese

O *C. chauvoei* é um bacilo reto com extremidades arredondadas, Gram-positivo, anaeróbico e produtor de esporos, mantendo-se no ambiente por períodos prolongados^[2,4,6]. As toxinas produzidas por esse microrganismo incluem toxina alfa, com atividade hemolítica e necrotizante, hialuronidase, e desoxirribonuclease.

Acredita-se que a porta de entrada seja a mucosa intestinal, passando então para os vasos linfáticos e para a circulação sanguínea. Permanece adormecido ou latente (esporulado) no músculo e no fígado até que a massa muscular seja lesada de modo a fornecer um ambiente anaeróbio que propicie seu crescimento. Sua multiplicação nos músculos promove a liberação de toxinas que causam uma miosite hemorrágica grave^[5,6].

Outros clostrídios, incluindo *C. septicum*, *C. novyi* e *C. sordelli* podem, mais raramente, causar a enfermidade e frequentemente são encontrados junto com *C. chauvoei* nas lesões de carbúnculo sintomático^[6].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Os bovinos são suscetíveis dos 6 meses aos 2 anos de idade^[6]. Animais gordos são mais prováveis de desenvolver a doença do que animais com menor vigor nutricional, o que parece ocorrer pela maior concentração de glicogênio muscular, que serviria de substrato para o clostrídio. O *C. chauvoei* é originário do solo, mas a porta de entrada do microrganismo no corpo ainda permanece sob discussão. A troca dos dentes pode ser uma porta de entrada para o agente, o que explicaria a maior ocorrência em animais de 6 meses a 2 anos. A morbidade é de 5% a 25% e a letalidade, normalmente, é de 100%.

b) Sinais clínicos

Quando o organismo começa a se multiplicar, os efeitos necrotizantes, leucocidas e de disseminação da toxina alfa e da hialuronidase promovem o desenvolvimento da típica mionecrose. A área afetada é de cor marrom-avermelhada a preta. Tem uma consistência crepitante, esponjosa por conta do gás preso e é seco na superfície de corte. O animal fica muito deprimido, com anorexia, hipertermia e, na maioria das vezes, tem severa claudicação por causa da grande produção

de gás. Mais tarde, a sensibilidade é perdida e a pele fica firme. O animal morre em 12 a 36 horas, motivo pelo qual, muitas vezes, encontram-se os animais já mortos^[6].

c) Patologia

As lesões encontradas na necropsia são: presença de um tecido tumefato, descorado, enegrecido, com odor rançoso e um excesso de líquido sanguinolento, fino, contendo bolhas de gás na massa muscular acometida. Apesar que as lesões localizarem-se com maior frequência nos músculos das regiões superiores dos membros, devem ser inspecionados exaustivamente todos os músculos, incluindo língua, coração e diafragma, onde, ocasionalmente, podem estar presentes as lesões^[6]. A lesão muscular é uma miosite necrotizante característica.

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento e a identificação dos agentes podem ser comprometidos, pois muitas vezes se encontram outros clostrídios, como o *C. septicum*, o *C. novyi*, e o *C. sordelli*, que geralmente são invasores *post mortem*. Portanto, a necropsia deve ser realizada o mais rápido possível. A técnica utilizada para a identificação do agente é a imunofluorescência direta, método confirmatório rápido e sensível^[4]. A inoculação em animais de laboratório e sua posterior identificação pela microscopia a partir de exsudato peritoneal pode também ser utilizada. Um método de PCR para identificação de *C. chauvoei* a partir de tecido lesionado já foi descrito^[3].

e) Diagnóstico diferencial

O carbúnculo sintomático pode ser confundido com edema maligno, porém este está sempre associado a ferimentos que introduzem o *Clostridium* spp. no organismo e acomete animais de qualquer faixa etária. Outras enfermidades infecciosas hiperagudas semelhantes, como a hemoglobinúria bacilar e o carbúnculo hemático, afetam também animais maiores de 2 anos. Em bovinos em pastagens de leguminosas é frequente a confusão com timpanismo^[6].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o exame laboratorial podem ser coletados: fragmentos do músculo lesado, de fígado e baço, ou o osso metacarpiano ou metatarsiano (canela), desarticulado e descarnado. O ideal para coleta e remessa bem como para processamento é a punção, com seringa e agulha esterilizadas, do local da lesão, tendo-se o cuidado de vedar a entrada após a eliminação do ar contido no aspirado.

Os fragmentos de órgãos e músculos ou a punção devem ser enviados em caixas isotérmicas com gelo. O osso deve ser envolto em cal ou cloreto de sódio (sal comum), colocado em sacos plásticos e remetido o mais rapidamente possível ao laboratório^[1]. O diagnóstico diferencial, sobretudo nos casos de morte súbita, é essencial e assim é importante que se coleteem fragmentos de todos os órgãos e sejam remetidos em solução de formol.

Referências bibliográficas

1. BALDASSI, L. Clostridioses: enfoque às gangrenas gasosas. In: Anais do I Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, 1996, Guarulhos, SP. **Anais...** Guarulhos, SP: p. 7-9.
2. CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
3. KUHNERT, P., et al. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. **Veterinary Microbiology**. v. 51, p. 291-298. 1997.

4. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
5. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
6. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.9 Ceratoconjuntivite infecciosa bovina

Conceito

A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é uma doença infectocontagiosa que ataca principalmente bovinos, caracterizada por blefaroespasmo, conjuntivite, lacrimejamento, diferentes graus de opacidade da córnea e ulcerações. É também conhecida como *pink eye* (olho cor-de-rosa), peste do olho, doença do olho branco, *new forest disease*, oftalmia infecciosa e ceratite infecciosa lacrimal. É altamente contagiosa e normalmente ocorre na forma de surtos epidêmicos em rebanhos.

Etiologia e Patogênese

O microrganismo causador é a *Moraxella bovis*, uma bactéria Gram-negativa que faz parte da microbiota ocular de animais sãos e doentes^[2,4]. As cepas patogênicas são as possuidoras de fímbrias de aderência^[6].

A infecção ocorre quando a *M. bovis* presente na conjuntiva ocular, por algum fator ainda não elucidado, passa a sintetizar fímbrias de aderência^[5]. Pelas fímbrias o agente fixa-se a receptores presentes na córnea, no ducto lacrimal e na conjuntiva. Exotoxinas com atividade enzimática (hemolisina, colagenase, dermonecrotoxina e DNAse) causam uma desorganização das fibras de colágeno, promovendo uma lesão de córnea e proporcionando invasão bacteriana. A lesão desencadeia uma reação inflamatória, que produz edema, migração de células inflamatória e, consequentemente, opacidade córnea^[6]. Nessa fase, a ocorrência de infecção secundária é comum.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A enfermidade apresenta distribuição mundial. Afeta bovinos de todas as faixas etárias, sendo mais grave entre os mais jovens, menores de 2 anos de idade^[1]. É uma enfermidade estacional: a maioria dos surtos ocorre durante o verão e o outono. A sazonalidade da ocorrência da enfermidade está relacionada a vários fatores com efeito multiplicador, tais como: aumento do fotoperíodo, irritação causada por pó, ressecamento da superfície córnea, ação mecânica das pastagens, e ação de moscas e outros insetos^[6].

Atuam como vetores mecânicos da CIB moscas dos gêneros *Musca* e *Stomoxys*, mas não são essenciais para a transmissão, que também pode ocorrer por contato direto, aerossóis, e secreções nasais e oculares^[1].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos da CIB são primeiros observados 72 horas após a infecção com *M. bovis* e inclui vermelhidão, lacrimejamento com epífora, blefaroespasmo e fotofobia. Os animais buscam proteção da luz solar e fecham os olhos afetados. Na sequência (84 horas após a infecção), verifica-se a olho nu a lesão corneal, geralmente constituída de uma mancha branca de 1mm na parte central da córnea^[6].

Inicialmente, a córnea é clara ao redor da lesão, aparecendo depois uma pequena área de opacidade, que posteriormente fica mais densa. As lesões podem progredir ou regredir. A evolução da doença em condições de campo, normalmente, progride para uma ceratite crônica com córnea esbranquiçada que, dependendo da extensão, pode causar cegueira. Pode ocorrer também vascularização da córnea^[6]. A proporção de animais que se recuperam espontaneamente é alta. Durante um surto, observam-se todos os graus de severidade nos olhos afetados^[5].

c) **Patologia**

A lesão ocular pode ser unilateral ou bilateral, sendo possível observar a olho nu a presença de úlceras na superfície da córnea. A lesão causada pela *M. bovis* se origina no centro da córnea e progride centrifugamente^[6].

d) **Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial é obtido pelo isolamento e caracterização da *M. bovis*^[5,6].

e) **Diagnóstico diferencial**

Inicialmente, deve-se diferenciar de conjuntivite traumática e corpos estranhos, os quais, normalmente, estão restritos a casos isolados. A diferenciação de enfermidades virais deve ser considerada, como rinotraqueíte infecciosa bovina, febre catarral maligna e doença das mucosas^[3]. *Listeria monocytogenses* provoca opacidade da córnea, porém não é observada lesão característica de CIB. Apesar de não apresentar lesão de córnea, o carcinoma epidermoide, de localização palpebral comum em animais de mucosa ocular despigmentada, pode ser confundido com CIB.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material de eleição para diagnóstico é suave de líquido conjuntival de animais em fase inicial da doença que ainda não apresentaram lesões ulcerativas da córnea. Encaminhar o material conservado em caixa isotérmica com gelo.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. FRASER, R. e GILMOUR, I.J.L. The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis* from the eyes of cattle and sheep. **Research Veterinary Science**. n. 27., p. 127-128. 1979.
3. **Manual Merk de Veterinária**. 7. ed., São Paulo: Roca, 1997. p. 801-803.
4. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
5. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
6. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.10 Edema maligno

Conceito

Edema maligno, ou gangrena gasosa, em geral, são infecções exógenas e necrosantes de tecidos moles, porém pode haver infecção endógena. Cursa com inflamação aguda no local da in-

fecção e toxemia sistêmica profunda. O edema maligno é muito semelhante ao carbúnculo sintomático, e ambos têm sido denominados conjuntamente de gangrena gasosa.

Etiologia e Patogênese

O edema maligno, à semelhança das infecções por *Clostridium chauvoei*, é desencadeado pela ação das toxinas produzidas pelos agentes que determinam o quadro: *Clostridium septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii* e *C. perfringens* tipo A, entre outros, isolados de miosites em bovinos^[1,5].

O quadro de gangrena gasosa tem sua patogenia determinada pela somatória da ação das várias toxinas, e a alfa, produzida por todas essas espécies de *Clostridium*, se constitui na de fundamental importância, uma vez que tem atividade necrotizante e letal^[2].

A desvitalização tecidual associada a traumas proporciona baixa concentração de oxigênio, pH alcalino e decomposição de produtos proteicos requeridos à proliferação dos clostrídios^[4]. Essas circunstâncias permitem rápida proliferação e produção de toxinas de modo que os sinais clínicos se manifestam dentro de 48 horas^[1].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

O edema maligno, ao contrário do carbúnculo sintomático, pode ocorrer em todas as idades e espécies animais e, na maioria dos casos, a porta de entrada é um ferimento contaminado com um ou mais dos agentes acima citados. Muitas vezes, a aplicação de medicamentos, ou mesmo vacinas realizadas sem cuidado asséptico, pode ocasionar a infecção. Ferimentos de parto, castração ou descorna, ou na cavidade bucal ocasionadas por pastagens grosseiras^[3], entre outras lesões, podem servir como porta de entrada. Surtos ocorrem somente quando há traumatismo coletivo^[5]. A letalidade da gangrena gasosa é de 100%^[2].

b) Sinais clínicos

Os sintomas incluem febre, anorexia, taquicardia e depressão, mas ocorre toxemia, que faz com que o quadro evolua para a morte em geral dentro de 48 horas^[1,5]. É possível verificar manqueira, rigidez e tremores musculares^[1]. Há presença de áreas aumentadas de volume e crepitantes, que inicialmente são quentes e doloridas e, com a evolução da doença, se tornam frias e indolores.

c) Patologia

Diferente do carbúnculo sintomático, no edema maligno a lesão é mais uma celulite do que uma miosite, pois não há envolvimento muscular típico. A lesão está mais relacionada ao local de penetração, onde há edema hemorrágico, com maior ou menor quantidade de gás no tecido subcutâneo e entre os músculos. Pode-se observar líquido sero-hemorrágico nas cavidades^[5]. Há necessidade de a necropsia ser realizada o mais rápido possível em razão da rápida invasão bacteriana da carcaça e do início de alterações putrefatativas^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

Para confirmação de diagnóstico é necessário recorrer a exames laboratoriais das lesões. O método mais indicado é de imunofluorescência direta, podendo também ser realizado o cultivo e isolamento do agente.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser feito de picada de cobre, carbúnculo hemático e carbúnculo sintomático; neste último não há presença de ferimentos recentes e sempre se encontram lesões musculares.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Idêntica à coleta e remessa de amostras para diagnóstico de carbúnculo sintomático.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. BALDASSI, L. Clostridioses: enfoque às gangrenas gasosas. In: Anais do I Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, 1996, Guarulhos, SP. **Anais...** Guarulhos, SP: p. 7-9.
3. LEMOS, R.A.A. **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: UFMS, 1998.
4. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
5. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.11 Hemoglobinúria bacilar

Conceito

A hemoglobinúria bacilar (HB) dos bovinos é uma enfermidade infecciosa aguda que resulta num infarto hepático necrótico, caracterizando-se por morte de bovinos maiores de 2 anos em regiões de campos baixos e alagadiços, com manifestações de febre alta e hemoglobinúria.

Etiologia e Patogênese

O responsável pela enfermidade é o *Clostridium haemolyticum* (*C. novyi* tipo D), bactéria Gram-positiva anaeróbica e produtora de endósporos e de toxina b, uma lecitinase necrosante, hemolítica e letal^[2,3]. Habita fundamentalmente zonas úmidas e alagadiças, ambientes que também abrigam o *Lymnaea* spp., o caramujo hospedeiro da fasciola hepática^[1].

Após a ingestão, o clostrídio é transportado do trato gastrointestinal para vários órgãos, permanecendo como infecção latente. O aparecimento da enfermidade depende da presença de um foco de injúria hepática, que normalmente é causada pela *Fasciola hepatica*, em que se estabelecem condições de anaerobiose ideais para a multiplicação do *Clostridium*. A multiplicação bacteriana promove severa hemólise, que leva a dano endotelial e extravasamento de sangue para os tecidos e de plasma para as cavidades corporais.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A HB é epidêmica em determinadas regiões, principalmente após períodos de chuvas, e comum em áreas litorâneas. Normalmente, afeta bovinos maiores de 2 anos^[5].

b) Sinais clínicos

A HB é uma enfermidade aguda, e as mortes ocorrem em 12 a 24 horas. De modo geral, os animais são encontrados mortos sem observação prévia de sinais clínicos^[1,5]. Ocasionalmente, observam-se anorexia, depressão, dificuldade de locomoção, tremores musculares, urina de cor escura e fezes com sangue^[5].

c) Patologia

Os achados de necropsia são fundamentais para o diagnóstico, uma vez que a presença de áreas necróticas no fígado e hemorragias generalizadas nas serosas são características da enfermidade.

O fígado apresenta-se aumentado de tamanho e amarelado, com focos necróticos de até 10cm de diâmetro que apresentam odor fétido, coloração acinzentada e rodeados por uma zona hiperêmica. Pode observar-se, ainda, esplenomegalia, a urina é de cor vermelho escura e conteúdo intestinal hemorrágico.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é feito pela demonstração da toxina em extratos hepáticos ou por imunofluorescência direta^[5], porém ocorre reação cruzada com *C. novyi* tipo B e C^[4]. Isolamento e identificação são muito difíceis, uma vez que o microrganismo é muito exigente.

e) Diagnóstico diferencial

A HB pode ser confundida com outras clostridioses que cursam com quadro agudo, como carbúnculo sintomático e edema maligno, e com carbúnculo hemático^[5]. Deve também ser diferenciada de outras enfermidades que cursem com hemoglobinúria, como leptospirose aguda^[1] e intoxicação por samambaia (hematúria enzoótica)^[4]. Apesar de poder ser confundida com a babesiose e a anaplasmosse, a constatação dos parasitas em esfregaços sanguíneos as diferencia^[1,5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras para diagnóstico laboratorial constam de tecido hepático lesionado ou de esfregaço para identificação do agente ou demonstração da toxina, além de soro e esfregaço sanguíneo para diagnóstico diferencial. O material deve ser remetido o mais rápido possível ao laboratório, acondicionado em caixa isotérmica.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. HATHEWAY, C.H.L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 1, p. 66-98. 1990.
3. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
4. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
5. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.12 Leptospirose

Conceito

A leptospirose é uma zoonose de caráter mundial e é importante causa de aborto bacteriano em bovinos em todo o mundo, o que afeta diretamente a eficiência reprodutiva dos rebanhos. Ocorre em várias espécies de animais domésticos, causando septicemia, nefrite intersticial, anemia hemolítica, encefalite e aborto na maioria das espécies, além de mastite nos bovinos.

Etiologia e Patogênese

A leptospirose é uma doença causada por bactérias da ordem *Spirochaetes*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*, sendo Gram-negativas, não capsuladas e não esporuladas^[4]. As leptospiras patogênicas pertencem à espécie *Leptospira interrogans*, que apresenta mais de 212 sorovares, agrupados em 23 sorogrupo^[5,7]. Em bovinos, no Brasil, duas leptospiras têm maior importância como patógenos: *L. interrogans* sorovar *pomona*, que causa aborto e anemia hemolítica aguda; e *L. interrogans* sorovar *hardjo*, que causa aborto e mastite e tem sido associada, também, à infertilidade^[3,9].

Cada sorovar de *Leptospira* tem um hospedeiro natural, que atua como reservatório do agente, e hospedeiros acidentais, que podem sofrer infecções esporádicas. Outras leptospiras que podem causar doença em bovinos são *L. interrogans* sorovar *icterohemorragiae*, *L. interrogans* sorovar *grippotyphosa*, *L. interrogans* sorovar *wolffi*^[9], *L. interrogans* sorovar *canicola*^[1] e *L. interrogans* sorovar *szwajizak*^[8].

O agente ganha acesso aos animais após penetração epitelial e a disseminação ocorre via hematógena, com localização e proliferação em órgãos parenquimatosos, particularmente fígado, rins e baço e, algumas vezes, meninges^[9]. Algumas leptospiras têm uma hemolisina que causa hemólise intravascular, anemia, icterícia e hemoglobinúria. Em outras ocasiões, localizam-se no útero prenhe causando aborto. Em casos de septicemia ocorrem hemorragias em consequência de lesão endotelial^[9]. A leptospira tende a persistir em lugares como túbulos renais, olhos e útero, onde a atividade de anticorpos é mínima.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A leptospira é largamente distribuída no ambiente. As diferenças geográficas na distribuição dos sorovares são marcantes, mas a incidência e a prevalência da leptospirose são pouco conhecidas em muitos países e regiões^[9].

O principal reservatório da doença em um rebanho bovino são os próprios animais infectados, que disseminam a bactéria através de seus produtos de secreção^[10]. O agente coloniza os túbulos renais dos mamíferos e é excretado através da urina por vários meses (*L. hardjo* de 10 a 180 dias^[9]), sendo este o fato mais importante na transmissão da leptospirose^[8]. No hospedeiro-reservatório, a infecção é inaparente, não demonstrando sinal clínico. Portanto, a intensificação da produção tende a favorecer a transmissão da leptospirose bovina.

A persistência da bactéria no ambiente depende de condições favoráveis, como clima temperado e úmido e solos neutros ou alcalinos. Altas precipitações pluviométricas também favorecem a disseminação da infecção.

No Brasil, a leptospirose bovina é endêmica, sendo frequente em rebanhos de corte e leite. Embora a taxa de mortalidade nessa espécie seja baixa, em torno de 5%, a morbidade geralmente é elevada^[6].

b) Sinais clínicos

A maioria dos casos de leptospirose em rebanhos bovinos apresenta-se na forma subclínica, sem manifestação de sintomas. A enfermidade cursa com queda na produção de leite, abortos seguidos ou esporádicos, vacas apresentando retenção de placenta. Os fetos abortados encontram-se normalmente no terço final da gestação, mas podem encontrar-se em qualquer fase do 4º mês de prenhez ao termo^[8]. Pode também ocorrer a nascimento de bezerros fracos ou mortos^[9] caso a infecção ocorra no final da gestação.

A forma septicêmica acomete bezerros que são encontrados mortos ou com profunda depressão e hipertermia (41,1 a 41,7°C)^[8], morrendo em um período de 5 a 12 horas^[9]. Em alguns animais o curso clínico é de até 24 horas; neles se verifica profunda anemia, hemólise, hemoglobinúria e icterícia^[9].

Na forma mamária, a secreção láctea apresenta-se amarela ou alaranjada e com grande quantidade de grumos, sendo todos os quartos mamários afetados, há ausência de dor e o úbere apresenta-se flácido^[1,8]. A mastite por leptospira pode acometer de 30% a 50% do rebanho em seis a oito semanas e os sintomas tendem a regredir após 7 a 10 dias^[1].

c) Patologia

As lesões mais evidentes em ruminantes que morrem de leptospirose aguda resultam da hemólise intravascular e incluem anemia, icterícia, edema pulmonar e fígado pálido, friável e corado por bile. Os rins apresentam-se tumefatos e escuros devido à coloração por hemoglobina. Quando de curso crônico, os rins apresentam focos esbranquiçados^[9]. As hemorragias são numerosas e disseminadas. Microscopicamente, necrose tubular e nefrite intersticial podem ser observadas em alguns fetos^[2]; macroscopicamente, não se observam alterações^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

A técnica mais utilizada e confiável para o diagnóstico dos casos de aborto é a sorologia por microaglutinação de uma amostra de soro coletada imediatamente após o aborto. Considera-se que o aborto é causado por leptospires quando as vacas apresentam títulos iguais a ou maiores que 1/400 para o sorovar *hardjo* e 1/800 para o sorovar *pomona*^[9]. Não há necessidade de amostras pareadas, pois normalmente os abortos ocorrem de 1 a 4 semanas após a infecção; assim, não é observada a soroconversão pós-aborto. Para ter maior certeza, recomenda-se fazer a titulação no maior número possível de vacas abortadas e realizar estudos histológicos e bacteriológicos da placenta e do feto^[9]. A amostragem sorológica pareada é necessária quando se analisam amostras aleatórias de rebanho, e não somente de casos de aborto, para avaliar a elevação dos títulos de anticorpos para *Leptospira*.

Nos fetos e na placenta, para montar um diagnóstico de infecção por leptospires, faz-se necessário o uso de técnicas imunológicas como a imunofluorescência direta em *imprints* de rim, pulmão, fígado ou placenta, bem como a realização de testes sorológicos a partir da coleta do líquido da cavidade torácica do feto^[2].

Em casos de mastite, deve-se realizar o isolamento do agente no leite ou a titulação de anticorpos em amostras pareadas^[9]. A microscopia de campo escuro pode ser usada na identificação de leptospires na urina de animais portadores. Existem vários testes de ELISA desenvolvidos, porém são baseados em sorovariiedades predominantes em determinados países^[7].

e) Diagnóstico diferencial

Bovinos adultos que apresentam doença septicêmica aguda requerem diferenciação de hemoglobinúria bacilar, babesiose, hematúria enzoótica, febre catarral maligna e outras doenças que

cursam com “urina vermelha”^[8]. Salmonelose, febre aftosa e mastite devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da forma mamária^[1]. Em caso de aborto, diferenciar de salmonelose, diarreia viral bovina, brucelose, neosporose e rinotraqueíte infecciosa, entre outras causas que provocam aborto^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Como os fetos normalmente encontram-se em processo de autólise, eles não servem para diagnóstico. Portanto, indica-se a coleta de sangue para sorologia, e de urina e secreção uterina para exame microbiológico. No caso de mastite, indica-se coleta asséptica de leite para cultura e isolamento. As amostras devem ser encaminhadas para análise conservadas em caixa isotérmica com gelo.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. ANTONIASSI, N.A.B., et al. DIAGNÓSTICO DAS CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO EM BOVINOS. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 69-72, 2007. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v69_2/p69-72.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2009.
3. ARAÚJO, V.E.M., et al. Freqüência de aglutininas anti-Leptospira interrogans em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**. v. 57, n. 4. p. 430-435. 2005.
4. BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 16. ed., São Paulo: EDUSP, 1975. 1062p.
5. CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.
6. CARVALHO NETA, A.V., LAFETÁ, B.N. e MARCELINO, A.P. **Leptospirose bovina: Epidemiologia, Diagnóstico e controle**. 2006. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/?noticiaID=31116&actA=7&areaID=60&secaoID=183>>. Acesso em: 30 jun. 2009.
7. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
8. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
9. RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
10. VASCONCELLOS, S.A., et al. Leptospirose Bovina. Níveis de ocorrência e sorotipo predominante em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos Instituto Biologia**. v. 46, p. 7-15. 1997.

1.13 Mastite

Conceito

Mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária, independentemente da causa. Caracteriza-se por uma série de alterações físicas, químicas e organolépticas no leite, bem como por modificações patológicas do tecido glandular^[25,44]. É conhecida como a doença que mais prejuízos causa à cadeia leiteira mundial^[5,6,49,51,52]. As perdas causadas pela mastite se devem à redução da produção de leite, à interferência na qualidade e à redução da vida de prateleira do leite

processado e de seus derivados^[51]. Essa enfermidade surge também como um dos grandes entraves na busca por qualidade do leite, processo atualmente em curso na cadeia produtiva nacional. No Brasil, há estimativas que apontam uma variação de 20% a 38% na prevalência da doença^[18].

Etiologia e Patogênese

A mastite é uma doença etiologicamente complexa, podendo ser causada por microrganismos e suas toxinas, traumas físicos e agentes químicos irritantes. Na maioria dos casos, contudo, é resultante da invasão de microrganismos patogênicos pelo canal do teto^[40]. Cerca de 95% dos casos são provocados por algum agente bacteriano^[14], embora muitos microrganismos, incluindo fungos, algas, micoplasmas e vírus, possam causar a doença^[22]. Além disso, uma parcela dos casos de mastite pode ser de origem traumática^[15].

Mais de 130 agentes são descritos como isolados de casos naturais da doença ou demonstraram reproduzi-la experimentalmente^[39,63]. Os patógenos predominantes estão listados na Tabela 1. Apesar da grande variedades de agentes infecciosos, observa-se predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*^[30,53].

O *Staphylococcus aureus* é considerado o mais importante agente etiológico da mastite em diferentes países^[6,14,16,29,44], sendo causa predominante de mastite subclínica e também frequentemente isolado de mastite clínica^[7]. Devido a sua grande permanência na glândula mamária, é de difícil erradicação^[26].

Tabela 1. Patógenos frequentemente isolados em casos de mastite em bovinos.

Bactérias Gram Positivas	Bactérias Gram Negativas	Fungos e Leveduras
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Nocardia</i> spp.
<i>Staphylococcus coagulase negativos</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Prototheca</i> spp.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Proteus</i> spp.	
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Corynebacterium bovis</i>		
<i>Clostridium</i> spp.		
<i>Mycoplasma bovis</i> ¹		

1 - Bacilo álcool-ácido resistente.

Há uma crescente importância na infecção da glândula mamária de bovinos por *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN)^[56,65,66], causando elevadas contagens celulares (duas a três vezes acima dos valores normais dos quartos sadios) e diminuição na produção de leite, como verificado por Timms e Shultz (1987)^[59] e Mendonça et al. (1999)^[30]. Tem sido constado, também, aumento nos casos de *Corynebacterium bovis*^[27,41] e uma tendência de redução dos casos de *S. aureus* e *S. agalactiae*^[11]. Com relação ao perfil microbiológico dos rebanhos, os estudos são unâimes em apontar o *Staphylococcus* sp. como principal agente causador de mastites no Brasil^[2,9,11,17,28,47,58,62].

Após a penetração dos microrganismos pelo esfíncter do teto, eles se multiplicam no canal galactóforo e alcançam a cisterna do teto, replicando-se e distribuindo-se pelo parênquima mamário^[27]. Instalada a infecção, de imediato há aumento no fluxo de elementos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, para a área afetada. O agente adere ao epitélio ductular e secretor, dano-ficando o tecido e levando à formação de áreas ulcerativas^[55]. Com o agravamento da inflamação, há extravasamento de líquido celular com íons da reserva alcalina, como carbonatos e cloretos, tornando o leite levemente alcalino^[27]. O tecido secretor da área afetada, somado a células de defesa e secreções, acaba obstruindo os dutos lactíferos, que drenam a área glandular afetada, podendo ocasionar involução de alvéolos, necrose, substituição por tecido conjuntivo ou fibroso e formação de pequenos abscessos^[55]. Esses danos são os responsáveis pela significativa redução na produção de leite em animais acometidos.

A mastite ainda é uma doença não passível de erradicação e, sendo assim, todos os esforços devem ser concentrados no sentido de manter a sua prevalência o mais baixo possível. Para tal, o controle periódico dos fatores predisponentes da doença é indispensável, e a vacinação é um importante recurso no auxílio da prevenção.

Mecanismos de defesa da glândula mamária

A glândula mamária está envolvida em dois tipos de imunidade: a transferência da imunidade ao recém-nascido e a própria proteção contra infecções. Trataremos apenas do segundo aspecto, que está relacionado à ocorrência, à frequência e ao desenlace das infecções intramamárias nos bovinos leiteiros.

A imunidade na glândula mamária pode ser, como em outros sistemas, classificada em dois tipos: a imunidade inata, ou inespecífica, e a imunidade adquirida, ou específica. Os próprios nomes são autoexplicativos: a imunidade inata independe de um contato prévio com o agente patogênico, pois é pré-existente, e age da mesma maneira qualquer que seja o agente patogênico. Por outro lado, a imunidade adquirida é um processo de aprendizagem do sistema imune voltado ao combate de um agente patogênico único. Por isso, requer um contato prévio com esse agente, de forma a desencadear no organismo o processo de reconhecimento e eliminação do patógeno. Esse contato pode ser uma infecção anterior, a presença do agente em outros pontos do organismo, ou a vacinação contra o agente^[61].

A imunidade inata compreende os mecanismos intrínsecos da glândula mamária, os quais, com exceção de um pequeno número de células “residentes”, são não fagocitários: defesa do duto do teto; defesa humoral não específica de secreções mamárias; atividade linfocítica e imunoglobulinas da glândula mamária. A imunidade adquirida compreende a resposta polimorfonuclear e os eventos a ela associados: células fagocitárias na glândula mamária; resposta inflamatória e recrutamento de células polimorfonucleares (PMN); opsonização e fagocitose; atividade microbicida dos fagócitos^[13].

O teto e o canal constituem a primeira linha de defesa da glândula mamária^[24]. A queratina presente contém fatores bacteriostáticos, e a roseta de Furstenberg – na entrada do canal – tem uma população de leucócitos protetores e proteínas catiônicas bactericidas, e funcionar como uma barreira física. A descamação de células queratinizadas da superfície epitelial do canal do teto pode contribuir para o mecanismo de remoção de bactérias neste local, além de os ácidos graxos presentes na camada queratinizada exercerem efeito bacteriostático.

A ação do fluxo do leite ao longo da glândula mamária também age como um mecanismo de defesa natural^[42]. Lesões do orifício e, em casos mais graves, necrose da abertura, com rachaduras que se irradiam dela, podem servir de abrigo para agentes patogênicos como o *Staphylococcus* sp.^[24], aumentando os riscos da infecção.

Uma vez que o agente patogênico atravessou o canal do teto e alcançou a cisterna mamária, passam a atuar especialmente os fatores solúveis, chamados lacteninas (sistema lactoperoxidase, sistema complemento, lisozima e lactoferrina), e as células fagocitárias da imunidade inespecífica (macrófagos, neutrófilos e células semelhantes às células assassinas naturais ou *natural killer-like cells*)^[57,60,61].

Entre os fatores solúveis, a enzima lactoperoxidase (sintetizada pelo epitélio mamário) é um dos mais importantes^[42,61]. Ela tem uma ação bactericida ampla, sem afetar as células do organismo^[64].

O complemento é considerado um fator quimiotático para o recrutamento de células fagocitárias para o local da infecção^[61]. Sua concentração é alta no colostro e no leite proveniente de vacas com mastite, porém baixa em leite normal^[36]. Um de seus componentes, C5a, apresenta grande variabilidade entre vacas, o que pode ser um dos fatores da maior suscetibilidade dos animais que produzem menos C5a^[24], podendo ser uma das explicações para a maior capacidade genética de resistência a mastites por parte de alguns animais^[45].

A lisozima é uma proteína bactericida ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas como está presente em baixa concentração no leite bovino, sua importância é incerta em comparação com outros mecanismos de defesa^[42].

A lactoferrina ocorre em maior concentração na glândula mamária seca, mas também é encontrada no leite. Seu papel é o de competir com as bactérias pelo íon Fe+, essencial ao metabolismo bacteriano, tornando-o indisponível, assim impedindo o crescimento bacteriano e, consequentemente, potencializando a explosão respiratória neutrofílica^[60,61]. A maioria das bactérias necessita de ferro livre para seu metabolismo, e a lactoferrina interfere nesse processo, impedindo a formação de enzimas necessárias à sobrevivência bacteriana^[21]. No entanto, algumas bactérias são capazes de competir com a lactoferrina para obter o ferro necessário para o seu metabolismo e, dessa forma, sobreviver^[61], como é o caso de algumas cepas de *Staphylococcus*.

As defesas celulares inespecíficas na glândula mamária normal são representadas principalmente pelos macrófagos, que são células fagocitárias profissionais, além de células dendríticas, que são potentes apresentadoras de抗ígenos presentes em ruminantes^[12] e demais células brancas (neutrófilos e linfócitos), em menor proporção. Essas células são capazes de reconhecer estruturas na superfície das bactérias que são bastante conservadas dentro de uma classe de patógenos^[61], ou seja, ante uma infecção são responsáveis por uma resposta imunológica defensiva centralizada na glândula afetada, desencadeando uma inflamação. O processo inflamatório induz a aumento do fluxo sanguíneo e migração de células de defesa (células somáticas), em grande quantidade, do sangue para o leite por meio de um processo denominado quimiotaxia^[38]. Os mecanismos dessa atração são muitos e complexos, e entre eles estão o complemento (fragmento C5a), a interleucina - 1b, o Fator de Ativação de Plaquetas, o Fator de Necrose Tumoral - α e as selectinas^[61].

Na glândula mamária sadia, a contagem de células somáticas (CCS) é geralmente menor que 100.000cel/ml de leite. Essa contagem eleva-se rapidamente com a presença de bactérias no interior da glândula, podendo chegar a 1.000.000cel/ml dentro de poucas horas^[52].

O acúmulo dessas células somáticas se dá principalmente pelo aumento do número de neutrófilos (cerca de 90% do aumento celular), capazes de fixar, ingerir e destruir substâncias estranhas mediante o processo de fagocitose^[3]. No entanto, essas células apresentam uma eficácia limitada perante microorganismos estranhos, pois a atividade fagocitária é inibida pela fagocitose dos componentes do leite, como a caseína e a gordura^[52].

As células fagocitárias inespecíficas são responsáveis também por apresentar抗ígenos, estimulando ou ativando a imunidade específica. A imunidade adquirida, ou específica, constitui um

sistema que não somente reconhece e destrói os抗ígenos invasores, mas também retém “memória” do episódio^[60]. Se o mesmo microrganismo invadir pela segunda vez o sistema imunológico, a reação ocorre com maior prontidão e eficácia. O sistema imunológico adquirido consiste em duas porções principais que proporcionam resistência aos invasores: uma através de anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) denominada imunidade humoral, e a outra como imunidade mediada por célula ou imunidade celular, por meio de células fagocitárias ativadas.

Sendo a atuação conjunta de ambos pela opsonização e posterior fagocitose (Figura 1) a responsável pela maior eficiência da resposta imune específica na glândula mamária, a função dos anticorpos no leite é marcar (“opsonizar”) os microrganismos estranhos, facilitando, assim, o reconhecimento destes para a fagocitose e a consequente destruição intracelular por células do sistema imune.

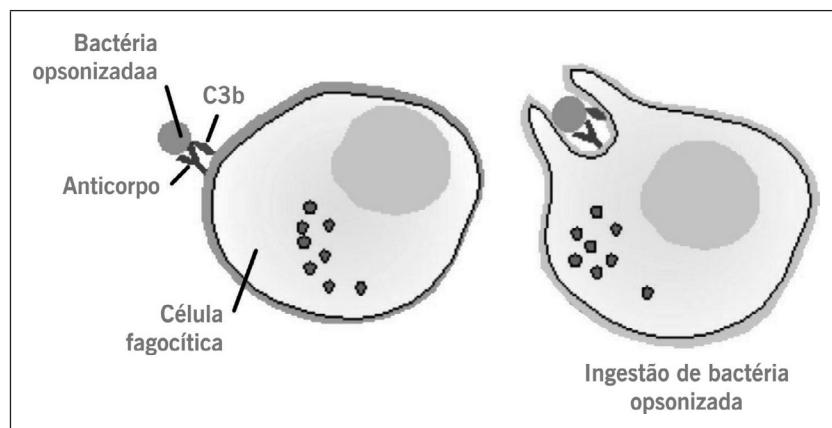


Figura 1. Ilustração do processo imunológico de opsonização e fagocitose na glândula mamária.

Fonte: Adaptado de Baselga & Albizu (2004).

A imunidade específica na glândula mamária dos ruminantes apresenta algumas particularidades relevantes. Primeiramente, embora a imunidade celular tenha um papel importante no desencadeamento e na manutenção da resposta imune pelas linfocinas^[54], a fagocitose em si encontra-se muito prejudicada pela saturação das células fagocitárias com micelas de caseína e glóbulos de gordura^[50]. Além disso, a população local de células produtoras de anticorpos é reduzida na glândula mamária^[32]. Por isso, a maior parte das células imunitárias presentes neste órgão tem origem sistêmica, chegando à glândula como consequência de uma agressão infecciosa, e são constituídas principalmente por neutrófilos. Essa população celular constitui a maior parte das células somáticas^[61]. Nos ruminantes essas células apresentam receptores para IgG2 e não para IgG1^[10,13,19,33,34,43], o que dificulta uma eficiente opsonização dos抗ígenos bacterianos, uma vez que normalmente a IgG1 é a imunoglobulina predominante na glândula mamária^[60] e estimulada por vacinas^[61]. No entanto, esse isótopo de imunoglobulina “opsoniza” a fagocitose por macrófagos^[42].

Há muito se sabe que a imunidade na glândula mamária é baseada na combinação anticorpos-fagocitose por neutrófilos^[41]. A associação é necessária, pois os neutrófilos mamários apresentam menor eficácia em relação a fagocitose, já que esgotam sua capacidade fagocitária ao englobarem micelas de caseína e partículas lipídicas em vez de promover a fagocitose de patógenos^[37,42,50]. A opsonização dos抗ígenos direciona a fagocitose contra eles, aumentando sua eficácia^[20,23]. Isso deve acontecer preferencialmente por opsoninas IgG2, pois os receptores presentes na superfície dos neutrófilos mamários são para esse isótopo de imunoglobulina^[10].

Paralelamente, os agentes patogênicos procuram evitar a fagocitose, produzindo cápsulas antifagocitárias, como no caso do *Staphylococcus* sp.^[35]. Consequentemente, a imunidade contra mastite por *Staphylococcus* sp. está relacionada a tipos sorológicos capsulares, que são específicos e com limitada imunidade cruzada.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A mastite é uma doença de acometimento mundial e de origem multifatorial, e sua maior ou menor ocorrência e intensidade são consequências da interação de fatores relacionados ao animal, aos patógenos e ao ambiente. Esses fatores sofrem influência direta do manejo ao qual o rebanho é submetido^[8]. Devido à complexidade dos fatores predisponentes, a dinâmica da enfermidade é peculiaridade de cada rebanho.

Considerando-se a epidemiologia, as mastites são divididas em ambientais e contagiosas. Mastites contagiosas são causadas por microrganismos cujo habitat preferencial é o úbere de vacas infectadas. Portanto, a transmissão ocorre principalmente de quartos infectados para sadios durante a ordenha. Caracteriza-se por baixa incidência de casos clínicos e alta de subclínicos, normalmente resultando em infecções crônicas. No caso das mastites ambientais, em geral, o ambiente é o reservatório de microrganismos infecciosos. A transmissão se dá, geralmente, entre as ordenhas ou durante a preparação do úbere para a ordenha, devido à exposição do teto a ambientes altamente contaminados. Caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos (reação inflamatória aguda), geralmente de curta duração.

Esta enfermidade ocorre, geralmente, via canal do teto, principalmente após a ordenha, quando o esfíncter se encontra relaxado, facilitando a penetração dos agentes. A presença de lesões nos tetos também favorece a infecção^[1].

Alguns fatores epidemiológicos influenciam na ocorrência e dinâmica das mastites no rebanho, como o estágio de lactação, a produção de leite, o número de lactações, a época do ano, e as instalações^[1,27], associados a falta de higiene e desinfecção. Isso apesar de não haver diferenças marcadas na suscetibilidade à mastite.

b) Sinais clínicos

Classicamente os sintomas da mastite se caracterizam por redução na produção láctea, leite com coloração branco-amarelada a rosada, geralmente com grumos, e glândula mamária apresentando concreções duras e fibrosas, com assimetria de quartos mamários, hipertermia, hiperemia, sensibilidade exacerbada, que às vezes dificulta a locomoção do animal e a ordenha, e aumento de linfonodos retromamários.

Quanto à forma de manifestação, as mastites são classificadas em clínicas e subclínicas^[18,44]. Mastites clínicas apresentam alterações no úbere (edema, sensibilidade, hiperemia e hipertermia) além de alterações visíveis no leite (dessorado ou com presença de grumos, pus e sangue), podendo apresentar comprometimento sistêmico. Portanto, é a mais evidente e que maiores preocupações traz aos produtores. Entretanto, a forma mais comum e responsável pelos maiores prejuízos é a subclínica, a qual causa queda na produção e alteração na composição do leite, porém geralmente passa despercebida por ser assintomática. A mastite é diagnosticada por meio de exames complementares, como *California mastitis test* (CMT), *Wisconsin mastitis test* (WMT) e Contagem de células somáticas (CCS). No Brasil, 70% dos danos são devidos à mastite subclínica, e os 30% restantes refletem a mastite clínica^[18]. Cabe ressaltar que a mastite subclínica apresenta prevalência muito maior que a mastite clínica, sendo responsável por 90% a 95% dos casos da doença^[18,52].

As mastites subclínicas são normalmente causadas por bactérias Gram-positivas em forma de cocos, que são transmitidas de um animal para outro durante a ordenha. Os estafilococos são causadores da maioria das infecções subclínicas da glândula mamária e tendem a permanecer por longo tempo nas vacas infectadas^[61].

c) Patologia

As alterações patológicas na maioria das mastites não são de importância para o diagnóstico da doença^[48]. Nos casos de mastites crônicas, a glândula pode apresentar-se fibrosada, com atrofia de parênquima ou com focos inflamatórios tendendo a formar abscessos ou fístulas e possivelmente supurar^[48]. A lesão pode ser granulomatosa no caso de infecções por *Mycobacterium bovis* ou *Nocardia* spp., ou até mesmo necrótica, quando causadas por *Clostridium* spp.

d) Diagnóstico laboratorial

A mastite deve ser mantida em níveis aceitáveis. Não há erradicação, portanto o princípio para um programa de controle e profilaxia da enfermidade é o diagnóstico da infecção, ou seja, o conhecimento do nível de infecção do rebanho, momento em que se torna imprescindível a realização de exames auxiliares e apoio laboratorial.

Diagnóstico da mastite clínica

O diagnóstico da mastite clínica baseia-se no exame da glândula mamária e de sua secreção.

Exame físico do úbere: é o exame minucioso da glândula mamária logo após a ordenha (glândula vazia), no qual se buscam alterações físicas tais como dor, rubor, alteração da consistência do tecido mamário ou presença de nódulos, edema ou inchaço, pela inspeção ou palpação^[27,52].

Teste da caneca de fundo preto: deve ser realizado anteriormente a cada ordenha para examinar as características físicas do leite. Consiste na retirada dos três primeiros jatos de leite em superfície escura com a finalidade de observar alterações no leite, tais como presença de grumos ou coágulos, pus, sangue ou aquosidade^[27]. O exame é realizado com o uso da caneca ou coador com fundo escuro ou telado, facilitando a identificação das alterações^[52].

A utilização de extratores automáticos de ordenhadeiras reduz o contato do ordenhador com o úbere, o que diminui a identificação de mastites clínicas. Alguns equipamentos de ordenha contêm sensores que identificam a presença de anormalidade na secreção pela condutividade elétrica, sendo provável o aumento de sua utilização^[1].

Diagnóstico da mastite subclínica

Vários são os testes que podem ser aplicados à secreção láctea no intuito de detectar a mastite subclínica. Em geral, avaliam a contagem de células somáticas ou identificam a presença de microrganismos patogênicos.

Quando há invasão da glândula mamária por um agente patogênico, ocorre recrutamento de células de defesa para o local com o objetivo de solucionar o processo infeccioso. Essas células de defesa, somadas às células de descamação do epitélio secretor de leite dos alvéolos, são chamadas de células somáticas do leite. Portanto, quando há presença de microrganismo patogênico na glândula mamária, geralmente a contagem de células somáticas (CCS), que é de 50.000cel/ml de leite em uma vaca sadia, se eleva acima de 200.000cel/ml de leite), sendo o aumento na CCS a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica. Desse modo, a avaliação do teor de células somáticas do leite serve como base para os testes de identificação da mastite subclínica.

CMT (California Mastitis Test): é um teste dos mais utilizados. É prático, rápido, repetível e barato para o diagnóstico da mastite subclínica, além de fornecer informação individual por quarto mamário^[1]. Seu princípio baseia-se na estimativa indireta da contagem de células somáticas no leite. Para isso, é utilizado um detergente aniônico neutro que atua rompendo a membrana das células presentes na amostra de leite e liberando o material nucleico (DNA), o qual possui alta viscosidade. Ao misturar o leite com o detergente, forma-se um gel que será mais viscoso quanto maior a proporção de células somáticas. Os resultados são dados em uma escala de 1 a 5 (negativo, suspeito, fracamente positivo, positivo e fortemente positivo). Os escores 2, 3, 4 e 5 são considerados positivos para mastite subclínica^[48,52]. Resultados mais intensos não indicam maior gravidade do problema, e sim maior intensidade da reação inflamatória.

WMT (Wisconsin Mastitis Test): é um aprimoramento do CMT, realizado em tubo graduado com a finalidade de eliminar a subjetividade na interpretação dos resultados do CMT, portanto é um teste quantitativo. Este teste utiliza o mesmo princípio do CMT, porém usa-se uma solução de hidróxido de sódio^[1]. Empregam-se quantidades iguais de reagente e leite em tubo perfurado cujo orifício apresenta 1,15mm de diâmetro. Faz-se, então, a homogeneização dessa mistura, deixando-se, em seguida, escoar o líquido por 15 segundos e retorna-se à posição original do tubo. O resultado do teste é expresso em milímetros, o que, por sua vez, está relacionado com a contagem de células somáticas^[52].

Condutividade elétrica: baseia-se no princípio de que o leite das vacas com mastite apresenta alteração na composição iônica em decorrência de lesão do epitélio secretor ou alteração da permeabilidade vascular^[1,52]. O quadro determina aumento na concentração de sódio e cloro no leite, e redução nos níveis de potássio e lactose, gerando, assim, aumento na condutividade elétrica. Este teste apresenta algumas limitações, uma vez que existe variação individual normal entre as vacas. É mais confiável o uso de sensores acoplados ao equipamento de ordenha em detrimento do uso de equipamentos portáteis para avaliações pontuais. Permite-se, assim, o acúmulo de informações sobre os valores diários individuais de cada vaca, possibilitando a identificação de variação na condutividade elétrica em uma ordenha, comparada à média das ordenhas antecedentes^[52].

Contagem eletrônica de células somáticas (CCS): a contagem celular envolve o uso de microscópios ou de contadores celulares eletrônicos. A CCS é realizada a partir de amostras individuais das vacas (compostas dos quatro quartos) ou do rebanho. A CCS é um bom indicador da probabilidade de ocorrência de uma infecção intramamária: quanto maior a CCS, maior é a probabilidade de que a vaca esteja infectada^[52]. Baseadas em CCS, amostras com mais de 250.000cel/ml sugerem ocorrência de infecção. Por meio deste teste não é possível identificar teto individual, além de proporcionar o efeito de diluição que, em algumas situações, causa falsos negativos, diluindo as células somáticas de um quarto infectado com os demais sadios^[31].

Outros fatores, além das mastites, podem influenciar na contagem de células somáticas, como: o estágio de lactação sendo maior, as contagens no início e final da lactação, a idade do animal e o estresse^[27,48].

Análise microbiológica do leite: o isolamento microbiológico de patógeno em amostra de leite coletada assepticamente é considerado o método diagnóstico padrão para a mastite^[46,52]. A identificação da espécie do microrganismo é feita por meio de cultura microbiológica: distribui-se um volume de leite na superfície da placa de ágar, que deve ser encubada durante 24 a 48h a 37°C^[1]. Essa análise tem como vantagens o exame microbiológico, a possibilidade de identificar o patógeno causador e a realização do teste de sensibilidade antimicrobiana. É útil para recomendações de tratamento e descarte e, principalmente, para adoção e monitoramento de medidas de controle^[27].

e) Diagnóstico diferencial

Em casos de mastite aguda que promova comprometimento sistêmico, deve-se diferenciar de outras doenças sistêmicas que cursem com elevação da temperatura, porém normalmente a mastite cursa com sintomas da glândula mamária ou da secreção.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os métodos detalhados de coleta de leite cru para exame bacteriológico e CCS e os procedimentos de remessa do material ao laboratório estão descritos no item 4.15 deste capítulo.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v. 2, n. 2. p. 31-36. 2001.
3. BASCUÑÁN, C.C. Perspectivas da estimulação da resposta imune da glândula mamária bovina. In: DÜRR, J.W., CARVALHO, M.P.D. e SANTOS, M.V.D. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UFP, 2004. v. 105, 129p.
4. BASELGA, R.; ALBIZU, I. **Exopolisacarídeos capsulares bacterianos**. 2004. Disponível em: <www.exopol.com/exo>. Acesso em: 25 nov. 2004.
5. BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet J.** v. 164, n. 2. p. 116-128. 2002.
6. BRAMLEY, A.J., et al. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed., Madison: National Mastitis Council. 1996. 64p.
7. BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. **J Dairy Res.** v. 51, n. 3. p. 481-512. 1984.
8. BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Mastite Bovina**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2000. 65p.
9. BRITO, M.A.V.P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.** v. 51, n. 2. p. 33-35. 1999.
10. BURTON, J.L.; ERSKINE, R.J. **Immunity and mastitis: some new ideas for an old disease**: The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. W.B. Saunders Company, 2003.
11. COSTA, B.O. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.** v. 17, n. 4. p. 21-26. 1995.
12. COUGHLAN, S., HARKISS, G.D.; HUPKINS, J. Enhanced proliferation of CD4+ T cells induced by dendritic cells following antigen uptake in the presence of specific antibody. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 49, p. 321-330. 1996.
13. CRAVEN, N.; WILLIAMS, M.R. Defense of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 10, p. 71-127. 1985.
14. DODD, F.H.; BOOTH, J.M. Mastitis and Milk Production. In: ANDREWS, A.H. **The Health of Dairy Cattle**. Malaten: Blackwell Science, 2000. 359 p.
15. DOMINGUES, P.F. **Controle da Produção Leiteira na Mastite Bovina Subclínica**: 1993. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 1993.

16. ENEVOLDSEN, C., GROHN, Y.T.; THYSEN, I. Dairy cow characteristics related to *Staphylococcus aureus* isolation from quarter samples. **J Dairy Res.** v. 62, n. 1. p. 69-81. 1995.
17. FELIPPSEN, L.F. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região Norte do Paraná. **Ciência Rural**. v. 29, n. 1. p. 87-89. 1999.
18. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
19. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes**. São Paulo, SP: Varela, 1996.
20. GUIDRY, A.J., BERNING, L.M.; HAMBLETON, C.N. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. **J Dairy Sci.** v. 76, p. 1285-1289. 1993.
21. HAGIWARA, S.; KAWAI, K. Lactoferrin concentration in milk from normal and subclinical mastitic cows. **J Vet Med Sci.** v. 65, n. 3. p. 319-323. 2003.
22. HILLERTON, J.E. Controle da mastite bovina. In: BRITO, J.R.F.; BRESSAN, M. **Controle integrado da mastite bovina**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 111 p.
23. HOGAN, J.S. et al. Opsonic activity of bovine serum and mammary secretion after *Escherichia coli* J5 vaccination. **J Dairy Sci.** v. 75, n. 1. p. 72-77. 1992.
24. KEHRLI, M.E.JR.; HARP, J.A. Immunity in the mammary gland. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** v. 17, n. 3. p. 495-516, vi. 2001.
25. LADEIRA, S.R.L. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L.; MENDES, M.D.C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Pelotas: UFPEL Universitária, 1998. 65 p.
26. LAMMERS, A. et al. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. **Vet Microbiol.** v. 80, n. 3. p. 255-265. 2001.
27. LANGONI, H. Mastite bovina: conceitos e fundamentos. In: IV Encontro de Pesquisadores em Mastites 2007, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, SP: FMVZ - UNESP, p. 8-17.
28. LARANJA, L.F.; MACHADO, P.F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. **Sci. agric.** v. 51, n. 3. p. 578-585. 1994.
29. LONGO, F. et al. Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. **Revue Méd. Vet.** v. 145, n. 1. p. 43-47. 1994.
30. MENDONÇA, C.L. et al. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícia**. v. 5, n. 1. p. 107-118. 1999.
31. MOLINA, L.R. Diagnóstico, controle e monitoramento da ocorrência de mastites em rebanhos leiteiros. **Leite Integral**. v. 3, p. 24-46. 2008.
32. NONNECKE, B.J., KEHRLI, M.E.J.; HARP, J.A. Function and regulation of the cellular immune response with reference to the bovine mammary gland. **J Dairy Sci.** 1988.
33. NORDHAUG, M.L. et al. A field trial with an experimental vaccine against *staphylococcus-aureus* mastitis in cattle.2. antibody-response. **J Dairy Sci.** v. 77, n. 5. p. 1276-1284. 1994.
34. O'BRIEN, C.N. et al. Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. **J Dairy Sci.** v. 83, n. 8. p. 1758-1766. 2000.
35. O'RIORDAN, K.; LEE, J.C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clin. Microbiol Rev.** v. 17, n. . p. 218-234. 2004.
36. OLIVER, S.P.; SORDILLO, L.M. Approaches to the manipulation of mammarie involution. **J Dairy Sci.** v. 72, p. 1647-1664. 1989.
37. PAAPE, M. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. v. 7, n. 2. p. 109-121. 2002.
38. PERSSON, K., SANDGREN, C.H.; RODRIGUEZ, M.H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. **Am J Vet Res.** v. 53, n. 12. p. 2235-2240. 1992.

39. PHILPOT, W.N. Qualidade do leite e controle de mastite: passado presente e futuro. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, p. 23-38.
40. PIRES, M.F.Á.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Homeopatia: uma opção de tratamento da mamite bavina.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2004. 40p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 100).
41. PORTES, V.M., et al. Ocorrência de *Corynebacterium* sp. isolados de leite de vacas com mastite na região Sul do Brasil, entre 1997 e 2005. In: 9 Congresso Pan-American do Leite, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Templo, p. 245-248.
42. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas.** Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
43. QUIROGA, G.H. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina. Revisión de literatura. **Revista de Medicina Veterinaria.** v. 4, n. 5. p. 288-292. 1993.
44. RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos** 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
45. RAINARD, P.; POUTREL, B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. **J Dairy Sci.** v. 83, n. 5. p. 945-951. 2000.
46. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo: Roca, 2000. 642p.
47. RIBEIRO, M.E.R. et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. **R. Bras. Agrociência.** v. 9, n. 3. p. 287-290. 2003.
48. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** São Paulo: Varela, 2001. 425p.
49. RISTOW, L.E., JÚNIOR, A.A.P.; MEIRA, F.A. Coleta de material para análise laboratorial e diagnóstico de mastite. **Leite Integral.** v. 1, n. 1. p. 46-48. 2006.
50. RUSSELL, M.W., BROOKER, B.E.; REITER, B. Inhibition of the bactericidal activity of bovine polymorphonuclear leucocytes and related systems by casein. **Res Vet Sci.** v. 20, n. 1. p. 30-35. 1976.
51. SANTOS, M.V.D. **Mastite causa prejuízos, mas pode ser controlada.** 2000. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mn/radarestecnicos/artigos>>. Acesso em: 25 nov. 2004.
52. SANTOS, M.V.D.; FONSECA, L.F.L.D. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite.** Barueri, SP: Manole, 2007. 314p.
53. SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.A., NADER FILHO, F.A.; AVILA, G.P.C. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva isolados em caso de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos **ARS Veterinária.** v. 12, n. 1. p. 57-63. 1996.
54. SHUSTER, D.E., KEHRLI, M.E.; STEVENS, M.G. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. **Am J Vet Res.** v. 54, n. 1. p. 80-85. 1993.
55. SILVA, B. Mastite por *Staphylococcus aureus* um dos maiores desafios da bovinocultura leiteira. **Leite Integral.** v. 3, n. Caderno Especial 4. p. 16-23. 2008.
56. SOLTYS, J.; QUINN, M.T. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. **Infect Immun.** v. 67, n. 12. p. 6293-6302. 1999.
57. SORDILLO, L.M., SHAFFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **J Dairy Sci.** v. 80, n. 8. p. 1851-1865. 1997.
58. SOUTO, L.I.M. et al. Ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros bovinos no município de São Pedro, estado de São Paulo, Brasil In: 9 Congresso Panamericano do Leite, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Embrapa Gado de Leite, p. 299-301.

59. TIMMS, L.L.; SCHULTZ, L.H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J Dairy Sci.* v. 70, n. 12. p. 2648-2657. 1987.
60. TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6. ed., São Paulo: Roca, 2002. 532p.
61. VAZ, A.K. Imunidade na Glândula Mamária. *CBQL em Revista*. v. 3, n. 5. p. 16-19. 2004.
62. VIANNI, M.C.E. et al. Freqüencia de isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influencia na produção láctea. *Arq. Univ. Fed. Rur. RJ.* v. 15, n. 2. p. 187-192. 1992.
63. WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* v. 16, n. 1. p. 41-66. 1988.
64. YE, X.; YOSHIDA, S. Lactoperoxidase and lactoferrin: chandes in post-partum milk during bovine lactation disorders. *Milchwissenschaft*. v. 50, n. 2. p. 67-71. 1995.
65. YOUNIS, A. et al. *Staphylococcus aureus* exosecretions and bovine mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. v. 50, n. 1. p. 1-7. 2003.
66. ZHANG, S.; MADDOX, C.W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect Immun.* v. 68, n. 3. p. 1102-1108. 2000.

1.14 Tétano

Conceito

O tétano é uma doença infecciosa não-contagiosa que causa uma intoxicação aguda e potencialmente fatal que afeta muitas espécies e promove exaltação da excitabilidade reflexa com contrações da musculatura estriada. Essa característica decorre da ação de toxinas produzidas pelo *C. tetani* em áreas localizadas do organismo do hospedeiro. Os bovinos, comparados às demais espécies, apresentam suscetibilidade moderada à infecção.

Etiologia e Patogênese

O *Clostridium tetani* responsável por esta enfermidade é um bastonete Gram-positivo e produtor de esporos altamente resistentes^[1,4]. Os endósporos resistem a agentes químicos e à fervura, mas são destruídos por autoclave a 121°C por 15 minutos^[4]. O *C. tetani* tem crescimento invasor e é hemolítico em ágar-sangue devido à produção de tetanolisina.

Os bacilos do *C. tetani* são encontrados normalmente no solo e nas fezes de animais e do homem^[5]. Os ferimentos mais profundos são os locais de preferência para a multiplicação e, consequentemente, a produção de toxinas pelo *C. tetani*, pois nesse local o tecido torna-se necrótico com o oxigênio reduzido, favorecendo a instalação da bactéria. Essa é a condição fundamental para a instauração do tétano.

O *C. tetani* produz três toxinas: 1- tetanoespasmina (neurotoxina), responsável pelos sintomas clínicos; 2- tetanolisina (hemolisina), que apresenta ação antifagocítica e promove necrose tecidual; e 3- uma toxina não espasmogênica ativa perifericamente cuja ação é pouco conhecida^[7]. Essas toxinas são neutralizadas pela bile e, por isso, não causam danos ao trato gastrointestinal.

A presença de lesão profunda com tecido desvitalizado propicia a germinação dos esporos. A multiplicação bacteriana promove liberação de toxinas, que aumentam a área de necrose (tetanolisina), e que se liga ao tecido nervoso (tetanoespasmina) atingindo a medula espinhal por fluxo axonal retrógrado. Nos sítios de ação, nos terminais dos neurônios, a tetanoespasmina bloqueia a transmissão pré-sináptica de neurotransmissores inibitórios, promovendo uma contínua estimulação e espasmos tetânicos de grupos musculares.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A porta de entrada geralmente é um ferimento profundo, embora em vacas a contaminação do trato genital no momento do parto também seja importante. Assim como a contaminação de feridas cirúrgicas, como após orquiectomias, caudectomias, descorna e outras. Ademais, a introdução do agente pode ocorrer pela brincagem e também por aplicações injetáveis de medicamentos ou vacinas^[1]. A contaminação do cordão umbilical é a principal porta de entrada em bezerros^[6].

O período de incubação é de 2 dias até um mês, apresentando mortalidade alta (mínimo 50%). Normalmente, em rebanhos, observam-se casos isolados ou em pequeno número de animais^[1].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos do tétano são semelhantes em todos os animais e consistem de espasmos crônicos ou tetânicos dos músculos, levando a uma paralisia espástica^[5]. A enfermidade cursa com rigidez, tremor muscular, resposta aumentada a estímulos, retração de terceira pálpebra, orelhas eretas, ranger de dentes, trismos e timpanismo. A rigidez generalizada dos músculos pode forçar o animal a assumir a “posição de cavalete” para facilitar a respiração, podendo haver opistotônico^[2]. Na maioria das vezes a evolução é para a morte por paralisia respiratória^[2].

c) Patologia

Manifestações patológicas apresentam-se ausentes, de modo que qualquer tentativa diagnóstica se baseia na exclusão da possibilidade de afecções que ocasionem sinais clínicos semelhantes. Em animais com tétano pode-se observar feridas que podem ter sido a fonte de infecção^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial está baseado na realização de esfregaço direto de tecido necrótico do ferimento, colorido com Gram, e observado em microscopia na busca pelo agente. O cultivo e o isolamento da *C. tetani* podem ser realizados, mas frequentemente não são bem-sucedidos^[4]. A inoculação do soro em camundongos pode ser usada para demonstrar a toxina circulante^[4].

e) Diagnóstico diferencial

Há necessidade de diferenciar de hipomagnesemia clínica da necrose cérebro-cortical (poliencéfalomalacia), que não apresentam prolapsio de terceira pálpebra nem timpanismo^[1]. Intoxicação por estricnina, apesar de rara em bovinos, produz sintomas semelhantes, assim como a intoxicação por chumbo, que pode ser diagnosticada pela elevação dos teores de chumbo no sangue, no fígado e nos rins. Além disso, pode ser necessária a diferenciação de encefalite espongiforme bovina, a qual apresenta, normalmente, um quadro clínico mais longo que o do tétano^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser encaminhado para diagnóstico é tecido coletado do local do ferimento colocado em solução salina ou caldo simples, que deve ser remetido imediatamente ao laboratório. Pode, também, ser encaminhado para teste de imunofluorescência esfregaço do material do ferimento. Para diagnóstico diferencial das doenças com sintomas nervosos, encaminhar fragmentos de vísceras em gelo e em formol^[3]. Para determinação de toxina circulante, remeter soro sanguíneo conservado em refrigeração.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos.** 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes.** São Paulo, SP: Varela, 1996.
3. NAKAZATO, L.; BRUM, K. B. Tétano. In: LEMOS, R.A.A. **Principais enfermidades bovinas de corte do Mato Grosso do Sul.** Campo Grande: UFMS, 1998. p. 142-144.
4. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas.** Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
5. RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suíños, Caprinos e Equinos.** 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
6. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo: Roca, 2000. 642p.
7. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos.** São Paulo: Varela, 2001. 425p.

1.15 Tuberculose bovina

Conceito

Enfermidade infectocontagiosa granulomatosa de evolução crônica e debilitante, caracterizada por lesões de aspecto nodular, principalmente em linfonodos e pulmões. Pode afetar qualquer órgão ou tecido, acometendo preferencialmente bovinos e bubalinos, podendo afetar o homem também.

Etiologia e Patogênese

A tuberculose é causada por bactérias pertencentes à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium*, que se caracterizam por bacilos curtos aeróbicos, sem mobilidade e resistentes a álcool e a ácidos^[13]. Bacilos “álcool-ácido-resistentes” (BAAR) são bactérias que, quando coradas com *fuccina* a quente, resistem à descoloração com álcool-ácido (coloração de Ziehl-Neelsen)^[5].

O *Mycobacterium bovis* é a causa mais comum de tuberculose em bovinos^[14]. Com menor frequência, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies de *Mycobacterium* podem infectar bovinos. Com exceção do *M. bovis*, as espécies de *Mycobacterium* não desenvolvem a tuberculose progressiva em bovinos e bubalinos, entretanto, provocam reações inespecíficas à tuberculinização, dificultando o diagnóstico de tuberculose nessas espécies^[7,9].

Um glicolipídeo (trealose-6,6 dimicolato), denominado fator corda, é um fator determinante da virulência da bactéria. Esse glicolipídeo inibe a quimiotaxia, é leucotóxico e protege a bactéria da fagocitose, impedindo a formação do fagolisossoma. Dessa forma, o *M. bovis* é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos. Outro fator importante na patogenicidade são as tuberculoproteínas, que induzem hipersensibilidade tipo IV, contribuindo para a morte celular e a formação de granuloma^[15].

O local de manifestação depende da rota de invasão. Por inalação, a rota é via linfonodos pulmonares e traqueobrônquios. Por ingestão, é usualmente através de linfonodos mesentéricos e parede intestinal, e para o fígado, via sistema porta. A lesão inicial localiza-se no denominado complexo primário, onde ocorre fagocitose por macrófagos e replicação intracelular do *Mycobacterium*. Quando a imunidade celular do animal for eficaz, a lesão primária pode permanecer localizada e

encapsulada. Se a imunidade não for eficaz, estende-se no parênquima, também chamada de tuberculose ativa, ou dissemina-se através dos vasos linfáticos ou sanguíneos, afetando outros órgãos ou as membranas serosas. Quando se dissemina pela via sanguínea, causa a tuberculose miliar, forma aguda da doença, com disseminação generalizada e grande número de pequenos tubérculos^[3].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A tuberculose apresenta distribuição mundial, sendo de baixa prevalência em países desenvolvidos, onde o controle se encontra em fase avançada, e de maior prevalência nos países em desenvolvimento devido ao limitado conhecimento do problema^[7]. No Brasil, dados oficiais indicam prevalência de 1,3% da doença no período entre 1989 e 1998^[7]. Diversas espécies são admitidas pelo *M. bovis*, inclusive o homem. No entanto, há maior susceptibilidade entre bovinos, bubalinos e suínos. A presença de um animal infectado em um rebanho é a principal fonte de infecção. Em bovinos a via mais frequente de infecção é a respiratória, com 90% dos acometimentos^[3,11]. A transmissão ocorre também por via digestiva, principalmente pela ingestão de leite contaminado^[12], cutânea (mediante lesão do epitelial) ou congênita, esta última de ocorrência rara, e 5% a 10% dos bezerros filhos de vacas com lesões de tuberculose no útero nascem positivos^[15]. Texugos, gambás, búfalos e cervídeos atuam como reservatório do *M. bovis*, sendo capazes de manter a doença em rebanhos bovinos. A transmissão se dá por contato direto e aerossóis, sendo favorecida pela superlotação, umidade, falta de ventilação e insolação. O microrganismo deixa o hospedeiro via descargas respiratórias, fezes, leite, urina, sêmen e descargas genitais.

Devido ao aumento dos casos em humanos em nível mundial, a OMS declarou a tuberculose como “emergência global”. Estima-se que nos países desenvolvidos 1% dos casos de tuberculose em humanos seja de origem bovina, enquanto nos países em desenvolvimento esse percentual é de 5%^[2,15].

b) Sinais clínicos

Na maioria dos animais infectados a enfermidade é subclínica, mas pode ocasionar perdas de 10% a 25% na produção de carne ou leite^[15]. No entanto, o emagrecimento progressivo não associado a outros sinais levanta a suspeita da enfermidade. O envolvimento pulmonar se caracteriza por uma tosse crônica e seca. Por conta da broncopneumonia há ocorrência de pirexia intermitente. Pode-se observar linfoadenomegalia generalizada ou localizada, principalmente nos linfonodos periféricos da cabeça e dos pré-escapulares. Episódios de diarreia podem estar presentes, intercalados com momentos de constipação^[5]. Animais com sinais clínicos de tuberculose apresentam uma evolução de vários meses e morrem por emaciação.

c) Patologia

Macroscopicamente, observam-se granulomas tuberculosos que, ao corte, apresentam secreção purulenta de coloração creme a alaranjada, consistência cremosa espessa a caseosa quase esfarelada, podendo apresentar mineralização central na zona de necrose caseosa. Histologicamente, apresentam-se áreas de necrose central com áreas de calcificação rodeadas por células epitelioides gigantes. Na periferia da lesão encontramos monócitos e linfócitos e há proliferação de tecido fibroso que encapsula a lesão. As lesões de aspecto caseoso, características da doença, são verificadas com maior frequência nos linfonodos da região da cabeça, do pescoço, do mediastino e do mesentério, nos pulmões, no fígado, no intestino, no baço, na pleura e no peritônio embora qualquer tecido possa ser afetado^[5].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo, ou também chamado padrão ouro, é através de cultura e isolamento de *Mycobacterium bovis*, de lesões ou secreções de animais doentes, porém o crescimento do agente é lento (30 a 90 dias)^[6]. Na identificação do agente podem ser usadas provas bioquímicas e PCR^[6]. Se houver animais com lesões macroscópicas sugestivas, deve-se encaminhar material para exame histopatológico, pois neles se pode observar mineralização central e presença de células gigantes ou de Langhans pela fusão de macrófagos. O exame direto a partir de esfregaço de sedimentos de fluidos corados por Ziehl-Neelsen pode ser utilizado, porém não apresenta alta confiabilidade. Há, também, um diagnóstico indireto da tuberculose bovina baseado na detecção de interferon-gama em amostras sanguíneas de animais infectados, através de um teste de ELISA^[6].

Tuberculinização

Para diagnóstico de tuberculose pode-se pesquisar a reação cutânea à inoculação de um alérgeno específico, conhecido como tuberculina^[4], que promove uma resposta imunológica celular conhecida como hipersensibilidade retardada tipo IV. Esse teste alérgico cutâneo apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo considerado como técnica de referência pelo Código Zoossanitário Internacional da OIE em programas de controle e erradicação dessa enfermidade^[7].

A tuberculinização consiste na aplicação de 0,01ml de derivado de proteína purificada (PPD) de *Mycobactérium* (tuberculina) por via intradérmica. Em contato com os linfócitos, ela os sensibiliza, estimulando a liberação de linfocinas que atraem macrófagos para o local e promovem a liberação de histamina. A histamina é responsável por vasodilatação, eritema e aumento de permeabilidade vascular, o que causa edema epidérmico com passagem de fibrinogênio e outras proteínas plasmáticas ao tecido perivascular. Essa reação de hipersensibilidade é visível 72 horas após a aplicação pela emaciação ou inchaço cutâneo localizado junto ao ponto de inoculação, em animais positivos para tuberculose. No Plano Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) está prevista para o diagnóstico de rotina a tuberculinização em suas três modalidades, ou seja, prega caudal, cervical simples e comparativa^[7].

Como testes de triagem para bovinos de corte é indicada a tuberculinização ano caudal⁸, que consiste na aplicação de 0,01ml de PPD bovina e leitura após 72 horas. São positivos os animais que apresentarem emaciação e inchaço local. Para bovinos de leite o teste de triagem é o de tuberculinização cervical simples^[8], consistindo na aplicação de 0,01ml de PPD bovina, antecendo uma mensuração da pele em milímetros. Após 72 horas, uma nova mensuração da pele é realizada utilizando-se de um *cutímetro*. O resultado é a diferença entre as medidas inicial e final interpretados conforme o PNCEBT (Tabela 2)^[8].

Tabela 2. Interpretação do testes intradérmico cervical simples em bovinos

Diferença entre mensurações (mm)	Característica da reação				Interpretação
	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações		
0 a 1,9	-	-	-	-	Negativo
2 a 3,9	Pouca dor	Endurecida	Delimitada		Inconclusivo
2 a 3,9	Muita dor	Macia	Exsudato, necrose		Positivo
> 4	-	-	-		Positivo

Fonte: Adaptado de Mapa (2001)^[8].

Como teste confirmatório, é usada a tuberculinização cervical comparativa, pois minimiza o risco de falso-positivos por reação cruzada com outras micobactérias. Aplica-se simultaneamente PPD bovina e PPD aviária, com espaçamento de 20 centímetros entre as duas aplicações, no terço médio do pescoço. O resultado é determinado pela amplitude da mensuração das aplicações das duas tuberculinas (PPD bovina e PPD aviaria)^[6]. Os resultados em bovinos são interpretados segundo o PNCEBT (Tabela 3)^[8].

Tabela 3. Interpretação do teste intradérmico cervical comparativo em bovinos.

Sensibilidade	Diferença entre PPDbv e PPDAv (mm)	Interpretação
PPDbv ⁽¹⁾ < 2	-	Negativo
PPDbv < PPDAv	< 0	Negativo
PPDbv > PPDAv	0 a 1,9	Negativo
PPDbv > PPDAv	2 a 3,9	Inconclusivo
PPDbv > PPDAv	> 4	Suspeito

⁽¹⁾ PPDbv = proteína purificada derivada de *Mycobacterium bovis*; PPDAv = proteína purificada derivada de *Mycobacterium avium*.

Fonte: Adaptado de Mapa (2001)^[8].

Os animais, após a tuberculinização, tornam-se dessensibilizados. Isso faz com que não respondam a novos testes (anérgicos) por um período de 42 a 60 dias^[6], ocasionando falso-negativos. Essa situação também é verificada em casos avançados de tuberculose, casos recentes (21 a 42 dias), vacas próximas ao parto e animais idosos.

O teste de inoculação alérgico específico tem sido utilizado como principal procedimento em programas de erradicação. Os positivos são encaminhados ao abate, e esse procedimento permitiu a erradicação da doença em várias partes do mundo^[10].

e) Diagnóstico diferencial

A tuberculose deve ser diferenciada principalmente das doenças do trato respiratório superior^[14]; da leucose bovina enzoótica^[1], da linfadenopatia e outras causas de mastite^[14]; além de actinobacilose e actinomicose^[14,16]. Reticulite traumática pode ocasionar sintomas semelhantes aos da tuberculose^[1]. Pleuropneumonia bovina e abscessos pulmonares crônicos podem dificultar o diagnóstico^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras para isolamento envolvem linfonodos infartados quando de inspeção, lavado traqueobrônquico e biopsia de lesões em animais vivos, bem como quando de necropsia material de lesão, conservados em caixa isotérmica com gelo. Para exame histopatológico, fragmentos de tecidos com lesões sugestivas (nódulos caseosos) de tuberculose devem ser mantidos em solução de formaldeído 10%^[7]. Para a realização do teste de ELISA para detectar interferon-gama, coletar sangue com anticoagulante, manter à temperatura ambiente e encaminhar ao laboratório em um prazo máximo de 8 horas^[6].

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos.** 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BUIATRIA. **A tuberculose bovina como zoonose.** 2002. Disponível em: <<http://www.technovet.com.br/buiatria/tbbovnet/tratament.htm>>. Acesso em: 26 ago. 2008.
3. CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, W.A. **Essentials of Veterinary Microbiology.** 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. 394p.
4. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes.** São Paulo, SP: Varela, 1996.
5. JORGE, K.S.G. et al. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: ALMEIDA, R.F.C., SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. **Brucelose e tuberculose bovina: Epidemiologia, controle e Diagnóstico.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 95p.
6. _____. Tuberculose bovina: diagnóstico. In: ALMEIDA, R.F.C., SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. **Brucelose e tuberculose bovina: Epidemiologia, controle e Diagnóstico.** Brasilia, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004. 95p.
7. MAPA. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT.** Brasilia: MAPA, 2004. 132p. (MAPA, Manual Técnico)
8. _____. **Programa Naciomal de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose.** 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 abr. 2009.
9. MODA, G. et al. **The zoonotic importance of Mycobacterium bovis:** Tuberclle and Lung Disease. n. 77. p. 103-108. 1996.
10. MONAGHAN, M.L., et al. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology.** n. 40. p. 111-124. 1994.
11. MORRIS, R.S., PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. **The epidemiology of Mycobacterium bovis infection.** **Veterinary Microbiology.** n. 40. p. 153-177. 1994.
12. NEILI, S.D., et al. **Pathogenesis of Mycobacterium bovis infection in cattle.** **Veterinary Microbiology.** n. 40. p. 41-52. 1994.
13. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas.** Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
14. RADOSTITS, O.M., et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suíños, Caprinos e Equinos.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
15. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** São Paulo: Varela, 2001. 425p.
16. ROSENBERGER, G. et al. **Enfermedades de los Bovinos.** vol. 2, Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1989. 577p.

2. PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS DOS BOVINOS

2.1 Diarreia viral bovina

Conceito

A diarreia viral bovina (DVB) é considerada uma das mais importantes síndromes virais que afetam mundialmente os bovinos. A infecção pelo vírus da DVB causa uma série de doenças graves e transmissíveis nessa espécie. Normalmente apresentar-se na forma crônica, também pode causar uma forma vitalícia da enfermidade, a doença das mucosas, que surge da infecção per-

sistente. Mais recentemente foi descoberta uma síndrome hemorrágica também causada por esse vírus. Essa síndrome acarreta transtornos reprodutivos, perdas na produtividade e nascimento de animais imunotolerantes² que se tornam portadores e transmissores da doença, conhecidos como indivíduos persistentemente infectados (PI). No Brasil como em outras partes do mundo, 65% a 85% da população de bovinos são soropositivos para BVD, ou seja, apresentam anticorpos por contato com o vírus^[3, 15].

Etiologia e Patogênese

O vírus da diarreia viral bovina (VDVB) pertence à família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*^[10]. É um vírus RNA envelopado. São reconhecidos, mediante a capacidade de destruir cultivos celulares *in vitro*, dois biótipos do VDVB: o citopático e o não citopático. O não citopático é o principal biótipo causador de doenças bovinas, e o citopático surge a partir de eventos de recombinação daquele, com incorporação do RNA do hospedeiro^[9], provoca graves lesões celulares e é destruído dentro de 48 a 72 horas^[1].

A identificação de variações antigênicas levou a uma classificação em dois tipos antigênicos diferentes: o VDVB 1 associado às formas clássicas da diarreia viral bovina e à doença das mucosas; o VDVB 2 possui maior patogenicidade e causa uma doença trombocitopênica, uma síndrome hemorrágica, descrita pela primeira vez na América do Norte em 1989^[12], caracterizada por diarreia aguda, lesões erosivas do trato digestivo e lesões respiratórias em bovinos imunologicamente normais.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

O vírus da DVB tem distribuição mundial. Todas as formas da enfermidade, já foram relatadas no Brasil^[5, 13]. A situação atual da enfermidade não é clara. É provável que os casos sejam subestimados, especialmente da forma reprodutiva, sendo confundida com outras enfermidades que afetam a reprodução^[14].

A síndrome é transmitida pelo contato direto ou indireto, por fômites, pela placenta, pelo feto e pelo sêmen. O agente está presente em todas as secreções e excreções dos animais infectados, tanto naqueles com infecção aguda quanto nos infectados persistentemente.

O vírus se mantém endêmico em rebanhos em animais portadores imunotolerantes, persistentemente infectados (PI) com o vírus. O bezerro PI geralmente é soronegativo e clinicamente saudável. Passar despercebida a presença do vírus em um rebanho resulta em exposição constante de indivíduos sadios a ele^[3]. Por isso, o PI é considerado ponto-chave na epidemiologia da infecção^[2].

Há transmissão transplacentária de vacas persistentemente infectadas aos bezerros, durante gestações sucessivas, podendo constituir família de animais PI^[10, 14].

A transmissão pode ocorrer durante a monta natural, na inseminação artificial ou em transferência de embrião^[14]. Devido à instabilidade do vírus, a transmissão indireta raramente ocorre por meio de trabalhadores rurais, equipamentos e picadas de insetos. Embora bovinos sejam os hospedeiros primários, o vírus pode infectar a maioria dos biungulados^[14]. A identificação e o descarte dos animais PI constituem etapas essenciais para o controle e a erradicação do VDVB dos rebanhos^[2].

² Imunotolerante: Insuficiência adquirida ou específica do mecanismo imunológico para reagir ante a exposição a determinado antígeno; sistema imune não reage frente a exposição a determinado antígeno; tolerância imunológica.

b) Sinais clínico-patológicos

Embora inicialmente tenha sido identificado em casos de síndromes gastrointestinais, o VDVB é um vírus frequentemente associado a fenômenos reprodutivos^[3]. Em muitos rebanhos em que a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais evidentes^[2]. A maioria das infecções pelo VDVB é subclínica^[10].

O vírus geralmente é adquirido pela rota oronasal, em cuja mucosa ocorre a replicação inicial. Na viremia subsequente, o vírus dissemina-se por todo o organismo, tanto livre no soro como associado a leucócitos, o que leva a uma imunossupressão, com redução dos números de linfócitos circulantes por inibição de sua produção^[10].

Para facilitar o entendimento da patologia, a infecção e as enfermidades associadas ao VDVB são descritas abaixo, de acordo com o momento da vida do animal em que ocorre a infecção.

• Infecção aguda em animais não prenhes

Em animais imunocompetentes, a infecção pelo VDVB tipo 1 é, geralmente, um evento subclínico^[1]. Algumas cepas de maior patogenicidade podem provocar um curto período febril, acompanhado por hipersalivação, descarga nasal, tosse e diarreia. Lesões ulcerativas na mucosa oral, no epitélio da fenda interdigital e da banda coronária podem estar presentes. Nessa situação, a enfermidade é autolimitante, cursando com alta morbidade, e letalidade muito baixa a nula^[14]. Pode acometer todas as categorias animais, principalmente bezerros com mais de 6 meses.

O VDVB é altamente imunossupressor, propiciando que os animais por ele infectados sofram infecções secundárias, sendo comum a potencialização de enfermidades entéricas e respiratórias durante uma infecção aguda^[7].

O biótipo VDVB tipo 2 causa uma síndrome hemorrágica que cursa com trombocitopenia e diabete *melitus*^[14]. Afeta bovinos adultos e tem alta letalidade. É caracterizada por diarreia sanguinolenta aguda, pirexia, epistaxe, lesões erosivas do trato digestivo e lesões respiratórias, além de petéquias e equimoses nas membranas mucosas em bovinos imunologicamente normais.

• Infecção aguda em animais prenhes

O VDVB estabelece infecção intrauterina, sendo essa forma a enfermidade de maior impacto econômico causada por esse agente. A consequência dessa infecção é determinada pela época da gestação em que a fêmea é infectada e pela patogenicidade da cepa viral presente^[14]. Pode resultar em perdas reprodutivas, como infertilidade temporária, retorno ao cio, mortalidade embrionária e fetal, aborto, mumificação, malformações fetais, nascimento de bezerros fracos e inviáveis e crescimento retardado^[3].

Durante os 30 primeiros dias de gestação, a infecção por uma cepa citopática pode resultar em morte embrionária e reabsorção com o retorno da fêmea ao estro. Os efeitos da infecção fetal entre 30 e 120 dias de gestação incluem aborto e mumificação; dos 100 aos 150^[14] ou 180^[11] dias ocorrem: nascimento de bezerros fracos e malformações ou anormalidades congênitas. Raramente ocorre aborto^[10].

As malformações podem ser encontradas no sistema nervoso central (hipoplasia cerebral, microcefalia, hidrocefalia, mielinização deficiente na medula espinhal) e nos olhos (atrofia ou displasia da retina, catarata, microftalmia), podendo observar-se, ainda, aplasia tímica, braquigginismo, retardo de crescimento e artrogripose^[14]. Os fetos que se tornam infectados após os 160 dias de gestação podem estabelecer uma resposta imunológica ativa, sendo, em geral, normais ao nascimento (sem VDVB)^[10].

Alguns fetos, contudo, podem sofrer uma infecção não letal e tornar-se imunotolerantes. Isso ocorre quando os animais são infectados entre o 40º e o 120º dia da gestação por cepas não

citopatogênicas^[11]. Esses animais podem nascer e se desenvolver normalmente, apesar de alguns demonstrarem taxas de crescimento retardado e outros nascerem fracos e morrerem nos primeiros dias de vida. Esses indivíduos permanecem portadores do vírus por toda a vida sem apresentar anticorpos circulantes; são os chamados persistentemente infectados (PI). A sobreinfecção desses portadores por cepas citopatogênicas determina o aparecimento da doença das mucosas.

- **Doença das mucosas**

Estima-se que 2% a 5% dos animais infectados no útero pelo VDVB não citopático, entre o 40º e o 120º dia de gestação, permaneçam infectados persistentemente (imunotolerante ao vírus)^[11,14]. A doença das mucosas (DM), forma mais grave da infecção pelo VDVB, desencadeia-se quando os animais PI são sobreinfectados por cepas citopatogênicas. Apesar de não ser um consenso, acredita-se que as cepas citopatogênicas teriam uma origem endógena, mediante mutações nas cepas não citopatogênicas que provocam a infecção persistente^[6].

Ao contrário da diarreia bovina, a DM apresenta baixa morbidade e alta letalidade (100%). Ocorre, principalmente, em bovinos com 6 meses a 2 anos, mas pode atingir todas as idades. Geralmente de curso agudo, a enfermidade se caracteriza por hiperemia (40 a 41°C), com erosões na cavidade bucal, salivação, descarga nasal e ocular, diarreia profusa e às vezes sanguinolenta, desidratação, depressão e morte^[14]. Claudicação pode ser observada devida à laminite e às erosões no espaço interdigital^[1]. Os animais afetados apresentam grave leucopenia^[14]. Os poucos animais que sobrevivem à fase aguda apresentam inapetência, perda de peso, diarreia intermitente, descargas oculares e nasais e lesões erosivas crônicas na mucosa bucal, na pele e nos cascos^[8]. Deformações de cascos também podem estar presentes^[14]. Esses indivíduos podem sobreviver por muitos meses, mas acabam morrendo por debilitação^[14].

Macroscopicamente, observam-se úlceras e erosões em toda a mucosa digestiva. Normalmente, o conteúdo intestinal é escuro e aquoso e observa-se enterite catarral ou hemorrágica.

- c) **Diagnóstico laboratorial**

A confirmação laboratorial requer a demonstração de anticorpo, de antígeno viral ou do RNA viral. A demonstração do agente nos tecidos pode ser realizada por imunofluorescência, imunoperoxidase, *Western blot* e PCR^[14]. O diagnóstico confirmatório pode ser feito pelo isolamento do vírus em cultivos celulares. Na ausência de efeito citopático, no cultivo, as amostras devem ser testadas por imunofluorescência para identificar presença de cepas não citopatogênicas.

Animais PI podem ser identificados por um teste de ELISA de captura utilizando soro polyclonal, que apresenta boa especificidade e sensibilidade, e pode ser realizado facilmente em um grande número de amostras^[4].

A soroconversão e a presença de animais virêmicos são necessárias para confirmar o estabelecimento da infecção em um rebanho^[10]. Neutralização de vírus e ELISA são os métodos mais comumente usados para detecção de anticorpos ao VDVB em soro^[10]. A elevação em quatro vezes no título de anticorpo em amostras de soro pareado é necessária para confirmar infecções recentes.

- d) **Diagnóstico diferencial**

A infecção pelo vírus da DVB deve ser suspeitada em todos os casos de perdas embrionárias, aborto, malformações, nascimento de animais fracos, morte perinatal e aparecimento de casos esporádicos de diarreia. O diagnóstico diferencial das demais enfermidades que causam perdas reprodutivas deve ser baseado no isolamento viral associado a informações epidemiológicas e índices reprodutivos do rebanho^[14].

Os casos de doença das mucosas caracterizam-se por alta letalidade, baixa morbidade e lesões erosivas nas mucosas digestivas. Esta enfermidade faz parte do complexo de doenças vesiculares e erosivas, necessitando diagnóstico diferencial de febre aftosa, febre catarral maligna e peste bovina. Na febre aftosa a morbidade é alta e vesículas precedem as ulcerações. Na febre catarral maligna a opacidade da córnea é característica, além do aumento de linfonodos. Na peste bovina vesículas precedem as erosões, há aumento de linfonodos, edema intestinal e alta morbidade^[1].

Na forma trombocitopênica é necessário realizar o diagnóstico diferencial de outras enfermidades hemorrágicas, como a intoxicação aguda por *Pteridium aquilinum* (samambaia)^[14].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras clínicas de eleição para diagnóstico confirmatório de infecção pelo VDVB compreendem: para isolamento viral, amostras de sangue com ou sem anticoagulante coletado em tubo estéril, ou órgãos, principalmente baço e intestino, que devem ser enviados ao laboratório em gelo; para histopatologia, órgãos linfoïdes e digestivos, de preferência os que apresentem lesões, conservados em formalina a 10%; fetos refrigerados, nos casos de aborto; e para demonstração de anticorpos, soro sanguíneo dos animais suspeitos^[14].

No caso de animais suspeitos, deve-se realizar sorologia pareada, ou seja, a coleta de soro no momento da suspeita clínica e uma segunda coleta 15 a 20 dias mais tarde, para verificar a soroconversão^[10].

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. ANTONIASSI, N.A.B., et al. DIAGNÓSTICO DAS CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO EM BOVINOS. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 69-72, 2007. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v69_2/p69-72.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2009.
3. BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America**. v. 11, n. 3. p. 425-445. 1995.
4. BOLIN, S.R. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. **Vet. Clin. North Am. Food An. Prac.** v. 11, p. 615-623. 1995.
5. FLORES, E.F. et al. Clínical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Virus Reviews and Research**. v. 4 (supl. 1), n. 55. 1999.
6. HOWARD, C.J., CLARKE, M.C.; BROWNLIE, J. Comparisons by neutralisation assays of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. **Veterinary Microbiology**. v. 13, p. 361-369. 1987.
7. KIRKLAND, P.D. et al. The impact of perstivirus on an artificial breeding program for cattle. **Aust. Vet J.** v. 67, p. 261-263. 1990.
8. LEITE, R.C. Diarréia bovina a vírus. In: Anais do I Simpósio Pfizer sobre Doenças Infeciosas e Vacinas para Bovinos, 1996, Guarulhos, SP. **Anais...** Guarulhos, SP: Lab. Pfizer, p. 29-31.
9. MEYERS, G. et al. Origin and diversity of cytopathogenic perstiviruses. In: International Symposium Bovine Viral Diarrhoea, 1996, New York. **Anais...** New York: A 50 Year Review Cornell University, p. 24-34.
10. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.

11. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
12. REBUHN, W.C. et al. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 3, n. p. 42-46. 1989.
13. RIET-CORREA, F., et al. **Laboratório Regional de Diagnóstico: Relatório de atividades e doenças da área de influência, no período 1978-1982**. Pelotas, RS: UFPEL, 1983. 98p.
14. _____ **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
15. SOARES, L.A.; PEREIRA, O.A.C. Neutralizing anti-bodies against viral diarrhea-mucosal disease (BVD) virus in cattle from São Paulo States, Brasil. **Revista de Microbiologia**. v. 5, n. 11. p. 1-5. 1974.

2.2 Estomatite vesicular

Conceito

A estomatite vesicular é uma enfermidade que acomete as Américas, afetando ruminantes, suídeos e eqüídeos, além, de ser uma zoonose. Contemplada na lista “A” da Oficina Internacional de Epizootias (OIE), faz parte do chamado “Complexo de Enfermidades Vesiculares”^[5], portanto, de notificação obrigatória. Sua maior importância está no fato de ser clinicamente indistinguível da febre aftosa, portanto, precisa de um diagnóstico laboratorial rápido e preciso, diferenciando-a, e possibilitando a correta tomada de decisão quanto ao controle dos focos da doença.

Por ser uma doença vesicular com grande poder de difusão e clinicamente semelhante à febre aftosa, interfere na comercialização dos produtos pecuários e na comercialização internacional de animais. Portanto, sua ocorrência traz consigo enormes restrições para o intercâmbio comercial entre os países^[7].

Etiologia e Patogênese

O vírus da estomatite vesicular (VEV) é um vírus RNA, membro da família Rhabdoviridae, gênero *Vesiculovirus*^[6]. Existem múltiplos sorotipos de VSV, inexistindo reações cruzadas. São distinguíveis pelos determinantes antigênicos existentes na glicoproteína do vírus. Sorologicamente, há duas cepas principais: a New Jersey, mais comum e de maior virulência, e a Indiana, que apresenta três subtipos: Indiana-1 (EUA); Indiana-2, que inclui os vírus Cocal (Ilha de Trindade) e Salto (Argentina); e o Indiana-3 (Brasil)^[7], identificado em Alagoas^[4].

O microrganismo provavelmente infecta o hospedeiro por abrasões na pele ou nas membranas mucosas, ou após uma picada de inseto^[6]. Ocorre formação de vesículas no local da infecção e lesões secundárias podem desenvolver-se em locais distantes. Todavia, não está clara a forma como ocorre a transferência do vírus nem se essas lesões resultam da viremia ou de contaminação ambiental^[2].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Entre as espécies suscetíveis, a estomatite vesicular afeta, em ordem crescente de severidade: cavalos, burros, mulas, bovinos, suínos, llamas e humanos. Caprinos e ovinos apresentam-se resistentes e raramente manifestam sinais clínicos. Embora já tenha sido isolada na Europa e na África, a estomatite vesicular, atualmente, está restrita às Américas. É endêmica na América Central e em regiões da América do Sul e dos EUA^[6]. A infecção, na maioria dos casos, ocorre no final do verão e início do outono, à medida que o vírus se acumula nos vetores das famílias Si-

muliidae (borrachudos) e Lutzomyia shannoni (mosquito-pólvora). Após sua introdução em um rebanho, o vírus pode ser transmitido pelo contato direto entre os animais infectados, além dos fômites contaminados com o fluido das vesículas ou da saliva^[3]. Animais suscetíveis podem infectar-se através de ferimentos na boca ou nos cascos, ou, ainda, por traumatismo nos tetos causado por máquinas de ordenha^[7].

O microrganismo replica-se em mosquitos com transmissão transovariana, porém a baixa frequência de transmissão transovariana neles sugere que existam outros reservatórios naturais dos quais os insetos vetores obtêm o vírus. Acredita-se que os suínos selvagens sejam os reservatórios e o hospedeiro amplificador.

A estomatite vesicular característica por ocorrer após as estações chuvosas em regiões de clima tropical, podendo ser enzoótica em áreas mais úmidas e baixas. Em climas temperados, é mais frequente no verão, com tendência de ser sazonal. Os focos ocorrem de forma súbita e simultaneamente em propriedades bastante distantes uma da outra, sendo os animais adultos os mais afetados (10% a 15% desenvolvem sinais clínicos)^[7].

As ocorrências da enfermidade no Brasil estão todas relacionadas à cepa indiana, sendo a New Jersey ainda considerada exótica no país. Os índices de morbidade são bastante variáveis entre os bovinos, sendo comuns taxas entre 5% e 10%. No entanto, em rebanho leiteiro os índices podem chegar a 80%.

b) Sinais clínicos

Os sintomas clínicos da doença são indistinguíveis das demais enfermidades vesiculares. O período de incubação varia de 24 horas até 10 dias. Em bovinos e equinos o sinal clínico inicial é o aparecimento de sialorreia acompanhada de febre alta nos primeiros dias^[6,7]. Entre 48 e 72 horas após o início dos sinais começa o aparecimento de vesículas na mucosa oral, na glândula mamária e no rolete coronário. Essas vesículas, invariavelmente, rompem-se e transformam-se em úlceras, e geralmente há contaminação bacteriana secundária^[7]. Em animais em lactação as lesões nas tetas tendem a ser severas e normalmente a mastite é uma sequela da infecção^[1].

Após a erosão das vesículas, as úlceras provocam anorexia e o animal recusa-se a beber; ele perde muito peso e rebanhos leiteiros apresentam perda na produção. Os animais recuperam-se em aproximadamente duas semanas na ausência de infecções secundárias^[6]. Clinicamente, uma característica que distingue a infecção por estomatite vesicular é que cavalos não são suscetíveis à febre aftosa. Em humanos ela desencadeia um estado gripal (febre, calafrios, dores de cabeça, náuseas, dores musculares, vômitos e faringite)^[7] que dura de 3 a 4 dias.

c) Patologia

As lesões são muito similares às da febre aftosa. Vesículas são encontradas com mais frequência na língua e na mucosa oral, mas são também encontradas nas tetas e bandas coronárias.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico é sempre presuntivo, isto é, de suspeita, já que essa enfermidade é indistinguível das demais, que pertencem ao complexo das doenças vesiculares (febre aftosa, exantema vesicular e enfermidade vesicular dos suínos). O diagnóstico definitivo é laboratorial. As provas de ELISA e de neutralização de vírus são as recomendadas tanto para detectar anticorpos como para identificar o vírus^[7]. Fixação de complemento e isolamento viral também podem ser utilizados^[6].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial é semelhante ao mencionado para a febre aftosa. Mas deve diferenciar-se de febre catarral maligna (FCM), doença das mucosas (DM), diarreia viral bovina (BVD), língua azul, peste bovina^[5], doença vesicular suína, exantema vesicular dos suínos e queimadura por químico ou fogo.

As características da estomatite vesicular que a diferem da febre aftosa são:

- a predileção do vírus por equídeos;
- incidência esporádica no gado, com morbidade geralmente baixa;
- lesões geralmente localizadas, na maioria dos animais;
- não observação de lesão durante a necropsia;
- menor severidade em animais jovens;
- geralmente não afeta animais de estábulo.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os materiais a ser enviados ao laboratório são: soro, no caso de pesquisa de anticorpos, e fluidos vesiculares, ou o epitélio que cobre as vesículas não rompidas, ou suabes das vesículas recentemente rompidas, quando se tratar de casos clínicos, para identificação do agente. Na ausência dos demais, amostras do fluido esofágico-faríngeo podem ser utilizadas. Todos os materiais mencionados devem ser remetidos sempre refrigerados. Para evitar resultados errôneos, devem-se obter amostras de mais de um animal e de múltiplas lesões^[1].

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. CLARKE, G.R., STALLKNECHT, D.E.; HOWERTH, E.W. Experimental infection of swine with a sandfly (*Lutzomyia shannoni*) isolate of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 8, p. 105-108. 1996.
3. COMER, S.A. et al. Titers of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in naturally infected male and female Lutzomyia shannoni (Diptera: Psychodidae) in Georgia. **J. Med. Entomol.** v. 29, p. 368-370. 1992.
4. FEDERER, K.E., BURROWS, R.; BROOKSBY, J.B. Vesicular stomatitis virus (the relation between some strains of the Indiana serotype). **Res. Vet. Sci.** v. 8, p. 103-117. 1967.
5. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes**. São Paulo, SP: Varela, 1996.
6. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
7. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.

2.3 Febre aftosa

Conceito

A febre aftosa foi descoberta na Itália no século XVI. É uma enfermidade vesicular, infeciocontagiosa, com grande poder de difusão. Afeta naturalmente animais biungulados. Está entre as injúrias mais temidas e prejudiciais para o agronegócio de um país ou região, causando drás-

ticos prejuízos econômicos. Envolve perdas diretas devidas aos sinais clínicos, com consequente queda na produção e perdas indiretas por meio de sanções comerciais, com embargos econômicos internacionais impostos aos países exportadores a produtos e subprodutos de origem animal e, inclusive, de origem vegetal.

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da febre aftosa é um vírus da família Picornaviridae, gênero *Aphthovirus*^[10]. O agente é um vírus RNA, não tem envelope, e apresenta simetria icosaédrica^[1]. Sete sorotipos, antigênica e imunologicamente distintos^[9], já foram identificados: O, A e C, presentes na América do Sul, Europa, África e Ásia; SAT1, SAT2 e SAT3, que ocorrem na África; e ÁSIA 1, que acomete o Oriente Médio e o Extremo Oriente^[9,11]. Todos os sorotipos possuem uma grande variedade de subtipos, o que acarreta dificuldades para o controle e a erradicação da enfermidade^[11].

O vírus é inativado em presença de pH abaixo de 6 e acima de 8^[9] e perde a capacidade infectante em poucos dias em temperatura ambiente superior a 37°C. Mantém a capacidade de infecção por muitos meses em temperatura de 4°C a 7°C, e por muitos anos a -30 ou -70°C (em congelamento). O vírus pode persistir até 6 meses na medula óssea e em linfonodos sob resfriamento^[12].

A principal via de infecção é a respiratória. Há replicação do vírus na faringe e nos tecidos linfoïdes do trato respiratório superior^[1]. Chega à corrente sanguínea por meio dos alvéolos pulmonares e é então conduzida às células alvo: a camada germinativa do tecido epitelial^[11]. O período de incubação do vírus é de 2 a 14 dias após o contato, variando conforme a pressão de infecção do ambiente^[9,11]. Nas primeiras 72 horas há uma grande replicação do vírus; ao mesmo tempo acontece a formação das vesículas na mucosa da cavidade bucal, língua, úbere e casco. Nessa fase, os animais são grandes disseminadores, pois o vírus está presente em todas as secreções e excreções. A viremia persiste por 3 a 5 dias, com disseminação e replicação do vírus em células epiteliais^[11]. Há, também, replicação viral no epitélio da glândula mamária, e o vírus pode ser encontrado no leite por vários dias após o início da infecção, até que anticorpos neutralizantes sejam produzidos^[4].

O vírus pode manter-se na forma latente em animais convalescentes e em animais vacinados, que apresentam uma infecção persistente e permanecem como portadores da enfermidade^[11]. Os bovinos podem reter o vírus em células tonsilares até 3 anos depois da recuperação^[7,9].

A resposta imunitária ao agente da febre aftosa é específica e temporária^[4]. Em razão disso, a vacinação massal e sistemática é um método de controle e erradicação da doença.

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A febre aftosa é uma doença altamente contagiosa que infecta todos os animais de casco fendido e raramente acomete o homem. Ela aparece rapidamente em populações suscetíveis e tem vários meios de transmissão.

Atualmente, sabe-se que a principal forma de transmissão é por aerossóis, que penetram pelas vias respiratórias^[10]. Já para bezerros, é de especial importância a via oral^[11]. A contaminação de animais suscetíveis ainda pode ocorrer por contato direto com animais infectados com as excreções corporais ou por contato indireto com produtos e subprodutos de origem animal e materiais contaminados com o vírus, ou, ainda, pelo ar, pela água ou por alimentos contaminados.

A febre aftosa apresenta distribuição mundial, sendo encontrada na América do Sul, na África, no Oriente Médio e no Extremo oriente. De acordo com a OIE, alguns países ou regiões encontram-se, atualmente, livres da enfermidade, como Américas do Norte e Central, Caribe, Eu-

ropa Ocidental, Japão, Austrália, Nova Zelândia e algumas áreas da América do Sul^[8]. A maior parte da Europa está livre da febre aftosa, mas ainda ocorrem surtos ocasionais apesar das rigorosas normas de importação^[1].

Em nosso continente a enfermidade era considerada endêmica até a década de 1980, quando foi criado o Plano Hemisférico da Erradicação da Febre Aftosa (PHFA), sob a coordenação do Centro Panamericano de Febre Aftosa. Sob orientação dessa instituição foram implantados planos regionais de controle dessa enfermidade e desde então a incidência vem reduzindo-se significativamente.

No Brasil, há anos o governo oferece ajuda com programas para incentivar melhorias na fabricação de vacinas, na infraestrutura laboratorial, na identificação de áreas livres com ou sem vacinação e no controle do trânsito animal^[2]. E em 2007 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) criou o Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEPFA), que tem como estratégia principal a implantação progressiva e a manutenção de zonas livres da doença, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Organização Internacional de Epizootias (OIE)^[3]. Atualmente, de acordo com a OIE, o *status* sanitário do Brasil varia conforme o Estado, pois encontramos desde regiões endêmicas até áreas livres sem vacinação, como é o caso de Santa Catarina.

b) Sinais clínicos

A febre aftosa pertence ao grupo das enfermidades vesiculares, que compartilham sintomas: hipertermia, surgimento de vesículas e aftas na cavidade bucal (mucosa, língua e gengiva), no espaço interdigital, na banda coronária dos cascos e na glândula mamária, este no caso das fêmeas^[11]. Em casos mais graves pode ocorrer o descolamento de toda a mucosa da língua^[5]. As lesões provocam o aparecimento de salivação profusa, dificuldade de mastigação, manqueira, emagrecimento e fraqueza do animal^[11]. Bezerros podem apresentar morte súbita e insuficiência cardíaca, consequências de uma miocardite aguda^[9,11]. Embora o vírus não ultrapasse a barreira placentária, pode ocorrer aborto, provavelmente devido a hipertermia^[9].

A febre aftosa dificilmente causa morte em bovinos. Em geral, contudo, os sinais clínicos são severos, promovendo queda brusca na produtividade do rebanho de corte e leite e, consequentemente, perdas econômicas significativas.

As vesículas primárias são pequenas, mas podem coalescer e produzir bolhas que mais tarde se rompem levando a lesões ulcerativas. As ulcerações são suscetíveis a contaminação secundária com bactérias ou miíases, podendo agravar o quadro, protelando a cura.

c) Patologia

As alterações macroscópicas observadas nos animais são vesículas e úlceras na cavidade oral (mucosa oral, língua e gengiva), nos cascos, no úbere, nos pilares do rúmen e na mucosa nasal. Nos animais jovens é comum o desenvolvimento de áreas claras no miocárdio que correspondem a áreas de necrose do músculo cardíaco, conferindo ao coração um aspecto listrado (coração tigrado)^[1]. Histologicamente, observa-se tumefação, degeneração e necrose da camada germinativa dos epitélios afetados. Na forma cardíaca, verifica-se miocardite com infiltração de células mononucleares^[11]. Na musculatura esquelética também ocorre degeneração celular hialina^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

O rápido diagnóstico da febre aftosa é muito importante, especialmente em regiões que são livres da infecção. Desse modo, a erradicação deve acontecer no menor tempo possível.

Em bovinos, todas as lesões vesiculares devem ser consideradas suspeitas de febre aftosa, devendo ser comunicadas às autoridades sanitárias competentes por ser uma enfermidade de notificação obrigatória. Por ser uma doença altamente contagiosa e confundível com outras enfermidades vesiculares devido a sua similaridade clínica, o diagnóstico deve ser sempre confirmado por meio de testes laboratoriais. Deve ser baseado na demonstração de antígeno para o Vírus da Febre Aftosa em amostras de tecido ou fluido vesicular^[9].

Na rotina para diagnóstico definitivo foi eleito o teste de ELISA, vindo a substituir com vantagens o teste de fixação de complemento, por ser de menor custo e apresentar alta sensibilidade e especificidade^[11], além de diferenciar os sete tipos virais da febre aftosa^[1]. Para os casos de investigação epidemiológica em áreas livres buscando atividade viral a partir de amostras sorológicas, podem ser usados os teste de ELISA, a neutralização viral ou *imunoblotting*^[11]. Já em áreas endêmicas, a interpretação de títulos de anticorpos fica comprometida^[9].

e) Diagnóstico diferencial

Todas as enfermidades que cursam com erosão oral, salivação, descarga nasal ou lesões nos tetos devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da febre aftosa em bovinos, com destaque em nosso meio para: estomatite vesicular, diarreia viral bovina, rinotraqueite infecciosa bovina, estomatite papular, febre catarral maligna, língua azul e mamilite herpética^[6,10,11]. Casos de fotosensibilização e intoxicação por *Ramaria flavo-brunnescens*^[11] são enfermidades não infecciosas de bovinos que podem ser confundidas clinicamente com febre aftosa.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material de eleição para isolamento do vírus aftoso é fluido vesicular ou tecido epitelial vesicular, conservado sobre refrigeração em líquido de Valleé. Na falta deste, acondicionar somente em gelo (ver item 2.6 do capítulo 7). Quando para investigação epidemiológica em áreas livres de febre aftosa sem vacinação, coletar sangue sem anticoagulante, extrair o coágulo e encaminhar o soro sob refrigeração para o laboratório.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. ASTUDILLO, V.; ZOTELLE, A. A Febre Aftosa e o Mercado Mundial de Produtos Agropecuários. In: VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, 1993, Salvador, BA. **Anais...** Salvador, BA: p. 48-51.
3. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 44, de 02 de outubro de 2007. Aprova as diretrizes gerais para a erradicação e a prevenção da Febre Aftosa. **Diário Oficial da União**. Seção 1, p. 2. 2007.
4. FENNER, F.J. et al. **Veterinary Virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. 403-430p.
5. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes**. São Paulo, SP: Varela, 1996.
6. KAHRS, R.F. Foot-and-Mouth disease. In: **Viral diseases of cattle**. Iowa: The Iowa State University Press, 1981. p. 255-262.
7. MERK. **Manual Merk de Veterinária**. 7. ed., São Paulo: Roca, 1997. p. 801-803.
8. OFFICE INTERNACIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Informe Final. In: 63º Session General, 1995, Paris - França. **Anais...** Paris - França: p. 112.

9. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
10. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
11. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
12. SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia: 1999. 463p.

2.4 Infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 e 5

Conceito

Os herpesvírus³ bovinos tipo 1 e tipo 5 (BHV-1 e BHV-5) são importantes patógenos de bovinos, sendo o BHV-1 associado principalmente a enfermidades respiratórias e reprodutivas, além de conjuntivite e da doença sistêmica do recém-nascido, e o BHV-5 é responsável por casos de meningoencefalite, normalmente com altos índices de letalidade.

A infecção por herpesvírus pertence à lista B da OIE. É uma enfermidade infectocontagiosa que causa prejuízos econômicos diretos (perda de peso, ocorrência de abortos, infertilidade temporária e queda na produção de leite), em decorrência dos sintomas, e indiretos, envolvendo restrições ao comércio internacional de animais, embriões e sêmen.

Etiologia e Patogênese

O herpesvírus bovino pertence à família Herpesviridae, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*^[9]. É um vírus DNA envelopado que apresenta inclusões intranucleares. O BHV-1 é diferenciado por genética molecular em dois subtipos, o BHV-1.1, usualmente associado a doenças respiratórias, e o BHV-1.2, relacionado às infecções genitais^[10]. O BHV-5, responsável pelas doenças encefálicas, anteriormente era classificado como BHV-1.3^[15]. O BHV-1 e o BHV-5 são bastante similares em aspectos biológicos e moleculares, apresentando significativas reações sorológicas cruzadas. Porém, diferem quanto às características clínico-epidemiológicas, destacando-se o potencial neurotrópico do BHV-5^[5].

Uma particularidade importante de ambos os vírus é a capacidade de estabelecer infecção latente nos gânglios dos nervos sensoriais, ou seja, o animal adquire uma infecção vitalícia, que pode ser reativada periodicamente, mediante uma baixa de imunidade do indivíduo^[12]. As quedas na imunidade, geralmente, ocorrem mediante situações de estresse, como transporte, partos, desmame, confinamento, tratamentos prolongados com corticoides, superlotação e estresse térmico.

O bovino portador do vírus é a fonte de infecção no rebanho. A transmissão geralmente é associada ao contato direto, mas os herpesvírus são, também, propagados por aerossóis e secreções corpóreas. A infecção normalmente se estabelece via trato respiratório ou genital, em cujas mucosas ocorre a primeira replicação viral. O vírus, então, se dissemina por três vias: neural, hematogena, e célula a célula.

Após multiplicação intensa no sítio de infecção, o vírus invade as terminações nervosas locais e, via axônio, retrograda e atinge o gânglio nervoso regional, onde pode permanecer em latência. As cepas com potencial neurotrópico específico (BHV-5) atingem o sistema nervoso central e causam meningoencefalite^[5]. Do sítio de infecção, após viremia transitória, o vírus é transportado pelos monócitos para outros órgãos (trato digestivo, ovário, úbere e útero). As lesões produzidas pelo BHV-1 localizam-se particularmente nas mucosas dos tratos respiratório e genital e na pele, sendo caracterizadas pela produção, em sequência, de vesículas, pústulas e úlceras su-

³ Nota do revisor: Palavra ainda não dicionarizada, mas comum na medicina veterinária.

perficiais, que podem tornar-se cobertas por pseudornernbranas^[12]. Entretanto, a necrose tecidual pode propiciar uma infecção secundária, com efeito sistêmico severo e, possivelmente, morte^[9]. Em fêmeas gestantes a viremia pode levar a uma transferência do vírus pela placenta, resultando em infecção fetal e aborto. Devido à transmissão vertical, bezerros neonatos podem sofrer a forma septicêmica da doença, provocada pela viremia^[4]. Embora não previna a infecção, a vacinação diminui a incidência da doença e a excreção de partículas virais infecciosas^[4,6].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

As infecções por BHV-1 e BHV-5 são cosmopolitas, acometendo bovinos de qualquer idade, sendo o indivíduo portador inaparente, ou seja, com infecção latente, o principal reservatório do agente. O BHV-1 ocorre com alta morbidade (100%) e baixa letalidade (1% a 3%)^[10]. Já a enfermidade proporcionada pelo BHV-5 transcurre com reduzida morbidade e letalidade elevada. No Brasil, os primeiros relatos de infecção por BHV-1 são de 1978^[11], e da forma nervosa, que tem como agente o BHV-5, são de 1989^[13,16]. Diagnósticos subsequentes de enfermidades causadas tanto pelo BHV-1 como pelo BHV-5 foram efetuados em diversos estados^[6,12]. Evidências sorológicas apontam que o BHV-1 está distribuído por todo o País, com altos percentuais de animais soropositivos (20% a 80%)^[6]. Apesar de a prevalência de infecções pelo BHV-5 ainda ser desconhecida, estima-se que uma considerável parcela dos bovinos supostamente infectados pelo BHV-1 possa ser soropositiva para BHV-5 por conta da extensa reatividade cruzada entre os dois vírus^[14].

b) Sinais clínicos

A forma respiratória da infecção pelo BHV-1, conhecida como rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), é uma doença respiratória aguda caracterizada por hipertermia (40 a 41°C), rinite com exsudato nasal, sialorreia, dispneia (normalmente a respiração é através da boca) e narinas avermelhadas (*red nose*)^[2,12]. Todavia, ainda que se possa observar bronquite e bronquiolite, a maioria dos casos não possui patologia pulmonar^[10]. O curso de IBR é rápido, 5 a 14 dias, desde que não ocorram pneumonias por infecções secundárias^[10] que, por vezes, podem levar à morte.

A forma genital caracteriza-se por lesões vesiculares na mucosa da vulva e vagina - vulvovaginite pustulada⁴ infecciosa (VPI), e do prepúcio e pênis - balanopostite pustulada infecciosa (BPI). Observa-se hiperemia e edema da mucosa, com presença de pontos hemorrágicos e pequenas pústulas de até 2mm de diâmetro, que podem coalescer e apresentar-se cobertas por um exsudato catarral^[12]. A fase aguda da enfermidade tem um curso clínico da 4 a 7 dias^[11]. Nas fêmeas leva a uma infertilidade temporária, e nos machos, incapacidade temporária de monta e possível aderência peniana.

A conjuntivite frequentemente acompanha as formas respiratória e genital ou apresenta-se isoladamente em rebanhos infectados. Manifesta-se por fotofobia e lacrimejamento seroso e profuso, podendo passar a mucopurulento. Usualmente é bilateral e a epífora é característica dessa infecção. Em geral, a córnea não é afetada, mas pode ocorrer infecção secundária por bactéria agravando o caso e promovendo ulcerações^[12]. Também, pode apresentar macroscopicamente placas brancas multifocais na conjuntiva palpebral^[10].

Abortos podem ocorrer em qualquer período da gestação, embora sejam mais frequentes no terço final^[10]. Normalmente, é acompanhado de retenção de placenta e metrite purulenta. Frequentemente, ocorre paralelo a quadros com sintomas respiratórios.

⁴ Nota do revisor: É comum o uso de “pustular”, mas o adjetivo correto é “pustulado”.

A forma nervosa é uma meningoencefalite causada pelo BHV-5, caracterizada por anorexia, corrimento nasal e ocular e sinais nervosos, como depressão profunda, ataxia, ranger de dentes, nistagmo, opistotônico, convulsões, decúbito lateral e, normalmente, a morte. O curso da enfermidade é de 4 a 15 dias^[11,13].

A infecção do feto por BHV-1 no final da gestação pode ocasionar a forma sistêmica neonatal, que se manifesta com o nascimento de bezerros fracos, com diarreia persistente e não responde a tratamento. Essa forma não é muito comum, mas normalmente é fatal. Fêmeas podem apresentar mamilite herpética^[9] e, ocasionalmente, mastite catarral, podendo-se isolar o vírus da glândula mamária^[8].

c) Patologia

As lesões observadas na forma respiratória caracterizam-se por hiperemia e presença de exsudato e de áreas esbranquiçadas ou ulceradas na mucosa oronasal e nos brônquios. No exame histológico podem observar-se corpúsculos de inclusão intranucleares no trato respiratório^[12]. Na forma nervosa em bovinos maiores de 6 meses, observam-se lesões somente no sistema nervoso central. Macroscopicamente, o córtex cerebral pode apresentar áreas de coloração amarelada ou acinzentada. As lesões histológicas da forma nervosa caracterizam-se por meningite e encefalite não purulenta, afetando diversas áreas do sistema nervoso central^[12]. Em bezerros acometidos pela forma sistêmica, além das lesões do sistema nervoso, observam-se ulcerações no sistema digestivo, principalmente abomaso e rúmen, e ainda hepatomegalia, pericardite e pneumonia^[13]. Também é comum apresentar uma placa neurótica na superfície ventral da língua^[10].

Em fetos abortados, observam-se pontos esbranquiçados de 1mm de diâmetro no pulmão e no fígado que, microscopicamente, correspondem a focos de necrose. Na histologia, necrose de coagulação multifocal pode ser observada no fígado e, ocasionalmente, nos linfonodos, no pulmão, nos rins e na placenta^[3]. O infiltrado de células mononucleares é marcante nas áreas afetadas em todas as formas da doença^[12].

d) Diagnóstico laboratorial

Mediante a não existência de sinais clínicos patognomônicos da infecção por herpesvírus, o diagnóstico confirmatório é laboratorial. O método mais eficiente de diagnóstico é o isolamento viral associado à identificação do isolado pelas técnicas de imunofluorescência ou virusneutralização^[9,12]. O vírus apresenta um rápido efeito citopático (24 a 48 horas) em cultivos com linhagens celulares bovinas. Outros métodos de detecção de vírus, rápidos e específicos, como a técnica da imunoperoxidase, a hibridização *in situ*^[8] e a reação de polimerase em cadeia (PCR), foram desenvolvidos^[12].

O diagnóstico histopatológico, principalmente nos abortos e na forma nervosa, é importante para a constatação das lesões características e para a observação de corpúsculos de inclusão intranucleares. No material para histologia o vírus pode ser identificado mediante a utilização de imuno-histoquímica^[7,11]. A evidência de título crescente de anticorpos em amostras de soro pareaado por soroneutralização ou ELISA é indicativo de infecção ativa e essas amostras são usadas na rotina diagnóstica^[9].

e) Diagnóstico diferencial

A forma respiratória deve ser diferenciada das pneumonias causadas pelo vírus sincicial bovino e da parainfluenza-3, assim como das broncopneumonias bacterianas secundárias a esses agentes e também de doenças vesiculares, principalmente a febre aftosa. A conjuntivite por BHV-1 pode ser confundida com ceratoconjuntivite infecciosa bovina causada por *Moraxella bovis*.

A meningoencefalite por BHV-5 deve ser diferenciada de raiva, listeriose, botulismo, abscessos cerebrais, polioencefalomalacia, síndrome de privação de água, cetose e encefalopatia hepática causada pela intoxicação por plantas hepatotóxicas, principalmente *Senecio spp*^[12].

O diagnóstico diferencial de aborto por BHV-1 deve incluir diferenciação de brucelose, leptospirose, listeriose, salmonelose, campilobacteriose, diarreia viral bovina, neosporose e infecções fúngicas (*Aspergillus fumigatus*).

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o isolamento do herpesvírus bovino é muito importante a correta e cuidadosa coleta e conservação do material a ser enviado para o laboratório, pois o agente é muito frágil. Todo o material para diagnóstico deve ser coletado assim que o surto suspeito for detectado. Dificilmente haverá êxito no isolamento a partir de amostras coletadas em animais com mais de 10 dias de evolução clínica^[10], pois nesse caso já há resposta imune, que tende a neutralizar as partículas virais, além de elevada contaminação secundária, prejudicial aos cultivos celulares em laboratório.

Em casos de rinotraqueíte, conjuntivite e forma genital, coletar suaves com exsudato das lesões, e na ocorrência de aborto, devem ser remetidos, preferencialmente, a placenta e o feto inteiro, ou pulmão, fígado, rim e abomaso desse feto^[12]. Esses materiais devem ser enviados ao laboratório cuidadosamente embalados em recipientes esterilizados e conservados em refrigeração (não congelados), preferencialmente nas primeiras 24 horas após a coleta. Quando há suspeita de meningoencefalite, deve ser enviado o encéfalo, metade em formalina tamponada a 10% e metade refrigerada. (Ver item 2.7 do capítulo 7.)

O soro a ser enviado deve ser refrigerado e constar de duas amostras: uma coletada na fase inicial da enfermidade, e outra 14 a 21 dias após^[10], com o objetivo de demonstrar a soroconversão, com aumento de título de, no mínimo, quatro vezes. Fetos que passaram por autólise não são adequados para o diagnóstico.

Referências bibliográficas

1. ALICE, J.F. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia.** v. 38, n. 4, p. 919-920. 1978.
2. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos.** 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
3. ANTONIASSI, N.A.B. et al. DIAGNÓSTICO DAS CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTO EM BOVINOS. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 69-72, 2007.
4. FENNER, F.J. et al. **Veterinary Virology.** 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. 403-430p.
5. FLORES, E.F., SILVA, A.M.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (VBDV), 1998, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: Pallotti, p. 127-137.
6. HALFEN, D.C. et al. IMUNOGENICIDADE DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 (BHV-5) EM VACINAS INATIVADAS DE DIFERENTES FORMULAÇÕES. **Ciência Rural.** v. 30, n. 5. p. 851-856. 2000.
7. KIRKBRIDE, C.A. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. p. 374-379. 1992.

8. LEITE, R.C. Infecções por herpesvírus bovino-1 (HBV-1) In: Anais do I Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, 1996, Guarulhos, SP. **Anais...** Guarulhos, SP: p. 33-35.
9. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
10. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
11. RIET-CORREA, F. et al. Viroses confundíveis com febre aftosa: Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 26, n. p. 323-332. 1996.
12. _____ **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
13. _____ Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. **Pesq Vet Bras**. v. 9, n. p. 13-16. 1989.
14. ROEHE, P.M. et al. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: Pallotti, p. 89-96.
15. ROIZMAN, B. et al. Family Herpesviridae. **Arch Virol**. v. Supl. 10, n. p. 114-127. 1995.
16. WEIBLEN, R. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Vet Rec**. v. 24, n. p. 666-667. 1989.

2.5 Leucose enzoótica bovina

Conceito

A leucose enzoótica bovina é uma doença infecciosa retroviral de curso crônico e prolongado, que ocorre em bovinos adultos, nos quais são relatadas duas condições: um linfossarcoma de células B e uma linfocitose persistente, que é um aumento benigno no número de linfócitos circulantes. No entanto, na maioria dos animais infectados a infecção é inaparente e pode ser diagnosticada somente pela presença de anticorpos séricos. A leucose enzoótica bovina (LEB) tem ampla distribuição mundial. Alguns países e regiões têm erradicado a doença; outros estão iniciando programas de erradicação.

Etiologia e Patogênese

A leucose bovina é causada por um vírus RNA tumoral que pertence à família Retroviridae, subfamília *Oncovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*^[4,6]. O vírus da leucose bovina (BLV) é esférico, envelopado e apresenta capsídeo com simetria icosaédrica^[8].

As células alvo do vírus são os linfócitos, principalmente os do tipo B, e a infecção inicia pela interação da glicoproteína do envelope viral (derivada da membrana do hospedeiro), com um receptor da superfície celular. O BLV não possui uma oncogênio^[6] e sim a enzima transcriptase reversa, como os demais retrovírus^[7]. A transcriptase reversa permite que os vírus convertam o RNA em DNA e, posteriormente, o DNA viral se integra ao genoma da célula hospedeira causando uma transformação tumoral^[7,8]. A infecção pode ser clinicamente inaparente, o que ocorre na maioria dos casos, ou pode progredir para uma linfocitose persistente em 30% dos casos, e, finalmente, para a produção de tumor, caracterizada pelo aumento dos linfonodos e por infiltrações linfoides em vários tecidos e órgãos, com incidência entre 1% e 10%^[8].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

O primeiro diagnóstico no Brasil foi em 1959^[2,9], e desde então são descritos tanto a forma tumoral como a linfocitose persistente. A infecção está difundida em todos os Estados, com prevalências variadas. Em levantamento sorológico realizado nos rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, foram encontrados 9,2% de amostras positivas em 39.799 soros provenientes de 172 municípios^[3].

A enfermidade é mais frequente em animais de raças leiteiras e, geralmente, nos estabelecimentos com melhores índices produtivos^[8]. A leucose bovina é uma doença do gado adulto e a maior incidência de tumores diagnosticados em animais entre 4 e 8 anos de idade. Em propriedades com alta prevalência, a mortalidade pode variar de 1% a 10% entre os animais adultos (com idade média de 7 anos). É comum o descarte precoce de animais infectados devido a outros transtornos que podem estar relacionados com a enfermidade, como incoordenação motora, infertilidade e queda na produção de leite.

A transmissão horizontal é a principal via de disseminação do BLV, normalmente, por exposição direta a fluídos biológicos contaminados com linfócitos infectados, particularmente sangue^[8]. Procedimentos veterinários de rotina e métodos de manejo são causas importantes de disseminação do BLV dentro de um rebanho^[5], podendo ser transmitido por tatuador, descornador, anel nasal, brincadores, palpação retal utilizando luvas obstétricas contaminadas com sangue, uso de agulha comum para coleta de sangue e uso de instrumentos cirúrgicos contaminados^[7]. A realização de premunição contra tristeza parasitária bovina utilizando-se de sangue obtido de animais infectados pelo BLV dissemina a infecção.

Em condições naturais, a infecção intrauterina é possível, ocorrendo em cerca de 1,2% a 6,4% dos animais nascidos de vacas infectadas^[8]. O colostro também se constitui em fonte de infecção para bezerros recém-nascidos, pois o BLV é eliminado pelo leite em vacas soropositivas. Entretanto, bezerros de vacas soropositivas podem apresentar anticorpos, que permanecem no soro por 4 a 6 meses, sem estar infectados^[8]. A transferência de embrião não constitui uma fonte de infecção por BLV^[7].

b) Sinais clínicos

A doença clínica pode desenvolver-se de duas formas: linfocitose persistente, devida a um incremento de linfócitos B, e linfossarcoma em bovinos adultos. Os sinais clínicos mais evidentes são adenomegalia, anorexia, queda na produção e perda de peso que leva a caquexia e decúbito. O desenvolvimento de linfossarcoma acarreta transtornos ao organismo, que apresenta uma série de manifestações clínicas, dependendo dos órgãos ou sistemas afetados. As massas tumorais apresentam predileção por linfonodos, coração, abomaso, intestino, útero, rins, tecidos perimedulares e tecidos retrobululares do olho. A alternância casual e a associação de lesões em uma ou mais localizações resulta na mais variada gama de sinais clínicos observados em indivíduo.

Vale ressaltar que a maioria dos animais infectados com o BLV permanece assintomática, imunocompetente⁵ e tão produtiva quanto os animais soronegativos^[7].

c) Patologia

Massas tumorais de aspecto firme e de coloração branca podem ser encontradas em qualquer órgão. Os linfonodos atingidos estão aumentados de tamanho e apresentam uma superfície

⁵ Nota do revisor: Palavra ainda não dicionarizada que significa *dotado de propriedades imunitárias*.

de corte branco-amarelada homogênea, sem diferenciação entre a região cortical e a medular^[8]. Histologicamente, as lesões consistem em infiltrações nodulares ou difusas de células linfoides^[8].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico da forma tumoral da enfermidade pode ser difícil, uma vez que os sinais clínicos variam de acordo com a localização dos tumores. A necropsia revela formações tumorais esbranquiçadas, de aspecto homogêneo e firme em diversos órgãos, como abomaso e coração, e linfonodos, cuja confirmação pode ser conferida por exame histológico.

O exame de sangue pode revelar uma linfocitose persistente, sugerindo a infecção pelo BLV; entretanto, a ausência de linfocitose não exclui a possibilidade de infecção^[8], pois pode ocorrer linfossarcoma sem a presença de linfocitose.

A prova de imunodifusão em ágar-gel (IDAG), para detectar anticorpos no plasma ou no soro contra a glicoproteína maior “gp51” do vírus, tem sido adotada pelos órgãos de defesa sanitária de vários países como teste oficial para diagnosticar a leucose enzoótica bovina^[7,8] e indicada pela OIE.

Para impedir reações falso-negativas, as vacas não devem ser testadas no período de três semanas que antecedem o parto até duas semanas após^[8]. Bovinos com resultados negativos devem ser retestados após 3 meses. O teste de IDAG não deve ser usado para diagnóstico em bezerros com idade inferior a 6 meses, pois anticorpos colostrais podem ser detectados nele, resultando em um falso-positivo (Tabela 4).

Tabela 4. Interpretação de IDAG para o vírus da leucose enzoótica bovina

Idade	Resultado sorológico	Último contato com animal infectado	Interpretação
< 7 meses	Positivo		Se nascido de vaca infectada: retestar após 7 meses de idade
			Se nascido de vaca soropositiva e não ingeriu colostro de vaca soropositiva, está infectado
	Negativo	< 3 meses	Retestar 3 meses após o contato com bovino infectado
		> 3 meses	Animal não infectado
> 7 meses	Positivo		Animal infectado
	Negativo	< 3 meses	Retestar 3 meses após o contato com bovino infectado
		> 3 meses	Animal não infectado

Fonte: Adaptado de Toma et al. (1990)^[10].

Testes de radioimunoensaio (RIE) e ELISA são considerados mais sensíveis que o IDAG e podem ser utilizados para detectar infecções recentes e anticorpos contra o BLV em amostras de sangue e leite de vacas parturientes^[7], porém são pouco comuns em diagnósticos de rotina no país.

Atualmente, técnicas que incluem ensaios com atividade da transcriptase reversa ou demonstração de sequências de ácidos nucleicos específicas do BLV são utilizadas com frequência. A reação de polimerase em cadeia (PCR), que possibilita boa sensibilidade e especificidade, está rapidamente ganhando a preferência em relação aos métodos de cultivo nas áreas de pesquisa, diagnóstico e vigilância^[1].

Aspirados ou biopsias de linfonodos hiperplásicos podem confirmar o diagnóstico, e quando da ocorrência de massas tumorais viscerais, a realização de uma ultrassonografia pode auxiliar o diagnóstico^[7].

e) Diagnóstico diferencial

Deve ser feito o diagnóstico diferencial com doenças que cursam com emagrecimento progressivo e adenopatias, como a tuberculose e a actinobacilose^[8]. No caso de incoordenação motora, deve ser diferenciado de outras enfermidades do sistema nervoso central, como raiva, e de abscessos e traumatismos medulares. Em caso de localização cardíaca, os linfossarcomas devem ser diferenciados de outras doenças que causam insuficiência cardíaca, como a pericardite traumática e a intoxicação por *Ateleia glarioviana* (timbó)^[8].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O diagnóstico da doença clínica pode ser realizado por biópsia, coletando-se fragmentos de linfonodos superficiais. Já na necropsia devem ser coletados fragmentos dos órgãos que apresentarem desenvolvimento tumoral, fixar em formalina a 10% e remeter para análise à temperatura ambiente. Para a identificação de animais infectados deve ser coletado sangue, sem anticoagulante, para obtenção de soro. Esse sangue deve ser encaminhado ao laboratório sob refrigeração.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. MERKT, H., GIUDICE, J.C.O.; MÜLLER, J.A. Leucose bovina: Concepção moderna e primeira verificação da doença no RS. **Revista da Escola Agronomia Veterinária do Rio Grande do Sul**. v. 2, n. p. 7-19. 1959.
3. MORAES, M.P. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 26, n. 2, p. 257-262. 1996.
4. MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999. 4495p.
5. PELZER, K.O.; SPRECHER, O.J. Controlling BLV infection on dairy operations. **Vet. Med.** v. n. p. 275-281. 1993.
6. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
7. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
8. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
9. SANTOS, J.A., PINHEIRO, P.V.; SILVA, L.J. Linfossarcoma com lesões da língua e câmaras cardíacas em bovinos. **Anais Escola Fluminense de Medicina Veterinária**. v. 2, p. 1-8. 1959.
10. TOMA, B., ELOIT, M.; SAVEY, M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, arthritis/ encephalitis caprina. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**. v. 9, n. 4. p. 1077-1119. 1990.

2.6 Papilomatose bovina

Conceito

A papilomatose bovina é uma dermatopatia infectocontagiosa de alta transmissibilidade que afeta pele e mucosas. É caracterizada pelo crescimento excessivo das células basais, formando tumores conhecidos como “verrugas”. Em sua maioria são benignas e autolimitantes^[5], porém podem progredir para lesões proliferativas malignas^[4]. A enfermidade acarreta prejuízos à bovinocultura por desvalorização dos animais e dos subprodutos (couro), e por retardar o crescimento. Além disso, proporciona sangramentos com facilidade, propiciando o desenvolvimento de miíases.

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da enfermidade é um vírus pertencente à família Papovaviridae, gênero Papillomavirus^[4]. O papilomavírus bovino (BPV) é um vírus-ácido desoxirribonucleico (DNA) epiteliotrópico^[4] responsável por induzir papilomas ou fibropapilomas^[5]. São conhecidas pela via molecular seis diferentes cepas com localização anatômica predileta e estruturas macroscópica e microscópica distintas (Tabela 5)^[4,6]. Não há reação cruzada entre as cepas^[1,5]. O vírus do papiloma é espécie-específico e sua transmissão a humanos não foi comprovada^[1].

Tabela 5. Tipos de papilomavírus e lesões por eles causadas

Tipo	Histologia	Localização
BPV-1	Fibropapiloma	Teto, pênis e vulva
BPV-2	Fibropapiloma	Pele
BPV-3	Papiloma	Pele
BPV-4	Papiloma	Mucosa do trato digestivo
BPV-5	Fibropapiloma e papiloma	Tetos e úbere
BPV-6	Papiloma	Tetos

Fonte: Adaptado de: Riet-Correia, et al.(2001)^[6] e Quinn, et al. (2005)^[4].

O BPV infecta o animal através da solução de continuidade da pele e se replica nas células basais do epitélio, provocando proliferação celular incontrolável, que forma as verrugas^[6].

Estudos verificaram o envolvimento do BPV com lesões proliferativas de pele^[7] e, também, com tumores do trato digestivo e da bexiga associados à ingestão de samambaia (*Pteridium aquilinum*)^[3,8]. Evidências epidemiológicas sugerem que a progressão para a malignidade das lesões iniciais seja dependente de inter-relações entre o papilomavírus e compostos mutagênicos e imunoodepressivos presentes na samambaia^[2,3].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A doença apresenta ampla distribuição mundial. Animais com idades entre 6 e 24 meses parecem ser o grupo de maior risco^[5]. A morbidade em um rebanho geralmente é baixa, entretanto podem ocorrer surtos, mas raramente ocorrem mortes^[6]. O período de incubação é de 2 a 6 meses^[1]. A concentração de animais favorece a disseminação da enfermidade^[5].

A transmissão ocorre por contato direto com animais infectados através de abrasões da pele, por efeito direto ou indireto de ectoparasitas ou indiretamente por fômites contaminados (agulhas, brincadores, tatuadores, mochadores, entre outros instrumentos de uso em comum, não desinfetados).

Papilomas de tetos normalmente são observados em animais individuais, mas frequentemente são endêmicas em rebanhos transmitidas pela da ordenhadeira. Raramente causam problemas sérios, a não ser que estejam na extremidade do teto, porém são fatores predisponentes de mastites^[5].

b) Sinais clínicos

A papilomatose é observada comumente em animais jovens e, normalmente, regredem após os 2 anos de idade. A regressão é atribuída ao desenvolvimento de imunidade celular^[4]. Casos de persistência por um período maior podem estar associados à imunodepressão, levando a perdas na produção e emagrecimento^[6]. As lesões são encontradas na cabeça, no pescoço, no ventre, no dorso, no úbere, nos tetos, na mucosa digestiva, na mucosa genital ou podem estar generalizadas. Em alguns casos aparecem em pequeno número e em outros podem acometer ampla região. Apresentam-se como saliências que se projetam ligeiramente acima da superfície cutânea com forma semelhante à couve flor, achatadas ou filamentosas. Em casos de carcinomas epidermoides, causados pela ingestão de *Pteridium aquilinum*, encontram-se, também, numerosos papilomas no trato digestivo superior, geralmente visíveis em abatedouros.

c) Patologia

O corte macroscópico dos fibropapilomas extirpados cirurgicamente também é sugestivo, pois a proliferação epidérmica sobre a fibroplasia dérmica é evidente na superfície do corte^[5]. E histologicamente os papilomas apresentam tecido conjuntivo e hiperplasia do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado^[6].

d) Diagnóstico laboratorial

Confirmação laboratorial geralmente não é requerida para lesões papilomatosas. Na maioria dos casos os sinais clínicos são suficientes para o diagnóstico, pois os aspectos clínicos das lesões são característicos, bem como seu padrão de distribuição na superfície corpórea e no grupo etário^[1]. As lesões atípicas podem exigir biopsia e estudo histopatológico. Por meio de microscopia eletrônica é possível observar as partículas virais^[6]. E através de técnicas moleculares é possível tipificar o DNA do papilomavírus, mas normalmente não são utilizadas na rotina^[4,5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Extirpam-se cirurgicalmente os papilomas ou fibropapilomas, que são encaminhados ao laboratório, conservados em formol 10% se para estudo histológico, e conservado em gelo ou congelado para estudos moleculares ou produção de vacina autógena. O tratamento mais utilizado para papilomatose bovina é a vacina autógena produzidas pela inativação de um macerado de papilomas coletado dos animais afetados do rebanho.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. CAMPO, M.S. et al. Association of bovine papillomavirus type 2 and braken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**. v. 52, p. 6898-6904. 1992.

3. FRANÇA, T.N., TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae) **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22, n. 3. p. 85-96. 2002.
4. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
5. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
6. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
7. SPRADBROW, P.B. et al. Skin cancer and papillomaviruses in cattle. **J. Comp. Pathol.** v. 97, n. 4, p. 469-479. 1987.
8. TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Helianthus 2000. 320p.

2.7 Raiva bovina

Conceito

A raiva é uma zoonose causada por um rabdovírus neurotrópico, sendo suscetíveis todos os vertebrados homeotermos. O vírus apresenta um caráter infeccioso e afeta o sistema nervoso central. Encontra-se em grandes concentrações nas glândulas salivares. A enfermidade se caracteriza por uma encefalomielite de curso agudo, com sintomas de excitação e paralisia de diversas naturezas e sempre fatal. Na raiva dos herbívoros a fonte de infecção mais importante é o morcego hematófago da espécie *Desmodus rotundus*.

Etiologia e Patogênese

O vírus da raiva é um vírus RNA envelopado da ordem *Mononegavirales*, família Rhabdoviridae e gênero *Lyssavirus*^[5,11]. Tem a morfologia semelhante a um projétil, é neurotrópico^[11] e agrupa-se em formações, os corpúsculos de Negri, que são agregados de partículas virais.

O vírus da raiva é lável, não persistindo no ambiente^[13]. É inativado por pH baixo, por solventes de lipídios^[3] e também por agentes físicos, tais como fervura e radiação ultravioleta. O glicerol e o frio são excelentes conservantes, e em cadáveres putrefactos pode residir até 45 horas após a morte.

Diferentes mamíferos terrestres funcionam como reservatórios da doença. A transmissão da raiva se dá quando um animal raivoso (portador ou doente) inocula o vírus, contido na saliva, mordendo um indivíduo sadio^[12]. No caso da raiva herbívora a transmissão fica a cargo dos morcegos hematófagos^[6]. Pela mordedura ele libera o vírus para o interior dos músculos e tecidos^[9]. O neurotropismo é documentado, porém o mecanismo preciso não é bem esclarecido^[2]. É provável que ocorra uma primeira replicação viral na musculatura do local da mordida. O vírus, então, se liga aos receptores de acetilcolina na junção neuromuscular invadindo terminações periféricas dos neurônios motores ou sensoriais^[2,12]. Na sequência, o vírus progride de forma centrípega seguindo fluxo axonal retrógrado^[12], ou seja, transneuronal, atingindo o sistema nervoso central (SNC). Essa progressão do músculo até o SNC vai depender da quantidade de vírus transmitida, do local da inoculação, da natureza da ferida e do estado imunológico do hospedeiro, podendo ser rápida ou demorar meses^[11,12]. Uma vez que atinge o SNC, a propagação do vírus é rápida, sendo intra-axônica através das sinapses^[12]. Pode haver invasão de tecidos com inervação abundante, como as glândulas salivares, onde ele pode replicar-se no epitélio dos ácinos e é eliminado juntamente com a saliva. Nesse momento existe um alto risco de transmissibilidade, visto que sua sa-

liva é altamente infecciosa^[9], coincidindo com o momento em que o animal entra na fase de excitação e agressividade por causa da replicação viral no SNC.

Ao atingir o sistema límbico do cérebro, o vírus promove distúrbios no comportamento, o que explica a perda do medo e a agressividade dos animais. Com a continuação da replicação viral no neocôrortex, os sinais clínicos mudam e instala-se a forma paralítica da doença. Ocorre depressão, coma, paradas respiratórias e até a morte^[9].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A raiva é uma enfermidade endêmica nos continentes, com exceção da Antártida e da Oceania. Muitos países também estão livres da doença, entre eles Japão, Coreia do Sul, Emirados Árabes, Espanha, Inglaterra, Irlanda, Malta, Dinamarca, Portugal, Suécia, Havaí, Barbados, Jamaica, Uruguai e várias ilhas do Caribe^[2]. Todos os animais homeotérmicos são passíveis da infecção, diferindo na suscetibilidade. Sem dúvida, o caráter de zoonose é o que mais preocupa nessa doença, já que é a zoonose fatal que mais mata em todo o mundo^[12].

Para os bovinos, é importante o ciclo epidemiológico rural ou silvestre dessa enfermidade, em que o morcego hematófago é um importante reservatório do vírus na América Latina, sendo as mordeduras a origem de surtos em rebanhos^[2].

No Brasil existem três espécies de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphphylla ecaudata*^[1], mas parece que somente o *D. rotundus* é importante na epidemiologia da doença^[12].

A mordedura, com da saliva, é a principal forma de transmissão. Outras formas incluem a contaminação de feridas recentes com saliva ou materiais infectados, a contaminação de mucosas (conjuntiva, olfatória e oral) e raramente transmissão via aerossol^[13]. Há uma tendência de ciclicidade da raiva rural, reaparecendo com a periodicidade de 3 a 5 anos e coincidindo com os picos de incidência de morcegos infectados^[12].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos da raiva são similares em muitas espécies, havendo grande variação entre os indivíduos^[9]. No curso clínico da enfermidade podem compreender três estágios: a fase prodromática, a fase furiosa (excitativa) e a fase silenciosa (paralítica), mas não necessariamente o indivíduo apresenta todas essas fases.

Na fase prodromática, observam-se alterações de comportamento (o animal raivoso se separa do rebanho e exibe anorexia e mansidão), febre, dilatação pupilar e fotofobia. Geralmente ocorre redução abrupta na produção de leite e os touros ficam mais ativos sexualmente. Na fase furiosa há exacerbação dos sinais de hiperexcitabilidade e agressividade, o animal ataca outros animais, objetos inanimados e o homem, apresentando olhar fixo e ranger de dentes. Há também aumento de salivação, dificuldade de deglutição (devida à paralisia da faringe) e convulsões. Com a progressão da doença o animal entra na fase silenciosa, na qual é observada paralisia da cauda, parésia do trem posterior, incoordenação e berros roucos^[8]. Na sequência, o animal não consegue manter-se em pé, cai e não consegue levantar-se, apresenta movimentos de pedalagem, entra em coma e morre^[2]. A raiva usualmente mata o indivíduo 3 a 5 dias após o início dos sintomas^[6].

c) Patologia

Inexistem lesões macroscópicas consistentes. Achados histopatológicos incluem encefalomielite não supurativa multifocal, degeneração de neurônios e inclusões intracitoplasmáticas, eosinofílicas, individuais ou múltiplas: os corpúsculos de Negri^[2].

d) Diagnóstico laboratorial

Como os sinais clínicos são variados, o diagnóstico laboratorial é imprescindível. Antigamente o diagnóstico era através da microscopia, pela demonstração de inclusão intracitoplasmática patognomônica, denominada corpúsculos de Negri, porém, ocorriam muitos resultados falso-negativos, sendo verificado o corpúsculo em somente 50% dos casos realmente positivos^[12].

Atualmente a forma mais adequada de diagnóstico da raiva é teste de imunofluorescência direta (IFD), com a mesma precisão da inoculação em camundongos^[2], que corresponde à prova biológica. Esta última geralmente é realizada para confirmar resultados negativos da IFD^[13]. A grande vantagem da IFD é que o resultado é dado em poucas horas^[7], enquanto a inoculação intracerebral em camundongos neonatos tem a desvantagem de retardar o diagnóstico por pelo menos 3 semanas, que é o tempo necessário para a observação dos animais inoculados.

Os laboratórios e centros de diagnóstico, ao implantar a técnica de imunofluorescência, devem fazer o acompanhamento dos resultados com a inoculação de camundongos por, pelo menos, um ano^[12]. Amostras negativas à imunofluorescência provenientes de animais que morderam pessoas devem ser submetidas à prova biológica.

A imunofluorescência pode ser utilizada, também, em material de indivíduos vivos. Para esse fim, empregam-se impressões corneais, raspado de mucosa lingual, tecido do bulbo de folículos pilosos e cortes cutâneos congelados^[10]. Porém, esse procedimento tem valor limitado, pois a sensibilidade da prova com esse tipo de material é baixa, podendo confirmar-se o diagnóstico apenas quando o resultado for positivo^[12].

Outros testes relatados são: a) a técnica de imuno-histoquímica, que permite a detecção do antígeno viral em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina. Ela não tem muito sucesso, pois apresenta muito falso-negativo e impossibilita o isolamento viral; b) o teste de ELISA, que tem vantagem por ser simples, rápido e específico, porém menos sensível que o IFD; c) o PCR, usado para amplificar o genoma viral em casos suspeitos, em que a amostra apresenta carga viral muito pequena^[4,9]; e d) cultivo celular com posterior identificação viral, que é importante quando o resultado da IFD for duvidoso^[11].

e) Diagnóstico diferencial

Devido à gravidade da zoonose, deve-se fazer o diagnóstico diferencial em qualquer situação em que haja suspeita de envolvimento encefálico^[6]. O diagnóstico diferencial de raiva deve incluir: encefalomielite espongiforme bovina (EEB); intoxicação com plantas hepatotóxicas, principalmente, *Senecio* spp.; intoxicação por chumbo; babesiose cerebral; botulismo; listeriose; tétano; encefalite por herpesvírus bovino tipo 5 e polioencefalomalacia^[2,12].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Em caso de necropsia, o material a ser remetido deve consistir de metade do cérebro fixada em formalina a 10% e metade congelada (ver item 2.7 do capítulo 7). Para diagnóstico de indivíduos *in vivo*, devem-se coletar impressões corneais, raspado de mucosa lingual, tecido do bulbo de folículos pilosos ou cortes cutâneos, e remeter conservados em refrigeração^[10].

Referências bibliográficas

1. ALENCAR, O.A. et al. Aspectos biológicos e ecológicos de *Desmodus rotundus* (Chirop-tera) no nordeste do Brasil. v. 14, n. A, p. 95-103, 1994. **Pesquisa Vet. Bras.** v. 14, n. 4. p. 95-103. 1994.

2. ANDREWS, A.H., et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
3. BRAUND, K.G., BREWER, B.D.; MAYHEW, L.G. Inflammatory, infectious, immune, parasitic and vascular diseases. In: OLIVER, J.E., HOERLEIN, B.F.; MAYHEW, I.G. **Veterinary Neurology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1987. p. 266-254.
4. FENNER, F.J. et al. **Veterinary Virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. 403-430p.
5. FLINT, S.J. et al. **Principles of Virology, Molecular Biology, Pathogenesis and control animal viruses**. 2. ed., USA: ASM Press, 2004.
6. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes**. São Paulo, SP: Varela, 1996.
7. HIRSH, D.C. e ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2003. 446p.
8. KRUG, E.E.B. et al. **Manual da Produção Leiteira**. 2. ed. Porto Alegre: DITEC/CCGL, 1992. 730p.
9. MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999. 4495p.
10. NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Small Animal Internal Medicine**. 4. ed. EUA: Mosby, 2008. 1504p.
11. QUINN, P.J., et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Art-med, 2005. 512p.
12. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
13. SWANGO, L.J. Moléstias Virais Caninas. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 312-325.

3. DOENÇA CAUSADA POR PRÍONS

3.1 Encefalopatia espongiforme bovina

Conceito

A encefalopatia espongiforme bovina (EEB) ou *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), conhecida como “doença da vaca louca”, é uma enfermidade neurodegenerativa de bovinos adultos, progressiva e transmissível, caracterizada pela presença de vacúolos microscópicos e deposição de proteína amieloide na massa encefálica. A doença foi diagnosticada pela primeira vez na Inglaterra em 1986^[14], embora estudos apontassem indícios de sua ocorrência em 1985^[1]. Casos clínicos da enfermidade foram relatados em de cerca de 20 países, embora 90% dos casos tenham ocorrido na Inglaterra^[2].

O anúncio de uma nova variante da doença neurológica de humanos, Creutzfeldt Jakob (CJD), e sua provável relação com a EEB^[5], demonstra fortes indícios de que seja uma zoonose pela epidemiologia dos casos^[2] e pelo fato de que as linhagens do agente (príon) são indistinguíveis^[3,9].

Desde então, passou-se a solicitar dos países exportadores de carne a comprovação de inexistência da enfermidade. O que é possível a partir de um programa de controle e monitoramento envolvendo análise de risco (rastreamento de animais importados de países com ocorrência da doença e de importação de ração e embriões); legislação (notificação obrigatória) e capacitação para diagnóstico diferencial. Portanto, mesmo que a EEB não ocorra no Brasil e que o risco de surgi-mento seja baixo, é necessário manter um esquema de vigilância para essa doença.

Etiologia e Patogênese

A BSE faz parte de um grupo complexo de doenças neurodegenerativas que afetam pessoas e animais, conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs)^[9], cujo agente é extremamente estável e resistente ao calor, ao congelamento e aos processos convencionais de esterilização, e não induz resposta imune ou inflamatória. O agente causador da EEB é um príon, uma partícula proteica infecciosa (PrP^{sc}), ou seja, uma proteína do próprio hospedeiro modificada, cuja alteração na conformação molecular resulta em uma isoforma patológica, resiste à ação das proteases e apresenta tropismo pelo tecido neural^[2].

Sabe-se que, uma vez no organismo, a PrP^{sc} interage com a glicoproteína normal da membrana celular, a PrP^{c} , causando uma conversão espontânea da PrP^{c} em $\text{PrP}^{\text{sc}}\text{[9]}$, e a patogênese ainda não está totalmente esclarecida. Como a PrP^{sc} anormal não sofre ação das proteases, como a PrP^{c} nativa, acumula-se no sistema nervoso central (SNC) e desenvolve a doença^[1,9].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A doença é encontrada geograficamente por toda a Europa, com destaque para o Reino Unido, onde ocorreu a maioria dos casos. Também foi identificada no Canadá, mas em animais importados de áreas infectadas^[11].

Alterações nas práticas de processamento para produção de farinhas de carne e osso ocorridas no fim da década de 1970 e início da década de 1980, no Reino Unido, podem ter contribuído para o aparecimento da doença, provavelmente, permitindo que o agente infeccioso oriundo da *scrapie* dos ovinos sobrevivesse e contaminasse os bovinos^[1,4].

O período de incubação médio da enfermidade é de 4 a 5 anos^[7], podendo surgir após os 2 anos de idade^[4], embora acometimentos da doença já tenham sido relatados em animais com 13 anos de idade^[1]. A fonte de infecção é o próprio bovino infectado. A principal via de transmissão é a indireta, através de uma fonte única: provavelmente os ingredientes alimentares do concentrado que contém proteína de origem animal^[1,2]. Não há evidência de que a EEB se dissemine horizontalmente, mas sugere-se que a transmissão materna, ou vertical, possa acontecer, porém a níveis muito baixos, insuficiente para perpetuar a epidemia^[2,4].

b) Sinais clínicos

Os sintomas iniciais incluem queda na produção de leite e perda gradual de peso ao longo de quatro a seis semanas^[1], apesar de os animais afetados manterem o apetite^[2]. Após o aparecimento dos sinais clínicos, a doença apresenta evolução invariavelmente fatal, num curso de três semanas a seis meses. Bovinos afetados por EEB sofrem de degeneração progressiva do sistema nervoso central, demonstrando sinais neurológicos bastante variáveis entre indivíduos. Podem apresentar distúrbios de comportamento, reação exagerada a estímulos externos (hipersensibilidade) e dificuldade de locomoção, principalmente nos membros pélvicos^[5,13]. Outros sinais clínicos incluem fasciculações musculares espasmódicas, hiperestesia, apreensão e bruxismo, além de ataxia e hipermetria, que são mais evidentes quanto mais avançado o estágio da doença^[9].

c) Patologia

Não há lesões macroscópicas diretamente relacionadas à doença, mas as lesões microscópicas da EEB são consideradas patognomônicas. São lesões degenerativas, simétricas e bilaterais e localizam-se em certas regiões da substância cinzenta do tronco encefálico^[13]. Essas alterações

caracterizam-se, basicamente, por vacuolização, que dá o aspecto espongiforme à substância encefálica, apresentando ausência de reação inflamatória^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

Atualmente, não há como identificar a enfermidade em animais vivos. A EEB pode ser confirmada pelo exame histopatológico de tecido encefálico^[10] e métodos adicionais aplicáveis. São disponíveis a microscopia eletrônica, por meio de identificação das fibras de PrP^{Sc} em extrato cerebral tratado com detergente^[9], e os métodos imunológicos, que detectam a proteína anormal por imuno-histoquímica ou por western immunoblotting^[6]. Outros testes possíveis para identificação são os testes de ELISA e immunoblotting^[8].

Atualmente, no Brasil, o diagnóstico é realizado pelo exame histológico de cortes selecionados do tronco encefálico e por imuno-histoquímica^[2].

e) Diagnóstico diferencial

A realização de exames laboratoriais auxiliares, como urinanálise, exames de sangue e do líquido cefalorraquidiano, podem colaborar no diagnóstico diferencial. No entanto, a confirmação do diagnóstico depende de um exame neuropatológico^[1].

A diferenciação da EEB de hipomagnesemia, hipocalcemia, hepatopatia e uremia pode ser obtida por um exame de sangue. A urinanálise é útil na exclusão de acetonemia nervosa, e o exame do líquido cefalorraquidiano é importante por diferenciar encefalites, uma vez que a encefalopatia espongiforme não causa alteração do líquido^[4,12].

As duas doenças nervosas de maior ocorrência no país, raiva e botulismo, merecem destaque quanto à diferenciação com a EEB^[4]. No botulismo destaca-se a paralisia flácida e, normalmente, o acometimento de vários animais ao mesmo tempo. A raiva causa paralisia do trem posterior e está associada à presença de vetores.

No Brasil, também são importantes as intoxicações por *Palicourea marcgravii* (erva-de-rato), *Cestrum laevigatum* (coerana, ou mata-boi)^[4], chumbo e organofosforados^[1]. Doenças que afetam o sistema nervoso central, como listeriose, abscessos cerebrais, babesiose cerebral, clamídias, neoplasias e infecção por herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5), também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

No Brasil, na atualidade, o diagnóstico da EEB é histológico e imuno-histoquímico, sendo suficiente para os exames a amostragem e remessa de cérebro. Para informações sobre a correta coleta, conservação e remessa do material, atentar para o item 2.7 do capítulo 7.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. BARROS, C.S.L.; MERQUES, G.H.F. **Procedimentos para o Diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50p.
3. COLLINGE, J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Lancet**. v. 354, n. 9175 p. 317-323. 1999.
4. COSTA, L.M.C.; BORGES, J.R.J. Encefalopatia Espongiforme Bovina (“Doença da Vaca Loca”). **Rev. CRMV**. v. 4, n. 21. p. 8-15. 2000.
5. DAVIS, A.J., JENNY, A.L.; MILLER, L.D. Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. **J Vet Diagn Invest**. v. 3, n. 3. p. 266-271. 1991.

6. FARQUAR, J., SOMMERVILLE, R.A.; RITCHIE, L.A. Postmortem immunodiagnosis of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. **J Virol Methods**. v. 24, n. p. 215-222. 1989.
7. GODON, K.A.H.; HONSTEAD, J. Transmissible spongiform encephalopathies in food animals. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 14, n. 1. p. 49-70. 1998.
8. MOYNAGH, J.; SCHIMMEL, H. Tests for BSE evaluated. **Nature**. v. 400, n. p. 105. 1999.
9. QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
10. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
11. ROBINSON, M.M., HADLOW, W.J.; HUFF, T.P. Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. **Journal of General Virology**. v. 75, n. p. 2151-2155. 1994.
12. SCOTT, P.R. et al. Cerebrospinal fluid studies in normal cows and cases of Bovine Spongiform Encephalopathy. **British Veterinary Journal**. v. 146, n. p. 88-90. 1989.
13. WELLS, G.A.H. Bovine spongiform encephalopathy: A neuropathological perspective. **Brain Pathol**. v. n. 1. p. 69-78. 1991.
14. WELLS, G.A.H. et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Vet Rec**. v. 121, n. p. 419-420. 1987.

4. PRINCIPAIS DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS BOVINOS

4.1 Tricomonose

Conceito

Doença infectocontagiosa venérea dos bovinos, caracterizada principalmente por alterações reprodutivas em rebanho de leite e corte, tais como: morte embrionária precoce, aborto no terço inicial da gestação, metrites severas e infertilidade (Tabela 1). O touro é o portador assintomático, não sofrendo a infecção nem adquirindo naturalmente imunidade contra ela^[5], tampouco afetando a qualidade do sêmen ou o desempenho sexual.

A tricomonose, ou tricomoníase, em bovinos encontra-se praticamente erradicada em países que utilizam intensamente a inseminação artificial, entretanto, ainda ocorre de forma endêmica em regiões onde o controle sanitário é deficiente ou o sistema de produção é extensivo, com utilização de monta natural^[5].

Etiologia e Patogênese

É causada por um protozoário flagelado denominado *Trichomonas foetus*, cujo habitat é o trato genital de bovinos, sendo transmitido do macho para a fêmea através da monta ou pelo uso de sêmen contaminado^[5]. O agente é móvel, anaeróbico “aerotolerante”, porém altas concentrações de oxigênio limitam seu crescimento^[9]. Sobrevive ao congeloamento do sêmen, mas não resiste à dessecação e à elevação da temperatura.

No macho o parasita habita as criptas e pregas do prepúcio, pênis e uretra sem causar danos. A fêmea se contamina através da monta natural ou inseminação artificial por equipamentos ou sêmen contaminado. O agente multiplica-se na vagina e pode invadir o útero. O mecanismo exato pelo qual o *T. foetus* induz à doença não está ainda bem descrito. Após 20 a 30 dias ocorre produção de imunidade local e em aproximadamente quatro ciclos estrais a fêmea se recupera, adquirindo resistência. Caso ocorra gestação, normalmente ocorre a morte do embrião e alteração

do ciclo estral. Se a gestação persistir, pode ocorrer aborto antes dos 4º mês, cursando usualmente com persistência de corpo lúteo, maceração fetal e piometria^[9].

A reação imunitária autolimitante na fêmea está baseada na produção de IgA e IgG1, já a partir da 5ª semana, na mucosa vaginal. Suas taxas elevam-se entre a 8ª e a 11ª semana, e há uma novo aumento dos níveis de IgA no muco vaginal em torno da 24ª e 25ª semanas^[3].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A tricomonose é uma enfermidade prevalente em vários os países do mundo. No Brasil, foi isolada em praticamente todos os estados, sendo a doença de maior prevalência entre os bovinos de corte^[7].

A idade do touro é um fator de risco, pois touros mais velhos apresentam condições que propiciam a instalação do protozoário pela maior profundidade das criptas, além do maior número de montas já realizadas^[7,9]. Fêmeas sem contato prévio com o *T. foetus* são altamente sensíveis^[9], mas geralmente eliminam a infecção espontaneamente dentro de alguns meses. Os mecanismos de imunidade envolvidos na infecção autolimitante são obscuros, mas algumas vacas permanecem persistentemente infectadas, assegurando a reinfecção do rebanho^[7]. Os sinais clínicos se evidenciam nas vaquilhonas^[9].

b) Sinais clínicos

Primeiramente se observa repetição de cio em intervalos prolongados (50 a 70 dias), que acomete a maioria das vacas; a infertilidade é temporária, pois logo ocorre aquisição de resistência, e nesse momento aparecem os casos de abortos e piometria. Na sequência, os índices de fertilidade retornam à normalidade, porém há irregularidade de ciclos estrais e abortos esporádicos^[9]. A infecção não impede a fêmea de conceber, mas que o embrião se fixe na mucosa uterina, seguindo-se a morte dele com reabsorção embrionária ou aborto^[5]. Na Tabela 6 há mais informações sobre as alterações produzidas pelo *Trichomonas foetus* em rebanhos.

Tabela 6. Alterações reprodutivas em rebanhos infectados pelo *Trichomonas foetus*.

Alteração reprodutiva	%
Morte embrionária	13 a 50
Abortamento	3,1 a 14
Feto macerado	0,6 a 2,4
Piometria	2,1 a 8
Vacas prenhas portadoras	0,2 a 0,7
Infertilidade	9,4 a 35,4
Queda na produção de bezerros	13 a 50

Fonte: Rae (1989)^[6].

c) Patologia

No macho há ausência de lesões, enquanto na fêmea a tricomoníase cursa com vaginite, endometrite, salpingite e piometria^[9]. No material abortado não se observam mudanças específicas.

cas. Microscopicamente, apresenta placentite e broncopneumonia piogranulomatosa, evidenciando invasão tecidual pelo parasito^[1,8].

d) Diagnóstico laboratorial

A tricomonose é diagnosticada a partir do isolamento e identificação do *T. foetus* em material prepucial e vaginal ou em fetos abortados e suas membranas fetais. O isolamento do *T. foetus* em pelo menos um animal do rebanho confirma o diagnóstico^[4]. O diagnóstico pode ser feito por observação direta ao microscópio, verificando o movimento característico do parasita. O cultivo em meios especiais com soro equino e antibióticos é a forma mais eficiente de detecção do agente^[9]. Imuno-histoquímica pode também ser empregada para diagnóstico de material fixado ou esfregaços vaginais. Também foi desenvolvido um teste da polimerase em cadeia (PCR), que foi testado experimentalmente e provou ser tão sensível quanto a cultura, porém com custo-benefício desfavorável.

e) Diagnóstico diferencial

Deve ser feito diagnóstico diferencial de campilobacteriose, doença venérea muito parecida com a tricomonose, entretanto a ocorrência de piometria geralmente não se verifica. Outras enfermidades que cursam com problemas reprodutivos devem ser lembradas.

Outra observação que deve ser feita é quanto à condição corporal e nutricional no período pré-parto, pois fêmeas que parem com baixo escore corporal demoram a manifestar o estro novamente. Estresse térmico também pode provocar queda nas taxas de prenhez devido à infertilidade temporária. Outro fator que pode acarretar baixas taxas de prenhez é a subfertilidade de touros.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para diagnóstico de rotina, usualmente se realiza a coleta de esmegma prepucial do macho pela lavagem prepucial por sua condição de permanentemente infectado^[9]. Para considerar um reprodutor negativo, devem ser realizadas duas a quatro coletas com intervalo de uma semana. O lavado prepucial deve ser feito após repouso sexual de uma semana, usando solução salina 0,85% a 37°C para que ocorra acúmulo de agente nas criptas, facilitando a observação deles^[2].

Na fêmea, a coleta de muco vaginal deve ser realizada 3 a 7 dias antes do cio. Em casos de piometria, coletar conteúdo uterino. Quando ocorrer aborto, coletam-se os líquidos fetais, a placenta e o líquido do abomoso^[2,9]. Para a remessa, o material coletado deve ser conservado em meio de transporte específico. O meio que vem sendo mais largamente empregado é o Diamonds^[5,7]. Outro meio de cultura que se tem mostrado eficiente para coleta em campo e para proporcionar posterior cultivo do agente é o Meio de Reed Orr^[9]. O material deve ser enviado em temperatura ambiente e não deve ser congelado ou resfriado^[10].

A frequência de isolamento é diretamente dependente das condições de coleta, da rapidez no transporte até o laboratório e dos meios e métodos de cultura utilizados.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes**. São Paulo, SP: Varela, 1996.
3. GAULT, R.A. et al. Specific antibodies in serum and vaginal mucus of heifers inoculate with a vaccine containing *Trichomonas foetus*. **American Journal of Veterinary Research**. v. 56, n. 4. p. 454-459. 1995.

4. **Manual Merk de Veterinária.** 7. ed. São Paulo: Roca, 1997. 801-803p.
5. PELLEGRIN, A.O.; LEITE, R.C. **Atualização sobre Tricomonose genital bovina.** Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2003. 18p. (Embrapa Pantanal, Documentos 54)
6. RAE, D.O. Impact of trichomoniasis on the cow-calf producer's profitability. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 194, n. p. 771-775. 1989.
7. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro.** São Paulo: Roca, 2000. 642p.
8. RHYAN, J.C. et al. Tissue-invasive *Tritrichomonas fetus* in four aborted bovine fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 7, n. p. 409-412. 1995.
9. RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos.** São Paulo: Varela, 2001. 573p.
10. SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S.M. TRICOMONOSE BOVINA. **Biológico.** v. 71, n. 1. p. 9-11. 2009.

4.2 Neosporose

Conceito

A neosporose⁶, causada por um protozoário coccídio parasita, é reconhecida mundialmente como importante causa de abortamento em bovinos. Embora seja uma doença recém-diagnosticada, indícios sugerem que o parasita ou a doença não sejam recentes^[2]. A enfermidade cursa com retornos ao cio, com intervalos regulares ou irregulares, abortos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, com sinais neurológicos ou persistentemente infectados^[6].

Etiologia e epidemiologia

A neosporose é causada pelo *Neospora caninum*, um protozoário apicomplexo, estreitamente relacionado ao *Toxoplasma gondii* e ao *Sarcocystis* spp. O agente foi isolado como causa de aborto em cães em 1988^[5], e seu primeiro relato associado a aborto em bovinos foi em 1989^[12]. Desde então tem gerado inúmeros estudos e vem sendo associado a consideráveis prejuízos econômicos devidos a perdas reprodutivas, descartes, reposição do rebanho e queda na produtividade^[2]. No entanto, a patogênese da doença ainda não é totalmente conhecida^[11].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

O parasita tem distribuição mundial. Embora o ciclo biológico não seja totalmente conhecido, sabe-se que o cão é o hospedeiro definitivo e elimina oocistos nas fases 8 a 23 dias após infecção experimental^[10]. Recentemente, foram detectados oocistos do parasita nas fases de coiotes^[7]. Existem vários possíveis hospedeiros intermediários, incluindo ruminantes domésticos e silvestres, equinos, caninos, entre outros. Entre esses, os mais importantes parecem ser os bovinos.

A transmissão vertical (transplacentária) é a principal forma de disseminação do *N. caninum* em rebanhos bovinos leiteiros, mantendo a infecção por várias gerações. Nos rebanhos leiteiros são encontradas as maiores prevalências de soropositivos para *Neospora*. No Brasil, foi detectada prevalência de 14,09% entre bovinos leiteiros da Bahia^[8] e de 11,4% em rebanhos gaúchos^[13].

⁶ Nota do revisor: Termo ainda não incorporado ao Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa.

O abortamento pode ser esporádico, endêmico ou epidêmico^[11], podendo apresentar-se de forma epidêmica em rebanhos endêmicos submetidos a fatores que promovam imunossupressão^[3]. Vacas infectadas por *N. caninum* têm três vezes mais chances de abortar que vacas soronegativas^[9].

O descarte anual de animais soropositivos é o método mais rápido e eficaz de controle uma vez que as taxas de infecção pós-natal ficam abaixo de 1%. Uma alternativa mais lenta de controle é o descarte dos descendentes de vacas soropositivas, eliminando a transmissão vertical, na qual se constatam taxas de infecção de 95%^[2].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos se limitam ao abortamento e ao nascimento de bezerros fracos, com peso abaixo do normal ou com deficiências neurológicas visíveis, e as vacas positivas permanecem assintomáticas^[2,11]. Os abortamentos ocorrem dos 3 aos 9 meses^[11], com maior ocorrência no terço médio da gestação^[4].

c) Patologia

A lesão característica é uma encefalite focal com necrose e inflamação não supurativa^[2]. O local mais comum é o cérebro^[2]. A presença de células inflamatórias mononucleares, principalmente no encéfalo, coração e músculo esquelético, são lesões altamente sugestivas de *Neospora caninum*.

d) Diagnóstico laboratorial

Testes sorológicos, como imunofluorescência indireta (IFA) e o teste imunoenzimático (Elisa) indicam exposição dos animais ao *Neospora*. O que não significa que o aborto tenha sido causado por ele; essa confirmação só será possível quando do isolamento do agente nos tecidos fetais. O teste de imuno-histoquímica dos tecidos fetais ou do bezerro é o método mais eficiente – e preferencial – para confirmar o diagnóstico. O uso da reação de polimerase em cadeia (PCR) também pode identificar o parasita em amostras de tecidos contaminados^[1].

O pico de anticorpos ocorre antes do aborto, reduzindo-se a níveis indetectáveis dois meses após o fato. Animais com infecção congênita apresentam flutuação nos níveis de anticorpos, podendo estes não ser detectados em testes sorológicos^[2].

e) Diagnóstico diferencial

A presença de anticorpos “antineóspora” no soro das vacas que tiveram aborto indica exposição, mas não necessariamente infecção, e o diagnóstico diferencial para aborto deve incluir diarreia viral bovina (BVD), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), leptospirose e brucelose^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Do feto abortado preconiza-se para exames histopatológicos a coleta de amostras de cérebro (a qual também deve ser submetida à imuno-histoquímica), coração, fígado, músculo esquelético e pulmão, além de fluidos corporais para testes sorológicos. Da vaca que apresentou aborto o material a ser coletado é soro, devendo ser conservado em gelo.

Referências bibliográficas

1. ANDREOTTI, R. **Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 14p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 104)

2. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
3. BARTELS, B.C., WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum* – associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). **Theriogenology**. v. 52, n. 2, p. 247-257. 1999.
4. DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 41, n. 1. p. 1-16. 2003.
5. DUBEY, J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**. v. 192, n. 9, p. 1269-1285. 1988.
6. DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v. 67, n. 1. p. 1-59. 1996.
7. GONDIM, L.F.P. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**. v. 34, n. 2, p. 159-161. 2004.
8. GONDIM, L.F.P. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 86, n. 1, p. 71-75. 1999.
9. MAINAR-JAIME, R.C. et al. Soroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Veterinary Record**. v. 145, n. 145. p. 72-75. 1999.
10. MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum* **International Journal for Parasitology**. v. 28, n. 9, p. 1473-1478. 1998.
11. REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.
12. THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. **J Vet Diag Investigation**. v. 1, n. 3, p. 205-209. 1989.
13. VOGEL, F.S.F., ARENHART, S.; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. v. 36, n. 6, p. 1948-1951. 2006.

4.3 Tristeza parasitária bovina

Conceito

Denomina-se tristeza parasitária bovina (TPB) o complexo de duas doenças causadas por agentes etiológicos distintos, porém com sinais clínicos e epidemiologia similares: babesiose e anaplasmosse. É uma hemoparasitose conhecida desde o final do século 19, sendo responsável por elevadas perdas em produtividade em rebanho bovino de corte e leite da Europa, Austrália, África do Sul e Américas.

Etiologia e Patogênese

No Brasil, a babesiose bovina é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a anaplasmosse por rickétsia, sendo mais importante a *Anaplasma marginale*, porém pode ser causada também pelo *Anaplasma centrale*^[7]. Esse agentes parasitam as hemárias e a enfermidade que causam é devida, principalmente, à intensa destruição das hemárias do hospedeiro, provocando um quadro de anemia^[3].

A babesiose, na América do Sul, é transmitida exclusivamente pelo carrapato ixodídeo *Ixodes holocyclus*^[5]. A anaplasmosse pode, ainda, ser transmitida mecanicamente por insetos hematófagos, como moscas mutucas e mosquitos, ou por equipamentos utilizados em determinados manejos com os animais^[2]. A transmissão pode também ocorrer por via transplacentária e iatrogênica^[4].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Em condições de clima tropical e subtropical, a tristeza parasitária bovina assume características de estabilidade enzoótica. Os bezerros infectados nos primeiros dias de vida, como quando protegidos por anticorpos maternos, desenvolvem imunidade que os protege futuramente da doença clínica. Em áreas de instabilidade endêmica, como no extremo sul do Brasil e no Uruguai, a doença tem maior impacto, com surtos periódicos e altas taxas de morbidade e mortalidade^[6].

Qualquer fator que promova estresse (viagem, manejo, mudança de meio ambiente, etc.) pode causar quebra da imunidade e desencadear a TPB. Existe uma variação nos sinais clínicos da TPB por causa da diferença de patogenicidade entre as espécies e entre cepas da mesma espécie, além da diferença de suscetibilidade do hospedeiro.

b) Sinais clínicos

Para se fazer um diagnóstico clínico de TPB, deve-se levar em consideração uma série de fatores, tais como:

- Origem: é importante saber se os animais são oriundos de áreas livres ou de instabilidade endêmica.
- Raça: estudos demonstram que as raças europeias são mais suscetíveis que as indianas.
- Idade: os animais adultos, em geral, são mais sensíveis que os jovens. Porém há um período crítico, para bezerros, relativo à baixa imunidade humorada, que está entre 28 e 56 dias de vida para *B. bigemina*, 56 e 84 dias para *B. bovis* e 60 dias para anaplasmosse. Podem-se constatar, também, casos de anaplasmosse em animais de 1 a 2 anos de idade (recidivas)^[6].
- Tempo: animais suscetíveis apresentarão sinais clínicos de 8 a 16 dias após a infestação pelo carrapato para *B. bovis* e *B. bigemina*, e 21 a 35 dias para *A. marginale*^[6].

Os sinais clínicos frequentemente encontrados são: febre, prostração, pelo arrepiado, anemia, falta de apetite (anorexia), pele amarelada (icterícia), sangue na urina (hemoglobinúria) e inchaço (emaciação). Entretanto, tais sinais clínicos são encontrados, também, como manifestações de outras doenças. Por outro lado, essa sequência de sinais nem sempre ocorre em todos os animais infectados por babesia e anaplasma. Por exemplo, a babesiose por *B. bovis* pode ocorrer de forma superaguda, matando o animal em poucas horas, sem o aparecimento de sangue na urina ou anemia. Nesses casos, o animal pode apresentar sintomas nervosos pelo acúmulo de eritrócitos parasitados nos capilares dos órgãos viscerais e centrais, com baixa parasitemia na circulação periférica, motivo pelo qual a forma clínica tem sido denominada de forma visceral e cerebral. Na anaplasmosse não ocorre o aparecimento de sangue na urina. Em geral, ocorre paralisação do intestino e as fezes são ressequidas e com estrias de sangue.

Anemia e icterícia são sintomas geralmente presentes. A temperatura atinge 41 a 42°C na fase mais aguda da doença ou até há hipotermia pouco antes da morte. Nas formas mais crônicas da doença ocorrem várias recidivas em um período de uma a três semanas, havendo hipertermia ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), e o animal apresenta anorexia e depressão. Além disso, foram registrados abortos, efeitos no ciclo estral e na fertilidade de touros provocados por *A. marginale*. O diagnóstico clínico, portanto, é apenas um diagnóstico de suposição. Para se fazer o diagnóstico definitivo e específico é necessário o exame laboratorial.

c) Patologia

Em caso de óbito, a necropsia pode evidenciar lesões compatíveis com TPB, como a carcaça anêmica e icterica, assim como o fígado, nos casos mais típicos de anaplasmoses, que cursa também com obstrução de vesícula biliar. Já esplenomegalia, hepatomegalia e bexiga com conteúdo escuro (achocolatado) são mais compatíveis com babesiose^[1,6,7].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é indispensável para confirmar o diagnóstico clínico, esclarecendo a causa específica, isto é, identificando o agente. Realiza-se o exame de sangue envolvendo o exame direto em lâmina (de preferência na fase febril), hemoglobina, hematócrito e hemograma. Como exame complementar de laboratório, a determinação do microematórito é o mais útil para a avaliação da gravidade do quadro clínico, principalmente nos casos de infecção por *B. bigemina* e *A. marginale*. As lâminas podem ser coradas com os corantes típicos para hemácias (Giemsa e Hema- 3) e visualizadas em microscopia sob lentes de imersão (1.000x).

e) Diagnóstico diferencial

Devem ser tomadas as devidas precauções durante a necropsia, pois *B. bovis* causa sintomas semelhantes aos da raiva e, frequentemente, as duas doenças podem ser confundidas no diagnóstico clínico.

A realização do diagnóstico diferencial com outras doenças que causam anemia, icterícia, hemoglobinúria ou mioglobinúria é importante. Entre essas outras doenças destacam-se: a leptospirose, causando icterícia e hemoglobinúria; a hemoglobinúria bacilar, causada por *Clostridium haemolyticum*; a intoxicação por fedegoso (*Senna occidentalis*), que causa mioglobinúria; a intoxicação por cobre (icterícia e hemoglobinúria), samambaia (*Pteridium aquilinum*) (hematuria enzoótica); trombocitopenia aguda severa e diátese hemorrágica, associada ao vírus da diarreia viral bovina; e a intoxicação por *Bracharia* spp. (fotossensibilização hepatogênica), nas fases em que as lesões cutâneas não são evidentes^[6].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Em casos de necropsia, a remessa de vísceras e também do cérebro (diferencial de raiva) para o diagnóstico laboratorial é muito importante para a confirmação da suspeita clínica. A matéria-prima para o diagnóstico é o sangue, que deve ser coletado com anticoagulante e pode ser tanto da veia jugular como de vasos caudais. O frasco contendo o sangue deve ser mantido sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

Outro procedimento recomendado é a realização de esfregaços sanguíneos a partir de punção de vasos na orelha ou na extremidade da cauda. Nesse caso, deve-se ter cuidado na remessa ao laboratório, protegendo as lâminas para que cheguem intactas, propiciando o diagnóstico.

Referências bibliográficas

1. ANDREWS, A.H. et al. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed., São Paulo: Roca, 2008. 1067p.
2. DOMINQUES, P.F.; LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal**. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 210p.
3. FARIAS, N.A. Tristesa parasitária bovina In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Pelotas: Universitaria/UFPEL, 1998. v. p. 349-356.

4. GARCIA, M., LIBERA, A.M.M.P.D.; BARROS FILHO, I.R. **Manual de Semiologia e Clínica de Ruminantes**. São Paulo, SP: Varela, 1996.
5. GUGLIELMONE, A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**. v. 57, n. p. 109-118. 1995.
6. KESSLER, R.H. et al. Tristeza parasitária dos bovinos. In: BRESSAN, M. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 65 p.
7. SOUZA, A.P., BELLATO, V.; RAMOS, C.I. **Controle das principais parasitoses dos ruminantes, equinos e suínos em Santa Catarina**. Lages, SC: Ameríndia Artes Gráficas, 1999. 114p.

CAPÍTULO 9

DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS EQUINOS

Caroline Antoniazzi Wolf

Carlos José Raupp Ramos

Silverio Bunn

Sabrina Leaes Gomez

Matheus Pedrotti de Cesaro

Álvaro Menin

A ciência equina faz parte da evolução humana e os conhecimentos a seu respeito são de ordem milenar. Apesar dos avanços tecnológicos que acercam a ciência e a arte do trabalho com os equinos, o diagnóstico rápido e o controle eficiente das doenças infecciosas continuam sendo grandes desafios para os médicos-veterinários.

Apesar do risco das doenças exóticas e da emergência de novos patógenos, a frequência e ocorrência da maioria dos agentes patogênicos tendem a mudar de acordo com a região. O eficiente controle vai depender da competência do médico-veterinário em identificar com rapidez e segurança os animais doentes e o agente infeccioso/parasitário envolvido. Quanto mais hábil o diagnóstico, mais eficientes tendem a ser as medidas de controle, tratamento e profilaxia das enfermidades.

Muitos métodos para o diagnóstico assistido foram desenvolvidos nas últimas décadas a fim de dar apoio à clínica e garantir o rápido e seguro diagnóstico conclusivo. A proposta deste capítulo é proporcionar a médicos-veterinários e estudantes referências aplicadas ao diagnóstico das principais doenças dos equinos.

1. PRINCIPAIS DOENÇAS BACTERIANAS DOS EQUINOS

1.1 Garrotilho

Conceito

O garrotilho (adenite equina) é uma doença infectocontagiosa aguda ou subaguda de equinos^[6]. A infecção é causada por *Streptococcus equi* subespécie *equi*, tendo sido uma das primei-

ras doenças descritas na medicina veterinária^[7]. Essa enfermidade é caracterizada por inflamação mucopurulenta do trato respiratório superior e linfadenite caseosa, particularmente nos linfonodos submanibulares e retrofaríngeos^[6].

Etiologia e Patogênese

O *Streptococcus equi* subespécie *equi* é uma bactéria Gram-positiva, β-hemolítica, na qual se observa uma área clara de hemólise ao redor das colônias em ágar sangue^[4]. O agente é fenotípica e genotipicamente relacionado ao *S. equi* subespécie *zooepidermicus*, sugerindo-se que seja um biovar do *S. equi* subespécie *zooepidermicus*. O agente acomete apenas membros da família Equidae^[1].

A bactéria invade as mucosas nasal ou orofaríngea alojando-se nos tecidos linfoides ou tonsilares^[3]. A ligação da bactéria aos tecidos é mediada por uma proteína de superfície chamada de proteína M^[5]. Em pouco tempo o agente se aloja e se multiplica nos linfonodos extracelularmente, e o peptideoglicano em sua parede celular ativa o componente C3 do complemento, atraindo neutrófilos^[1]. O *S. equi* possui como característica a resistência à fagocitose mediada por uma combinação entre a proteína M, cápsula de ácido hialurônico e toxinas^[3,5,6]. A proteína M interfere na deposição de complemento e ligação do fibrinogênio com a bactéria, dificultando a fagocitose do microrganismo^[1,3]. A estreptolisina e a estreptoquinase produzidas pela bactéria contribuem para a formação de abscessos^[1]. Após a invasão e a multiplicação nos tecidos ocorre um processo inflamatório ocasionando exsudação variando de serosa a seromucosa, progredindo para purulenta. Com a fixação do agente nos linfonodos, eles se infartam, formando abscessos que fistulam nos quatro a dez dias seguintes^[7]. O aumento de volume dos linfonodos altera a drenagem linfática, ocasionando edema nos tecidos por eles drenados e podem interferir com a deglutição e respiração^[3]. Pode ocorrer disseminação do agente por bacteremia ou via linfática levando à formação de abscessos em outros locais, além de infecção de válvulas cardíacas, cérebro, olhos, articulações e tendões^[1,3].

A púrpura hemorrágica tem sido descrita após casos de adenite equina^[1]. A doença apresenta-se como vasculite, provavelmente pela deposição de complexos antígeno-anticorpos nos capilares e pequenos vasos sanguíneos ocasionando uma hipersensibilidade tipo III. Associa-se à doença com níveis elevados de anticorpos IgA para a proteína M no soro, evidenciando uma reação imune. A vasculite acarreta extravasamento de plasma e sangue para os tecidos, mas não ocorrem distúrbios da coagulação. As lesões de pele predominam, mas outros órgãos podem ser afetados^[3].

Diagnóstico

É baseado na epidemiologia e sinais clínicos e anatomo-patológicos^[5], sendo o diagnóstico definitivo realizado através do isolamento do *S. equi* de suaves nasofaríngeos ou exsudatos dos abscessos de tecidos infectados^[3]. Lavados nasais também são utilizados, para detecção de pequenas quantidades da bactéria, por uma área maior da superfície interna das narinas ser amostrada^[6]. Pode ser realizado também por técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem especial importância na identificação de animais portadores assintomáticos e apresentando maior sensibilidade quando comparada ao isolamento microbiológico^[11].

a) Epidemiologia

O *S. equi* infecta principalmente equídeos de 1 a 5 anos^[6], tendo morbidade extremamente alta e mortalidade baixa^[5]. A transmissão se dá pelo contato de animais saudáveis com animais doentes, secreções nasais ou abscessos de animais contaminados, pastagens, arreios, baias, bebedouros, cochilos, materiais veterinários e insetos^[3,4]. Animais com doença clínica inaparente podem

eliminar o microrganismo por mais de 3 anos, sendo uma importante fonte de transmissão^[3]. Pôntros infectados em lactação também podem ser vetores de mastite purulenta em éguas^[4]. Fatores como estresse, transporte, excesso de trabalho, frio, superlotação, infecções virais e parasitismo aumentam a suscetibilidade dos animais e podem precipitar a enfermidade em animais com infecções latentes^[5].

b) Sinais clínicos

Os animais acometidos apresentam febre súbita, podendo chegar a 41°C, anorexia, depressão e corrimento nasal bilateral seroso, que, no período de 2 a 3 dias, se torna purulento ou mucopurulento, normalmente associado com tosse e espirros^[3,5]. Também se observam faringite e laringite. A febre desaparece em 2 a 3 dias, logo retornando com o envolvimento dos linfonodos regionais, particularmente os submandibulares e retrofaríngeos^[3], que se tornam aumentados de volume e dolorosos à palpação, estando firmes num primeiro momento, progredindo para flutuantes e podendo ser fistular^[5]. Em alguns casos os animais mantêm a cabeça estendida decorrente da dor faríngea e da dificuldade respiratória.

O curso clínico tem duração variável: nos casos moderados dura em média duas a quatro semanas, com recuperação do animal, e, nos casos graves, pode persistir por até 3 meses^[4,5]. Durante esse período, os animais disseminam o agente pelas secreções nasais^[5]. A doença pode ainda ocasionar sinusites, empiema de bolsa gutural, paralisia do nervo laríngeo recorrente, acometimento de órgãos internos e púrpura hemorrágica^[7].

c) Patologia

Observam-se rinite, faringite, alguns casos de laringite aguda, exsudato purulento, hipermmia e edema de mucosas. É possível notar, também, a presença de abscessos na faringe e no palato mole, ulceração do epitélio de revestimento e infiltrado inflamatório. Os linfonodos acometidos apresentam acúmulo de pus^[4,5].

d) Diagnóstico laboratorial

Isolamento bacteriológico: As colônias em ágar-sangue apresentam tamanho de 2 a 3mm de diâmetro, são mucoides, douradas cor de mel, ao redor das quais se evidencia uma área clara de hemólise devida à produção de uma alfa-hemolisina. Na coloração dos esfregaços do exsudato purulento pela coloração de Gram demonstram-se cadeias longas de 10 a 30 cocos Gram-positivos de *S. equi*^[5].

O uso de sorologia para identificar portadores de *S. equi* não tem viabilidade prática devido à variação nas respostas de títulos de anticorpos entre os indivíduos e ao declínio rápido pós-infecção^[5].

Técnicas moleculares: A PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA visando à produção de cópias dessa sequência. Para adenite equina fazendo PCR para a região *hsp60*, associado ao sequenciamento, tem-se um alto poder diagnóstico e também pode ser útil como método de diagnóstico molecular e como método de diferenciação entre as subespécies de *S. equi*^[2].

e) Diagnóstico diferencial

É necessário fazer o diagnóstico diferencial de rinopneumonite viral equina, arterite viral equina e influenza equina, que não apresentam aumento acentuado de linfonodos, nem abscedência deles. Pode ser confundido com infecções piogênicas do trato respiratório superior, normalmente associado com *S. zooepidemicus*, que não cursa com aumento de linfonodos.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem-se enviar suabes nasofaríngeos e secreções dos abscessos que devem, preferencialmente, ser conservados em meio de transporte, podendo também ser enviados sob refrigeração para cultivo microbiológico ou para realização de genotipificação utilizando técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Referências bibliográficas

1. M.S. SILVA; A.C. de VARGAS. Adenite Equina – Aspectos Clínicos, Agente Etiológico e Métodos de Diagnóstico. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 493-498, 2006.
2. M.S. SILVA; A.C. de VARGAS. **Identificação de isolados de Streptococcus equi através de sequenciamento parcial do gene da chaperonina hsp60**. Disponível em <<http://coralx.ufsm.br/ppgmv/seminarios2005/MarianaSaeSilva.pdf>>. Acesso em 05 fev. 2009.
3. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
4. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2. ed., São Paulo: Varela editora e livraria, 2001.
5. SANT'ANA, F.J.F. e NOGUEIRA, R. H. G. Garrotilho: uma doença que continua desafiando os avanços tecnológicos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 4, n. 1, p. 191-198, 2001.
6. SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed., Barueri, SP: Manole, 2006.
7. THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos Cavalos**. 4. ed., São Paulo: Varela editora e livraria, 2005.

1.2 Leptospirose

Conceito

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial^[1]. Afeta animais selvagens, domésticos ou humanos, sendo problema de saúde pública^[2]. A infecção em equinos, normalmente assintomática, é associada a uveíte recorrente, abortos e outros sinais sistêmicos^[3].

Etiologia e Patogênese

As leptospiras são espiroquetas espiraladas, móveis e flexíveis, contendo em seu exterior lipopolissacáideos (LPS) e mucopeptídeos antigênicos. O gênero foi dividido nas espécies *Leptospira biflexa*, não patogênica, e *Leptospira interrogans*, patogênica^[1].

Leptospira interrogans apresenta mais de 212 sorovares, agrupados em 23 sorogrupo^[5]. Os sorovares mais frequentemente encontrados são *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *canicula*, *grigpyphosa*, *hardjo*, *australis*, *pyrogenes*, *tarassovi*, *butembo*, *ballum* e *autumnalis*. Geralmente a infecção é subclínica (existindo a aguda e a crônica também), sendo considerada uma causa importante de abortos (normalmente a partir do 6º mês de gestação), nascimento de animais fracos, prematuros ou mortos, e mortalidade neonatal, acarretando grandes perdas econômicas^[2].

A penetração da bactéria no hospedeiro ocorre de forma ativa através das mucosas, da pele lesionada ou mesmo íntegra. Alcança o sistema vascular, multiplica-se e acometendo diversos órgãos e tecidos, como rins, baço, fígado, sistema nervoso central, olhos e trato genital, o que desenvolve um quadro agudo de leptospiremia^[1].

Os microrganismos ocasionam uma lesão mecânica nas células endoteliais gerando extravasamento de sangue, formação de trombos e hipóxia das áreas acometidas^[1]. Observa-se bacte-

remia em um período de 4 a 10 dias, e após a infecção os animais podem apresentar leptospiúria que pode perdurar por mais de 10 semanas, sendo, assim, um importante reservatório para a transmissão desse agente.

Apesar de o microrganismo se disseminar por todo corpo do animal, os problemas mais comuns visualizados em equinos são a uveíte recorrente (conhecida também como cegueira da lua), leptospirose e aborto. A uveíte é a doença oftalmica que mais provoca cegueira em equinos. Pode ocorrer por outros microrganismos, porém está comumente associada à leptospirose, sendo caracterizada por episódios de inflamação intraocular que se desenvolve após semanas ou meses de o episódio inicial declinar (até 24 meses após). Pode ocorrer aborto, no qual a bactéria penetra no útero prenhe e, dependendo da fase de gestação, pode resultar, além do aborto, em natimorto ou neonato fraco. Os abortos ocorrem a partir de 6 meses de gestação (usualmente no 6º mês) até o final dela^[3].

Diagnóstico

É realizado através da epidemiologia, anamnese e, quando apresentar, pelos sinais clínicos e lesões macroscópicas (na necropsia) e microscópicas (no exame histopatológico). A confirmação do diagnóstico é realizada por exames laboratoriais que demonstrem a presença do microrganismo ou de anticorpos específicos, também podendo ser realizada pela cultura do microrganismo.

O teste mais utilizado para diagnóstico de leptospira e indicado como referência pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é a soroaglutinação microscópica (MAT). A base para esse teste é a aglutinação de anticorpos presentes no soro infectado e o antígeno – o dos LPSs dos sorovares de *Leptospira* spp. A inconveniência do teste é a reação cruzada entre os sorovares dificultando a identificação do infectante. A soroconversão é confirmada com um aumento de quatro vezes no título em amostras pareadas^[1].

a) Epidemiologia

Essa bactéria infecta cavalos de qualquer idade. A transmissão depende de condições favoráveis para a sobrevivência do microrganismo no ambiente. Solos com água estagnada, lamaçais, pH variando entre 6 e 8 e temperaturas inferiores a 10°C e superiores a 34°C, 36°C são muito prejudiciais para sua sobrevivência, também dependendo do número de animais portadores (ratos, cavalos, suínos, bovinos, gambás, preás, raposas, morcegos, etc.)^[4,5,6].

O rato (*Rattus norvegicus*) é o mais importante reservatório da leptospira. O animal também pode ser infectado com um sorovar adaptado ao hospedeiro, ficando o animal como reservatório ou ser infectado com um sorovar não adaptado ao hospedeiro ocasionando doença acidental^[1]. Pode ocorrer contaminação de alimentos, pastagens e água através da urina contaminada, fetos abortados e descargas uterinas de animais infectados, transplacentária, além do sêmen que se contamina durante a monta natural ou na coleta para inseminação artificial^[2,4,5]. A severidade da infecção depende da cepa infectante e da resposta imune do hospedeiro^[3]. A doença é de notificação obrigatória^[1].

b) Sinais clínicos

A leptospirose é principalmente subclínica e usualmente tem curso brando. As infecções agudas e subagudas apresentam distúrbios transitórios como hipóxia, depressão, relutância em movimentar-se e queda do desempenho. Ocorre também febre, hematúria, problemas oculares e aborto, principalmente no 6º mês de gestação.

c) Patologia

Avaliações em fetos abortados normalmente são prejudicadas pela autólise. Quando presentes, pode observar-se icterícia, fígado pálido ou amarelado, rins edemaciados com manchas brancas na superfície, petéquias ou equimoses no pulmão, na mucosa traqueal, no coração e na mucosa gastrointestinal^[2,5].

d) Diagnóstico laboratorial

O exame direto pode demonstrar espiroquetas no sangue, na urina ou no líquido cefalorraquidiano, que são microrganismos finos, de forma espiralada com 6 a 20µm de comprimento e 0,1µm de diâmetro, visíveis em microscopia de campo escuro. Movimentam-se ativamente através de rotações e flexões ao longo de seu próprio eixo. A maioria das leptospiras não é corada pelo Gram, mas quando coradas são Gram-negativas. O isolamento do agente pode ser realizado em meios apropriados, como Fletcher, através da cultura de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou fetos abortados e seus envoltórios. Pode, também, ser realizado pela inoculação de amostras contaminadas em animais de laboratório (*hamsters* ou cobaias).

Pode-se realizar também teste de ELISA para detecção de imunoglobulinas contra o agente, e testes sorológicos para prova de soroaglutinação microscópica, que é a técnica básica.

Em fetos abortados e seus envoltórios é usada técnica especial de cortes histológicos por impregnação pela prata e também por imuno-histoquímica.

Técnicas moleculares: A técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), que permite a amplificação de uma sequência específica de DNA possibilitando a produção de cópias dessa sequência, apresenta resultados satisfatórios para a identificação de *Leptospira interrogans* quando baseado em sequências de inserção (IS), como as IS1533, IS1500 e IS1502.

e) Diagnóstico diferencial

Deve-se diferenciar de aborto, nascimento de filhote morto e morte perinatal de potros causadas por *Streptococcus zooepidemicus*, *Salmonela abortivaequina*, *Escherichia coli* e *Actinobacillus equuli*. Além de herpesvírus equino, artrite viral equina e infecções fúngicas, nos quais o diagnóstico diferencial é dependente do exame laboratorial de tecidos e líquidos fetais.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O feto abortado, juntamente com os envoltórios fetais, deve ser encaminhado a um laboratório de patologia.

Referências bibliográficas

1. MORIKAWA, V.M. Leptospirose. **Manual de Zoonoses**, v. 1. 1. ed., p. 91-99. 2009.
2. PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; LORETTI, A.P.; WUNDER JÚNIOR, E.; FRANTZ, F.J.; DRIEMEIER, D. Aborto eqüino por *Leptospira* sp. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 271-274, 2004.
3. PIRES NETO, J.A.S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M.A.M.; Leptospirose eqüina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em foco**, v. 2, n. 2, p. 165-176, 2004/2005
4. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
5. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2. ed., São Paulo: Varela editora e livraria; 2001.

6. THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos Cavalos**. 4. ed., São Paulo: Varela editora e livraria; 2005.

1.3 Mormo

Conceito

O mormo é uma enfermidade infectocontagiosa, classificada como zoonose e caracterizada pela alta morbidade e letalidade, conhecido em algumas regiões como catarro do mormo ou catarro de burro. O mormo é considerado uma das doenças mais antigas já descritas na espécie equina, já que foi relatado por Aristóteles e Hipócrates em 330a.C.^[2,4]. A doença afeta outras espécies animais além de equinos e é de grande importância zoonótica^[1].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é a *Burkholderia mallei*, antiga *Pseudomonas mallei*, sendo considerada pelo Centro de Controle de Doenças (*Center for Disease Control - CDC*) dos Estados Unidos como agente de bioterrorismo e de guerra biológica. A *Burkholderia mallei* é um bastonete Gram-negativo, sem cápsula, imóvel e com 0,5mm de largura^[10]. O bacilo do mormo é aeróbico, catalase e oxidase positivas e redutor de nitrato. *B. mallei* é descrita como um parasita obrigatório, bem adaptado ao seu hospedeiro, porém não persiste no ambiente^[6,16].

A infecção ocorre através de alimentos, água e solos contaminados, aerossóis, secreções de animais doentes, conteúdos de abscessos e também, mas raramente, por fezes e urina. A bactéria penetra nas mucosas orofaríngea, nasal e intestinal ou lesões de pele ocasionando septicemia e bacteremia, formando focos inflamatórios por ação de uma endotoxina. A incubação pode variar de 3 dias a alguns meses. Após a infecção o animal pode apresentar a forma aguda, ocorrendo a morte em 24 a 48 horas, ou a forma crônica, ficando o portador apresentando apatia, fadiga, febre, tosse e emagrecimento. São observadas três formas da doença: nasal, pulmonar e cutânea^[20].

A forma nasal afeta os turbinados e o septo, iniciando com nódulos, os quais ulceram podendo confluir. Observa-se corrimento nasal seroso no início, tornando-se purulento e hemorrágico com a evolução da doença. Pode ocorrer aumento dos linfonodos regionais e observa-se cicatriz das úlceras em forma de estrela. A forma pulmonar caracteriza-se por broncopneumonia ocasionando tosse, epistaxe e dispneia. Na forma cutânea ocorrem nódulos que ulceram e extravasam pus com coloração mel escuro. Vasos linfáticos também são acometidos, os quais ficam espessados, irradiando-se das lesões e formando redes. As lesões na pele são encontradas principalmente na região medial da articulação do tarso, mas também podem ser encontradas em outras regiões^[15].

Diagnóstico

O diagnóstico da doença consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anatomo-histopatológicos, isolamento bacteriano, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica e testes sorológicos^[11].

a) Epidemiologia

A doença foi descrita no Brasil pela primeira vez em 1811, introduzida por provável importação da Europa de animais infectados que desencadeou verdadeiras epizootias em vários pontos do território nacional, vitimando muares, cavalos e humanos que adoeceram com sintomas de catarro e cancro nasal^[8,12]. Após aproximadamente 30 anos sem relatos da doença, ela foi descrita nos estados de Alagoas e Pernambuco^[10].

Animais infectados e portadores assintomáticos são importantes fontes de infecção. A principal via de infecção é a digestiva, podendo ocorrer também pelas vias respiratória, genital e cutânea^[5,15]. A disseminação do microrganismo ocorre por alimentos, água e fômites, principalmente cochos e bebedouros. Lesões pulmonares crônicas, que se rompem nos brônquios e infectam as vias respiratórias superiores, e secreções orais e nasais, representam a mais importante via de excreção da *B. mallei*^[15].

Equídeos, principalmente muares e asininos de todas as idades e sexos, são suscetíveis à infecção, tendo maior probabilidade de ocorrer quando o animal é submetido a condições predisponentes, como estresse, má alimentação e habitação em ambientes contaminados^[15].

b) Sinais clínicos

Os sinais do mormo incluem febre, descarga nasal mucopurulenta, tosse, epistaxe, dificuldade respiratória, podendo ocorrer laminita^[3]. A forma crônica da doença é caracterizada por três formas de manifestação clínica, podendo apresentar as formas nasal (hipertermia, secreção nasal, epistaxe), pulmonar (tosse, pneumonia, respiração dificultada) e cutânea (nódulos, ulcerações nos membros e abdômen, abscessos com secreções purulentas)^[7]. O diagnóstico clínico pode ser determinado pelas lesões nodulares características na pele, que ocorrem a distâncias aproximadamente iguais, resultando em arranjo na forma de colar de pérolas^[11,13,14,18] ou rosário linfático.

c) Patologia

Os equinos acometidos pelo mormo apresentam congestão, erosão e úlceras no septo nasal, resultando em cicatrizes, que muitas vezes podem destruir o septo. Macroscopicamente, a necropsia pode apresentar petéquias e equimoses na pleura visceral, e no sistema linfático aparecem nódulos firmes que podem fistular^[10]. Esses nódulos são lesões granulomatosas formadas pela infiltração de neutrófilos, hemácias e fibrina. Dessa forma, os neutrófilos degeneram-se e uma área necrótica central torna-se circundada pela presença de células epitelioides gigantes e por linfócitos infiltrados no tecido de granulação^[6].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial através do isolamento bacteriano é realizado pela coleta de secreção purulenta dos nódulos cutâneos, colocada em placa com meio de ágar-sangue e semeados a 37°C por 48h para, posteriormente, ser corada pelo método de Gram.

A morfologia da *B. mallei* depende das condições de cultivo, cresce bem em meios que contenham glicerol ou sangue, não produz hemólise no ágar-sangue e suas colônias apresentam aspecto mucoide e brilhante^[10]. Contudo, a prova de Strauss consiste de inoculação, de secreções nasais ou dos abscessos subcutâneos na cavidade peritoneal de cobaias, sendo possível observá-los até duas semanas após a inoculação. À necropsia observam-se lesões abscedentes em diferentes órgãos onde se coleta material para isolamento e identificação bacteriana^[17]. Porém, ainda como diagnóstico, pode-se optar pela aplicação de métodos baseados em biologia molecular, tais como a PCR, que, através da tipagem molecular, apresenta significante impacto no diagnóstico^[21].

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) recomenda, para fins diagnósticos e de controle da enfermidade, os testes de fixação do complemento e de maleinização^[9].

O teste de fixação do complemento deve ser realizado pela análise sorológica de sangue coletado da jugular, assepticamente, por venopunção. O teste baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra a *Burkholderia mallei*. O teste da maleína consiste na inculação intradermopalpebral, oftálmica ou subcutânea de um alérgeno (derivado proteico purificado), sendo realizada leitura do teste 48h após. A prova da maleína interfere no diagnóstico sorológico.

Não há tratamento, determinando a legislação brasileira a notificação compulsória ao Mapa, interdição da propriedade e sacrifício e incineração dos animais positivos^[20].

e) Diagnóstico diferencial

O mormo pode ser facilmente confundido, clinicamente, com as seguintes enfermidades: linfangite epizoótica (*Histoplasma farciminosum*), esporotricose (*Sporothrix schenki*), linfangite ulcerativa (*Arcanobacterium pseudotuberculosis*), adenite (*Streptococcus equi*) e melioidose (*Burkholderia pseudomallei*). Por esse motivo, torna-se necessária a identificação do agente etiológico da enfermidade.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A remessa de material para exame laboratorial é realizada a partir da coleta de secreção purulenta dos nódulos cutâneos, assepticamente colhida por punção. Para tanto, realiza-se tricotomia e assepsia do local. Deve-se esfregar a superfície com algodão embebido em álcool 70% e aspirar a secreção do nódulo com uma seringa com agulha calibre 20 e 2,5cm, armazenando o material em frasco estéril inoculado em um meio de cultura para transporte^[19]. Recomenda-se que a amostra para análise seja remetida ao laboratório sob refrigeração.

A coleta e o envio de material para laboratório deverão ser realizados por médico-veterinário cadastrado, em um formulário específico exigido pelo Mapa. Em caso de positividade o animal será sacrificado^[9].

Referências bibliográficas

1. AL-ANI, F.K.; ROBERSON, J. Glanders in horses: A review of the literature. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, p. 203-218, 2007.
2. BLANCOU, J. Les anciennes methodes de surveillance et de controle de la morve. **Bulletin Société Vétérinaire Prat. de France**, v. 78, n. 1, p. 35-54, 1994.
3. CARTER, G.R.; DAVIS, E. Microbial Diseases: G trough L. In: CARTER, G.R et. al. **A concise Guide to the Microbial and Parasitic Disease of Horses**. International veterinary Information Service, Ithaca, 2007.
4. HENNING, N.W. **Animal diseases in South África**. 3. ed., Central News Agency. Pretoria, South Africa, p. 159-181, 1956.
5. HIPÓLITO, O., FREITAS, M.G. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 3. ed., Belo Horizonte: Edições Melhoramentos, 232p., 1963.
6. HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 446p., 2003.
7. JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C.; PLANER, M. **Pathology of domestic animals**. 4. ed., Academic Press, 640p., 1993.
8. LANGENEGGER, J., DÖBEREINER, J.; LIMA, A.C. Foco de mormo na região de Campos, Estado do Rio de Janeiro. **Arqs. Inst. Biol. Animal**, v. 3, p. 91-108, 1960.
9. MAPA, Diagnóstico de mormo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 fev. 2009.
10. MOTA, R.A. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo. **Vet. e Zootec.** v. 13, n. 2, p. 117-124, 2006.
11. MOTA, R.A. et al. Mormo em eqüídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas **Pesq. Vet. Bras.** v. 20, n. 4, p. 155-159, 2000.

12. PIMENTEL, W. História e organização do serviço veterinário do exército. **Revista Militar de Medicina Veterinária**, v. 1, p. 283-322, 1938.
13. PRITCHARD, D.G. Glanders. **Eq. Vet. Educ.** v. 7, p. 29, 1995.
14. RABELO, S.S.A. Infecção natural pela *Burkholderia mallei* em muares (*Equus asinus caballus*) procedentes da Zona da Mata do Estado de Pernambuco: aspectos clínicos, hematológicos e bioquímicos séricos. 2003. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 55p.
15. RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C. & HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1.737p., 2002.
16. SANFORD, J.P. Pseudomonas species. In: MANDELL et. al. **Principles and practice of infectious disease**. 8. ed., New York: Churchill Livingstone, p. 2003-2008, 1995.
17. SILVA, L.B.G. Diagnóstico microbiológico do mormo em eqüídeos e infecção experimental em cobaias (*Cavia porcellus*) pela *Burkholderia mallei*: aspectos clínicos e anatomo-histopatológico. 2003. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 70p.
18. SHARRER, G.Y. The great glanders epizootic USA. In: A civil war legacy. **Agric. History**, v. 69, p. 79-97, 1995.
19. SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 1999. 366p.
20. THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. 4. ed., São Paulo: Varela Editora e Livraria. 2005.
21. TYLER, S.D., STRATHDEE, C.A., ROZZE, K.R., JOHNSON, W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. **Clin. Diag. Lab. Immun.** v. 65, p. 4319-4321, 1995.

1.4 Rodococose

Conceito

A rodococose (pneumonia por *Rhodococcus equi*) é uma doença infectocontagiosa, causada pela bactéria *Rhodococcus equi*, acometendo animais domésticos, selvagens e o homem. Essa bactéria é encontrada no ambiente de propriedades rurais. É considerada oportunista, ocasionando reações piogranulomatosas. O equino é a espécie mais acometida, sendo de grande importância em potros, nos quais causa infecções pulmonares^[7], podendo manifestar-se em outros também, como diarreia, peritonite, abscedência subcutânea, artrite e osteomielite^[9]

Etiologia e Patogênese

O *R. equi* é encontrado normalmente no trato gastrointestinal de equinos e eliminado no ambiente através das fezes, permanecendo no solo, seu reservatório natural. Pesquisadores sugerem que o microrganismo faça parte da microbiota intestinal dos equinos, e ele cresce melhor em solos enriquecidos com fezes. Estudos demonstram crescimento ótimo em aerobiose com pH entre 7 e 8,5 e temperatura de 30°C. O solo é considerado fonte de infecção, mas não se sabe se é pela contaminação do solo com fezes, ou pelo fato de o microrganismo ser originalmente terrestre. Por tratar-se de um organismo aeróbico, ele não consegue multiplicar-se no trato gastrointestinal de um equino adulto, podendo apenas transitar pelo intestino. Porém, em potros recém-nascidos, ocorre colonização intestinal por esse microrganismo, sendo um sítio de multiplicação. A presença da bactéria no solo e nas fezes, podendo ela ser ingerida ou inalada, associada a alta

concreção animal, acúmulo de fezes, e instalações utilizadas ininterruptamente, pode favorecer a ocorrência de surtos^[2].

O *R. equi*, em cultivo, apresenta colônias mucoídes branco-acinzentadas que, quando incubadas por períodos prolongados, demonstram pigmento salmão. Uma importante característica desse microrganismo é a presença de ácido micólico na parede celular, estando relacionado com a patogenicidade das cepas^[1].

Fatores de virulência possibilitam a multiplicação do microrganismo no interior dos fagócitos, incluindo cápsula polissacarídica, ácido micólico e exoenzimas. A cápsula e o ácido micólico dificultam a fagocitose, não ocorrendo a formação do fagolisossoma^[7]. As exoenzimas e os polissacarídeos capsulares (fator equi), são responsáveis pela destruição dos tecidos do hospedeiro pela atividade membranolítica^[1]. O *R. equi* possui ainda virulência associada a plasmídios (VAP), responsáveis pela expressão de antígenos de 15 a 17 kDa (VapA), de alta virulência, e 20 kDa (VapB), de virulência intermediária^[7]. A VapA é o principal antígeno codificado por plasmídios, relacionado com infecção em equinos, sendo sua expressão termorregulada entre 34 e 41°C, aumentando em condições de baixo pH. Esse fato pode estar relacionado à sobrevivência do microrganismo no interior de macrófagos, onde precisa defender-se dos intermediários ativos de oxigênio e nitrogênio (ROI e RNI) e da acidificação. Com isso, muitas bactérias intracelulares aumentam a expressão de genes virulentos em pH ácido^[1].

Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos, evidência de abdome pulmonar em radiografias e cultivo positivo para *R. equi* em aspirados traqueobrônquicos (bastonete pleomórfico Gram-positivo). Foi desenvolvido um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico, mas o isolamento bacteriano mostrou-se mais eficiente. Testes sorológicos foram desenvolvidos e são melhores para monitoramento de rebanhos^[9]. Os testes imunológicos incluem imundifusão em gel de ágar, inibição da hemólise sinérgica, imundifusão radial e ELISA, sendo este último útil na detecção precoce de anticorpos contra *R. equi*. Os testes sorológicos podem apresentar problemas como: potros com infecção subclínica que podem desenvolver anticorpos e ser positivos, potros em estágios precoces da infecção que podem não ter desenvolvido anticorpos, e também a exposição de potros ao *R. equi* leva ao desenvolvimento de anticorpos sem necessariamente ocasionar doença^[8]. Hematologicamente, observa-se leucocitose com neutrofilia e hiperfibrinogenemia^[9].

a) Epidemiologia

A rodococose acomete potros, principalmente aqueles entre 1 e 6 meses de idade, e a maioria dos sinais clínicos ocorre antes dos 4 meses. A doença nesse período coincide com a fase em que o sistema imune celular é imaturo e os anticorpos adquiridos passivamente começam a desaparecer^[8]. A prevalência da rodococose parece aumentar em clima seco, quente e empoeirado, e o isolamento de *R. equi* do ar aumenta quando temperatura, aridez e ventos aumentam, diminuindo em dias chuvosos. Mesmo com altas concentrações do microrganismo no solo, potros que pastam correm menor risco de adoecer do que aqueles que permanecem nos arredores dos estábulos, onde o ambiente é mais empoeirado^[3]. Apesar de a principal via de transmissão do agente ser a aerógena, deve-se ter atenção à coprofagia, atitude comportamental normal entre os potros jovens, responsável pelo desenvolvimento da microbiota cecal^[4].

A enfermidade é endêmica, sendo esporádica, ou ocorrendo casos subclínicos, dependendo da imunocompetência dos potros, das condições ambientais, do manejo e da patogenicidade das cepas que se encontram no ambiente^[8].

b) Sinais clínicos

São conhecidas três formas clínicas: pneumonia aguda, pneumonia crônica (mais comum) com abscessos piogranulomatosos e a forma menos comum, que é a intestinal associada com linfadenite mesentérica^[8]. A forma aguda é a mais comum, acometendo principalmente potros com menos de 4 meses de idade. Apesar do início agudo da doença, há um período de incubação, quando os sinais são mínimos e o desenvolvimento dos sinais é associado a extensas lesões pulmonares^[5]. Os sinais clínicos incluem sibilos e crepitações pulmonares à auscultação, febre, secreção nasal mucopurulenta e taquipneia. Pode estar presente angústia respiratória, pelo início agudo. A infecção pode manifestar-se em outros sistemas além do respiratório, ocasionando diarreia, peritonite, abscedência subcutânea, artrite e osteomielite^[9].

c) Patologia

As lesões mais encontradas são broncopneumonia supurativa abscedente e linfadenite supurativa associada. Na grande maioria dos casos as lesões estão concentradas na porção anteroventral dos pulmões. Também é visualizado no intestino um processo piogranulomatoso, semelhante àquele do pulmão, que inicia nas placas de Peyer, sendo estas destruídas e ocorrendo formação de úlceras. Com a disseminação da infecção, os linfonodos regionais são acometidos^[8].

d) Diagnóstico laboratorial

Hiperfibrinogenemia é um achado consistente em potros com rodococose. Leucocitose neutrofílica com ou sem monocitose é comum. Radiografias torácicas são úteis no diagnóstico, revelando padrão alveolar proeminente, regiões de consolidação ou abscedência. Ultrassonografia é uma ferramenta de ajuda no diagnóstico quando tecidos na periferia dos pulmões estão envolvidos. Testes sorológicos têm sido descritos para diagnóstico de rodococose, sendo seu uso controverso, porque potros jovens podem ser expostos ao microrganismo, ocorrendo produção de anticorpos sem necessariamente ocorrer a doença. Testes sorológicos são úteis para amostras de rebanho. Cultura bacteriana combinada com citologia de aspirados traqueais permanece como método definitivo de diagnóstico. Mas potros sem sinais da doença que permanecem em ambientes empoeirados podem apresentar o microrganismo. As culturas podem permitir resultados tão sensíveis quanto a reação em cadeia da polimerase, oferecendo a vantagem de testes de suscibilidade antimicrobiana. Porém a reação em cadeia da polimerase, em ensaios posteriores, é mais sensível e específica que a cultura de aspirados traqueobrônquicos para o diagnóstico^[6].

e) Diagnóstico diferencial

Diferenciar de outras formas de pneumonia em potros como a doença respiratória viral, que pode ser causada por rinovírus, herpesvírus e vírus da influenza; imunodeficiência combinada dos potros árabes, que é hereditária levando à linfopenia grave; pneumonia intersticial; infecção do trato respiratório por *Streptococcus zooepidemicus*; pneumonia parasitária causada por estágios migrantes de *Parascaris equorum* e pneumonia por *Pneumocystis carini*^[5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se enviar sob refrigeração lavado traqueal, suave de secreção nasal, amostra de sangue, fragmentos de órgãos e linfonodos com lesão coletados na necropsia para exame microbiológico. Na amostra de sangue, geralmente se encontra leucocitose com neutrofilia e monocitose, em de aumento do fibrinogênio plasmático, são alterações característica de *R. equi*, porém não é diagnóstico definitivo. Os fragmentos de órgãos e linfonodos com lesão, também, devem ser acondicionados em formalina 10% para exame histopatológico.

Referências bibliográficas

1. KEWER, C.C.; COSTA, M.M.; SCHRANK, I.; VARGAS, A.C. *Rhodococcus equi*. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 75, n. 4, p. 533-545, 2008.
2. LAZZARI, A.; DE VARGAS, A.C.; DUTRA, V.; DA COSTA, M.M.; FLORES, L.A.S. Aspectos epidemiológicos do *Rhodococcus equi* em eqüinos do município de Bagé, RS, Brasil. Ciência Rural, v. 27, n. 3, p. 441-446, 1997.
3. MARTINS, C.B. **Titulação de anticorpos anti-Rhodococcus Equi em éguas prenhas e potros.** Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2003.
4. MARTINS, C.B.; BONESSO, M.A.; LIMA, M.M.; FERRAZ, L.C.; LACERDA NETO, J.C.; MACHADO, R.Z. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* em potros. Ciência Rural, v. 35, n. 3, mai.-jun., p. 618-624, 2005.
5. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária.** 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
6. REED, S.M.; WARWICK, M.B.; SELLON, D.C. **Equine Internal Medicine.** Saint Louis. 2. ed., Saunders, 2004.
7. RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; FERNANDES, M.C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococeose nos animais e no homem. Veterinária e Zootecnia, v. 14, n. 12, dez., p. 147-163, 2007.
8. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** São Paulo. 2. ed., Varela, 2001.
9. SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais.** 3. ed. São Paulo: Manoel

1.5 Tétano

Conceito

Doença toxico-infecciosa anaeróbia grave que acomete os mamíferos, é causada por uma neurotoxina produzida pelo *Clostridium tetani*. É caracterizada por rigidez muscular e morte por parada respiratória ou convulsões^[3,4]. Ocorre variação de suscetibilidade entre as espécies animais, sendo os equinos os mais suscetíveis^[3].

Etiologia e Patogênese

Clostridium tetani é uma bactéria anaeróbia Gram-positiva, formadora de esporos, sendo comumente encontrada no solo e no trato digestório dos herbívoros^[3,4]. A bactéria por si não possui capacidade invasora tecidual; a produção de toxinas é que desencadeia a doença^[2]. Na maioria dos casos a bactéria penetra por ferimentos, não invadindo os tecidos, multiplicando-se somente quando em condições de anaerobiose^[1,2]. Se no local onde a bactéria foi inoculada ocorrer situação de anaerobiose, os esporos de *C. tetani* germinam para a forma vegetativa. Os esporos podem permanecer dormentes por meses ou anos, ficando a salvo da resposta imune, até que ocorra situação favorável para a germinação. Na fase final de germinação há a formação de toxinas, sendo também dirigida por um gene associado ao plasmídio^[4]. Três toxinas são produzidas: tetanospasmina, tetanilisina e uma toxina não espasmogênica^[3,4]. A tetanospasmina difunde-se pela circulação sistêmica, sendo distribuída para a região pré-sináptica da placa motora terminal. Depois, ela é transportada para o sistema nervoso central, pelos axônios, transpondo a fenda sináptica até

os interneurônios inibitórios pré-sinápticos. Provavelmente a toxina inibe a liberação de glicina e ácido γ -aminobutírico (GABA) resultando em hipertonia e espasmos musculares. A tetanolisina ocasiona necrose tissular local e a toxina não espasmogênica supõe-se que produza uma exagerada estimulação do sistema nervoso central^[4].

Diagnóstico

É baseado essencialmente nos dados epidemiológicos e sinais clínicos. Os sinais mais facilmente detectáveis e característicos são espasmos musculares e prolapsão da terceira pálpebra com histórico recente de lesão ou cirurgia^[3].

a) Epidemiologia

O *C. tetani* é uma bactéria com distribuição mundial, cujos esporos podem permanecer por anos no ambiente, sendo encontrada com maior facilidade em solos usados para cultivo intensivo (solo com grande contaminação por matéria fecal) e em locais quentes^[3]. Os animais adquirem o agente mais comumente através de ferimentos que podem ser por traumatismos acidentais, infecções cutâneas causadas por ferimentos com materiais cortantes ou perfurantes, nas feridas cirúrgicas por falta de higiene e pelo uso de materiais não esterilizados. Os potros recém-nascidos ainda estão sujeitos à infecção umbilical. Contudo, a moléstia somente ocorrerá em condições de anaerobiose, pois dessa forma os esporos podem permanecer latentes nos tecidos por algum tempo e somente produzir a doença clínica quando as condições favorecerem sua proliferação. A letalidade varia muito de uma área para outra, depende do grau de contaminação.

b) Sinais clínicos

O período de incubação do tétano é variável de uma semana a alguns meses, dependendo da dimensão do ferimento, grau de anaerobiose, número de bactérias inoculadas e título de antitoxina do hospedeiro^[3]. Os sinais clínicos característicos são rigidez muscular acompanhada de tremores, marcha rígida devida à dificuldade de flexão das articulações, orelhas eretas ou cruzadas (orelhas em tesoura), protrusão das membranas nictitantes quando o animal é estimulado, trismo mandibular e tetania dos músculos masseteres dificultando a alimentação. Os reflexos aumentam em intensidade e o animal se excita facilmente em espasmos gerais e mais violentos por meio de movimento ou ruídos súbitos.

Com o progredir da doença o animal adota uma postura com os membros estirados e abertos (“postura de cavalete”) para possibilitar base de apoio ampla e facilitar a respiração, e a cauda fica ereta e desviada para um dos lados (cauda em bandeira). Nessa fase os reflexos a ruídos, luz solar e toque, principalmente no focinho, são respondidos com hiper-reflexia violenta^[2]. O animal apresenta grande dificuldade para locomover-se e está predisposto a cair com os membros em tetania, podendo traumatizar-se gravemente^[1,2]. Podem ocorrer convulsões e opistotônico, a sudorese é profusa e normalmente o animal vem a óbito. A morte ocorre 5 a 15 dias após os primeiros sinais clínicos por conta da asfixia causada pela paralisia dos músculos respiratórios, falta de alimentação e água, e acidose^[2].

c) Patologia

Não existem achados macroscópicos ou histológicos para confirmação do diagnóstico, mas deve-se fazer uma inspeção à procura do local da infecção^[1,3]. O local da infecção pode não ser mais observado, mas deve-se procurar por possíveis cicatrizes. Durante a necropsia devem-se preparar esfregaços com material do local da ferida ou do baço e, mesmo sendo difícil, deve-se tentar fazer o cultivo do microrganismo^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

O *Clostridium tetani* é uma bactéria anaeróbia, Gram-positiva e bastonete reto com comprimento de 3 a 12 μ m por 0,3 a 0,6 μ m de largura. Apresenta colônias hemolíticas que se assemelham a esferas de algodão no meio de gelatina. Pode ser encontrado sozinho ou em longos filamentos. Os esporos, que são terminais, aparecem 24 a 48 horas a incubação e possuem aparência de raquete de tênis.

e) Diagnóstico diferencial

Nos estágios iniciais deve-se diferenciar principalmente de tetania hipocalcêmica, laminitide aguda, e também pode ser confundido com paralisia periódica hipercalcêmica, miosite, principalmente após injeção na região cervical, envenenamento por estricnina e meningite. Após o estabelecimento completo do tétano, por ser muito distinto clinicamente, dificilmente é confundido com outras enfermidades^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Preparar esfregaços, durante a necropsia, por impressão do baço e do local da ferida corados pelo Gram. Também pode ser feito suave do local da ferida para cultura microbiológica e enviado em meio de transporte anaeróbio. Pode-se, também, enviar o baço em recipiente hermético estéril para cultura anaeróbia^[1].

Referências bibliográficas

1. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2002.
2. THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos Cavalos**. São Paulo - SP. 4. ed., Varela editora e livraria; 2005.
3. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2. ed., São Paulo: Varela; 2001.
4. SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed., Barueri, SP: Manole; 200.

2. PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS DOS EQUINO

2.1 Anemia infeciosa

Conceito

Doença infectocontagiosa causada por um vírus RNA^[7]. Acomete todos os membros da família dos equídeos (cabalos, mulas, jumentos, zebras, etc.), não havendo preferência por raça, sexo ou idade. O vírus da anemia infeciosa equina (AIE) tem distribuição mundial, com prevalência em regiões úmidas e pantanosas, na qual provavelmente a quantidade de vetores é maior. É uma doença sem cura e o animal infectado é o único reservatório da doença^[6].

Etiologia e Patogênese

Doença causada por um vírus RNA envelopado da família Retoviridae e gênero *Lentivirusae*. O vírus possui reatividade cruzada com os vírus da imunodeficiência humana e felina^[6]. Esse vírus possui a enzima transcriptase reversa, a qual possibilita mudanças no genoma viral^[3]. Há um antígeno específico (p26) que conserva a base para os testes de diagnóstico até 45 dias após a

infecção. Na superfície do vírus existem glicoproteínas (gp45 e gp90) que provavelmente são exigidas para penetração do vírus na célula do hospedeiro, atuando como imunoestimulantes e estão presentes até 60 dias após a infecção^[2]. A inativação desses vírus se dá por detergentes, solventes lipídicos e calor (56° por 30 minutos).

Após a infecção o vírus da AIE multiplica-se a altos títulos, primeiramente em macrófagos maduros de fígado, baço, linfonodos, pulmões, rins e glândulas adrenais, sendo o baço o principal sítio de replicação, ocorrendo com isso destruição dos macrófagos, e antígenos virais são liberados na circulação coincidindo com aumento na temperatura^[3]. Ocorre, ainda, formação de complexos antígeno-anticorpo induzindo febre, anemia, trombocitopenia, glomerulonefrite e depleção do complemento. Observa-se hemólise ou eritrofagocitose por conta da ativação do sistema reticuloendotelial. Deficiência transitória de ferro também é observada e ela se deve à liberação tardia de ferro dos macrófagos. Essa liberação de antígenos estimula a produção de anticorpos pelo hospedeiro.

Em relação à anemia e à trombocitopenia, que são sinais marcantes da doença, vale salientar que a anemia pode dar-se pelo encurtamento da vida das hemácias, pela ativação reticuloendotelial e pelo efeito supressivo do vírus na medula óssea. A trombocitopenia também é atribuída à deposição de imunocomplexos nas plaquetas, a sua remoção da circulação e ao efeito supressivo do vírus sobre os megacariócitos^[2].

O vírus da AIE possui transcriptase reversa e pode ocasionar erros na cópia do genoma viral resultando em mutações genéticas. Essas mutações conferem variação antigenica ao vírus, possibilitando que ele escape da resposta imune do hospedeiro, sendo, assim, um dos mecanismos de persistência viral. Além disso, outro mecanismo de persistência do vírus é sua habilidade em inserir uma cópia de seu DNA no DNA hospedeiro, incorporando-se ao genoma do hospedeiro e tornando-se latente. Com isso, não há expressão de antígenos virais pela célula, não ocorrendo reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, permanecendo ele como portr^[3].

Diagnóstico

Devem ser observados: epidemiologia, sinais clínicos e achados de necropsia.

O teste diagnóstico de escolha é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) ou a prova de Coombs. Atualmente o teste de ELISA competitivo (cELISA) também é utilizado, o qual apresenta grande sensibilidade e rapidez no resultado, mas pode ocasionar falso-positivos, devendo ser confirmado pelo teste IDGA^[4].

a) Epidemiologia

A infecção se dá pela transmissão do sangue ou derivados sanguíneos contaminados pelo vírus da AIE de um equídeo para outro equídeo^[3]. A morbidade varia consideravelmente dependendo da cepa do vírus e do inóculo distribuído pela picada do inseto^[2]. Os insetos hematófagos são os principais vetores da doença, especialmente os da família Tabanidae, mosca-do-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) e mosquitos como o pôlvora (*Culicoides spp*)^[3]. Não há multiplicação do vírus nos insetos vetores, e contaminação desses insetos ocorre quando realizam repasto sanguíneo em um animal infectado. A transmissão ocorre quando o inseto interrompe sua alimentação em um animal doente e continuam seu repasto em um animal saudável. Também ocorre transmissão vertical (intrauterina), e por leite materno, sêmen, utensílios e equipamentos. Os sinais da doença podem desenvolver-se 15 a 60 dias após a exposição^[5].

b) Sinais clínicos

A doença clínica pode manifestar-se nas formas aguda, subaguda a crônica e inaparente, sendo possível a reversão de uma forma para outra a qualquer instante^[4,7]. Na primeira exposição dos equinos à infecção normalmente os animais apresentam sinais agudos ou subagudos^[2]. As manifestações clínicas nos casos agudos e subagudos são: elevação intermitente da temperatura, oscilando de 39°C a 41°C, anorexia, fraqueza, anemia hemolítica, depressão, perda de condição, icterícia, edema de membros e abdômen, petéquias nas mucosas, especialmente sob a língua e conjuntiva, e pode ocorrer aborto em éguas durante qualquer estágio de prenhez durante o período febril (os potros de éguas e garanhões infectados, porém assintomáticos, são soronegativos e clinicamente normais ao nascimento – pré-colostral). Os animais morrem 10 a 30 dias após os primeiros sintomas ou recuperam-se temporariamente (forma crônica) por duas a três semanas quando ocorre recidiva com sinais clínicos similares, porém cada vez mais brandos, podendo vir a óbito durante essa fase^[2,7]. As recidivas ocorrem em intervalos aproximados de duas semanas e geralmente cessam após um ano. Após esse período, se houver recidivas, normalmente estão associadas a estresse e, mesmo na ausência dos sintomas, os animais infectados são portadores. A maioria dos óbitos ocorre com 1 ano de infecção^[2].

c) Patologia

Durante a necropsia, pode-se encontrar edema subcutâneo, icterícia, hemorragias petequiais ou equimoses das membranas serosas, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatia generalizada. Em casos crônicos normalmente os únicos sintomas são anemia e emagrecimento. Histologicamente, são observados hemossiderose do fígado, baço e linfonodos, vasculite em diversos órgãos e glomerulonefrite pela deposição de imunocomplexos^[3]. Quanto à patologia clínica, ocorrem anemia, trombocitopenia e presença de siderolucócitos. Pode ainda estar presente hipergamaglobulinemia, aumento da bilirrubina e diminuição da concentração de ferro^[2].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico diferencial pode ser realizado em laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela imunodifusão em gel de ágar (IDGA) ou teste de Coggins e pelo teste de ELISA competitivo (ELISAC ou cELISA); ambos os testes detectam anticorpos para o antígeno proteico p26 do núcleo do vírus da AIE^[4]. Também se pode fazer o isolamento viral com amostras de baço, fígado, medula óssea e linfonodos periepáticos infectados^[2]. A AIE é uma doença de notificação obrigatória^[7].

O exame com resultado negativo possui validade de 180 dias para propriedades controladas e 60 dias para os demais casos. A propriedade será considerada controlada após dois testes negativos com intervalos de 30 e 60 dias, e para manutenção do *status* ela deverá testar seus animais a cada 6 meses e apresentar resultado negativo. Em caso de positividade a propriedade é interditada e notificada, proibindo o trânsito de equinos. Todos os equinos dela devem ser testados para AIE. Os animais portadores deverão ser marcados com ferro quente com a marca “A” em um círculo com 8cm de diâmetro na escápula esquerda e a sigla do estado de origem. Pode-se proceder ao teste para contraprova, o qual é realizado 15 dias após o primeiro. Animais positivos são sacrificados ou mantidos em isolamento em áreas de alto risco^[1].

e) Diagnóstico diferencial

Na doença aguda deve-se diferenciar de babesiose, púrpura hemorrágica, erliquiose equina, arterite viral equina, anemia hemolítica autoimune, leptospirose, parasitismo e trombocitopenia idiopática. Na doença crônica deve-se diferenciar de abscedência interna (infecção metastática por *Streptococcus equi*), doença inflamatória crônica, neoplasia e hepatite crônica^[2].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem ser enviados ao laboratório no mínimo 2ml de soro sanguíneo ou 4ml de sangue íntegro coletado em tubo estéril e sem anticoagulante por animal a ser testado. Quando em locais ermos, pode-se proceder à colheita de sangue através de papel-filtro quadriculado de 4 x 4 e, após a secagem, ele pode ser enviado ao laboratório para o teste de IDGA. Enviar fragmentos de baço, fígado, medula óssea e linfonodo periepático para isolamento viral e outras amostras desses mesmos órgãos e dos rins, pulmões e coração. Essas amostras devem ser fixadas em formalina e enviadas ao laboratório de patologia animal para exame histopatológico^[2]. Para a remessa de material ao laboratório o médico-veterinário responsável deve preencher uma resenha contendo as informações pertinentes ao proprietário e ao animal, e todas as características fenotípicas do equino deverão constar na resenha. A resenha será a identificação do animal^[1].

Referências bibliográficas

1. MAPA. **Normas para a Prevenção e o Controle da Anemia Infecciosa Equina (AIE)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2004. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2009.
2. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF,K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
3. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Rumiantes e Equinos**. 2. ed., São Paulo: Varela editora e livraria, 2001.
4. SMITH, B.P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3. ed., São Paulo: Manole; 2006.
5. SILVA, R.A.M.S.; ABREU, U.G.P. de; BARROS, A.T.M. de. **Anemia Infecciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal**. Corumbá, EmbrapPantanal, 2001. 30p.
6. SOUZA, A.O.; SALVATTI JÚNIOR, J.R.; PICCININ, A. Anemia Infecciosa Equina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 10, jan. 2008.
7. THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. 4. ed., São Paulo: Varela edito 2005.

2.2 Arterite viral

Conceito

A arterite viral equina é uma doença infectocontagiosa dos equinos causada por um membro da família Arteriviridae, do gênero *Arterivirus*, denominado vírus da arterite equina (*equine arterivirus*, EAV). Essa denominação se deve às lesões inflamatórias características que o vírus produz no endotélio dos vasos, principalmente nas arteríolas^[4].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico é um vírus RNA de polaridade positiva, restrito aos equídeos^[3]. A penetração geralmente ocorre pela via respiratória ou oral e o vírus se replica, inicialmente, no epitélio respiratório e em macrófagos alveolares. Por volta do terceiro dia após a infecção, o vírus se replica nos linfonodos bronco-pulmonares, no endotélio dos vasos pulmonares e em monócitos circulantes. A partir daí, o vírus tem acesso à circulação sanguínea e se dissemina pelo organismo. Subsequentemente, ocorre replicação no endotélio dos vasos sanguíneos.

A doença foi caracterizada pela primeira vez em 1953, por Doll et al. (1957), quando o vírus foi isolado de pulmões de fetos abortados durante uma epidemia de abortos e doenças respira-

tórias em equinos da raça *Standardbred*, na região de *Bucyrus*, Ohio, nos Estados Unidos. Acredita-se que o aborto ocorra devido a uma miometrite provocada pela replicação viral, causando a liberação de prostaglandinas. Por causa das perdas reprodutivas – como aborto ou morte de neonatos – ou redução no desempenho esportivo, a infecção pelo EAV pode causar grandes prejuízos econômicos para a equinocultura. Há, também, redução no valor comercial de garanhões infectados, bem como na demanda reprodutiva desses animais, e recusa no mercado internacional de sêmen de portadores ou de qualquer animal soropositivo^[4].

Diagnóstico

A arterite viral equina deve ser considerada nos casos de doenças em que os animais apresentem febre, depressão, edema, conjuntivite, descarga nasal e aborto. Porém, para fins de diagnóstico definitivo, são necessários testes laboratoriais.

a) Epidemiologia

Após o primeiro isolamento do EAV por Doll et al. (1957), a infecção tem sido detectada em populações equinas em todo o mundo, demonstrando a ampla disseminação do agente^[4]. No Brasil, já foram detectados anticorpos contra o vírus em cavalos, e em trabalho realizado com equinos no estado de São Paulo, foram testados 659 soros. A soroprevalência foi de 18,2%, sendo a raça Mangalarga a que apresentou maior prevalência (33,3%), e as fêmeas tiveram prevalência mais alta (22,9%) que os machos^[4]. Recentemente, no Rio Grande do Sul, foi encontrada uma soroprevalência de 2,2%, de 1506 amostras de equinos testadas, em 65 municípios do estado^[3]. O aumento do comércio internacional de animais e de sêmen pode ter contribuído para a disseminação do EAV. No entanto, em um estudo realizado no município de Monte Negro, RO, não foram encontrados anticorpos contra o EAV em 176 equídeos (15 muares e 161 equinos) testados^[1].

O período de incubação varia entre 2 e 13 dias, com média de 7 dias. A transmissão do EAV pode ocorrer através de secreções e excreções de animais infectados ou, ainda, por aerosóis, fômites, água e alimentos contaminados. Os aerossóis e o trato respiratório são a principal forma de disseminação em locais com grande aglomeração e contato entre os animais, como exposições, feiras, corridas, leilões e outros eventos^[5]. O vírus está presente nas secreções nasais de cavalos com infecção aguda por até 16 dias. A forma venérea também apresenta um sério risco para as propriedades que possuem garanhões portadores do EAV, pois de 85% a 100% das éguas cobertas por esses garanhões, ou inseminadas com o seu sêmen (fresco, resfriado ou congelado), se infectam^[4,5].

Estima-se que entre 30% e 60% dos garanhões infectados se tornem persistentemente infectados e excretem o vírus por longos períodos e, em alguns casos, por até toda a vida. Entretanto, alguns animais conseguem erradicar o vírus espontaneamente do trato reprodutivo. Acredita-se que o estabelecimento e a manutenção viral sejam dependentes de testosterona. Assim, machos castrados podem erradicar o vírus em cerca de 2 a 3 semanas após a infecção. A transmissão congênita também pode ocorrer, resultando em aborto ou natimortos. Nesses casos, os tecidos fetais e a placenta são importantes fontes de infecção, pois contêm grande quantidade do vírus^[4].

b) Sinais clínicos

As manifestações clínicas são decorrentes das lesões produzidas nos endotélios vasculares e do aumento da permeabilidade vascular devido à liberação de citocinas e mediadores inflamatórios. Geralmente, a doença é mais grave em animais jovens ou muito velhos, em animais debilitados ou sob estresse físico. A maioria das infecções pelo EAV é subclínica e passa desperce-

bida. Mas quando há o desenvolvimento de sinais clínicos, estes incluem: descarga nasal muco-purulenta; rinite; lacrimejamento; conjuntivite; edema palpebral, escrotal, da glândula mamária, de membros e, em casos mais graves, edema pulmonar. Além disso, em alguns casos, podem-se evidenciar sinais inespecíficos, como: tosse, fotofobia, apatia, ataxia, dispneia, anorexia, diarreia e cólicas.

É importante salientar, que a maioria dos casos se recupera espontaneamente, pois a mortalidade é muito baixa. Apenas em neonatos infectados intrauterinamente se observa mortalidade. Por isso, as maiores perdas econômicas estão relacionadas à reprodução. Geralmente, os abortos ocorrem entre 7 e 14 dias após o início dos sinais clínicos. Ao contrário das éguas, os garanhões afetados pelo EAV podem passar por um período de redução de fertilidade. Acredita-se que esse quadro transitório seja devido ao aumento da temperatura testicular associado à resposta inflamatória local^[3,4,5].

c) Patologia

Os isolados do EAV diferem na virulência e, portanto, na severidade das lesões. As lesões macroscópicas são o resultado das alterações vasculares, provocadas pela replicação viral. Edema, congestão e hemorragia são as principais lesões. Elas podem ocorrer no tecido subcutâneo dos membros, no abdômen, nos linfonodos e nas vísceras, como pulmões, intestino delgado e grosso, e útero. Pode-se observar, também, panvasculite com edema, trombose, necrose do tecido linfoide e necrose tubular renal^[2].

As cavidades corporais podem conter quantidade moderada ou abundante de exsudato amarelado, e os pulmões, especialmente dos neonatos, encontram-se edemaciados com grande quantidade de líquido. Devido à congestão e à hemorragia, áreas multifocais ou difusas avermelhadas podem ser observadas nos pulmões. Fetos abortados estão, geralmente, parcialmente “autolisados” e as únicas lesões visíveis são acúmulo de líquido nas cavidades corporais e pneumonia intersticial interlobular. As alterações histológicas são observadas em vários locais, mas a parede dos vasos é o local mais afetado. Lesões brandas incluem edema vascular e perivascular, com hiperplasia das células endoteliais. Nos casos mais severos, observam-se vasculite e necrose fibrinóide da túnica média, infiltrado de linfócitos abundante, perda do endotélio e formação de trombos. Os pulmões podem apresentar pneumonia intersticial de grau leve a severo, caracterizada por infiltração alveolar de macrófagos. As lesões no epitélio do trato reprodutivo de éguas que abortaram incluem edema, infiltração de macrófagos e neutrófilos. O miométrio pode conter miócitos necróticos. Nos machos, as lesões são caracterizadas por vasculite necrosante, envolvendo testículos, epidídimos, ductos deferentes, ampolas, próstata, glândulas vesiculares e bulbouretrais^[4].

d) Diagnóstico laboratorial

Pode-se identificar diretamente o agente, os抗ígenos ou o RNA viral nos tecidos ou em secreções, ou, ainda, detectar anticorpos específicos contra o vírus^[4]. O isolamento pode ser feito em células de rim de coelho RK-13^[3], células Vero ou em cultivos primários de células pulmonares de equinos. A detecção de抗ígenos pode ser realizada pela técnica de imuno-histoquímica ou ELISA, e a caracterização das lesões vasculares, por exames histológicos. A identificação de RNA viral é realizada com o uso de técnicas moleculares como RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*). Os testes sorológicos incluem fixação de complemento, soroneutralização, ELISA e imunodifusão. A infecção geralmente é confirmada por um teste sorológico em que a demonstração de um aumento de quatro vezes, ou mais, nos títulos de anticorpos é considerado positivo para a infecção. Nesses casos, o cavalo será considerado soropositivo à exposição ao EAV^[5].

e) Diagnóstico diferencial

As manifestações clínicas reprodutivas e respiratórias devem ser diferenciadas daquelas causadas por *herpesvirus* equino 1 e 4 (EHV-1 e 4), *adenovirus* equino, influenza equina e anemia infecciosa equina. Infecções bacterianas e causas não infecciosas de aborto também devem ser consideradas^[4].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras a serem enviadas ao laboratório para o isolamento do vírus incluem suabes nasais e nasofaríngeos ou sangue com anticoagulante. Os suabes devem ser enviados em meio de transporte, contendo antibióticos. O meio preferencial é o Meio Essencial Mínimo (MEM), no entanto, outros meios tamponados podem ser utilizados, como PBS, glicerol, solução fisiológica. Nos casos de aborto, enviar placenta, líquidos fetais, pulmões, fígado e tecidos linforreticulares do feto^[4]. Para aumentar a probabilidade de detecção do vírus, as amostras devem ser coletadas no início da fase febril, pois à medida que a doença progride, começam a aparecer os anticorpos. Para os testes sorológicos, enviar somente o soro, pois a hemólise que pode ocorrer durante o transporte prejudica o teste. É necessária a coleta de duas amostras, uma na fase aguda e outra na fase de convalescência (conhecida como amostra pareada).

Referências bibliográficas

1. AGUIAR, D.M. et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em eqüídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.
2. DEL PIERO, F. Equine viral arteritis: signs, lesions, pathogenesis and diagnoses. **Veterinary Parasitology**, v. 37, n. 4, p. 287-296, 2000.
3. DIEL, D.G. et al. Prevalência de anticorpos contra os vírus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em eqüinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1467-1473, 2006.
4. LIMA, M. de; OSORIO, F.A. Arteriviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: Editora da UFSM, 2007.
5. McCUE, P. Equine viral arteritis (EVA). **Client Information Bulletin**, Colorado State University, 2006.

2.3 Encefalomielite Equina por Alphavírus

Conceito

As encefalomielites virais dos equinos são doenças infecciosas e zoonóticas causadas por três tipos relacionados de vírus, pertencentes à família Togaviridae^[4]. Do gênero *Alphavirus*, são denominados vírus da Encefalomielite Equina do Leste (EEE), Oeste (WEE) e Venezuela (VEE)^[2].

Etiologia e Patogênese

Os *Alphavirus* são vírus RNA, pequenos e envelopados^[10], semelhantes estruturalmente, porém antigenicamente distintos^[4]. Os vírus replicam-se em hospedeiros vertebrados e artrópodes, sendo transmitidos por culicoides, mas também podem ser veteados por outros artropódes. Após a inoculação, a replicação viral primária ocorre nas células reticuloendoteliais do linfonodo regional, e acredita-se que as lesões encefálicas, que consistem de encefalite necrosante com des-

truição neuronal, são resultado da replicação viral^[2]. Em geral, para que ocorra epidemia em humanos e cavalos, são necessárias quantidades suficientes de animais reservatórios, vírus virulentos, hospedeiros intermediários infectados, insetos vetores e uma população adjacente suscetível de pessoas e cavalos^[4]. A doença associada a esses vírus restringe-se ao Hemisfério Ocidental e abrange desde regiões de clima temperado até desérticas^[4]. Os mosquitos vetores da doença necessitam de calor e umidade, por isso a manifestação clínica da enfermidade ocorre de forma sazonal, no final do verão e início do outono.

Os gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Culiseta* são vetores potenciais, enquanto equinos e humanos são hospedeiros acidentais, e pássaros são os reservatórios principais do vírus^[2]. Hospedeiros reservatórios tendem a desenvolver viremia, com títulos sanguíneos adequados para infestar mosquitos e contribuir ativamente para a sobrevivência do ciclo viral. Os três vírus são endêmicos nas Américas e, ocasionalmente, causam epidemia^[10]. Entre as encefalomielites, a EEE e WEE estão entre as mais importantes na causa de morbi-mortalidade equina e humana^[22]. O vírus da EEE é considerado mais virulento para cavalos do que o tipo da WEE. A mortalidade da EEE geralmente é acima de 90%, chegando a ser 100% fatal em cavalos e 50% em humanos^[14]. Já a do vírus da WEE pode ser superior a 50%, mas, em média, é de 20% a 30%. Equinos jovens são mais suscetíveis^[2].

Diagnóstico

Os sinais clínicos e a epidemiologia são apenas sugestivos de encefalomielite viral. O diagnóstico definitivo deve ser feito pelo laboratório de virologia.

a) Epidemiologia

A encefalomielite viral equina foi descrita nos EUA há muito tempo. No final do verão e início do outono de 1912, muitos equinos foram perdidos no Kansas, em Nebraska, no Colorado e em Oklahoma por encefalomielite^[21]. Em julho de 1930, a encefalite foi descrita na Califórnia e desapareceu com a chegada do frio em novembro. Estima-se que três mil asininos e muares morreram. Em 1933 apareceram focos isolados da doença nos estados de Delaware, Maryland, Virgínia e Nova Jersey. Os sinais clínicos eram muito semelhantes aos apresentados pelos equinos do oeste do país, porém a mortalidade era muito mais alta (aproximadamente 90%). Ainda no mesmo ano, foi descoberto que os vírus eram imunologicamente diferentes, e os animais que manifestaram a doença do leste não eram protegidos contra o vírus da doença do oeste, e vice-versa. Assim, foi demonstrado que existiam dois tipos de vírus, leste e oeste, que produziam encefalites em equinos com sinais clínicos e alterações patológicas praticamente idênticas, mas com a principal diferença de o vírus do leste ser muito mais virulento em cavalos^[20]. Em 1938, num surto de doença semelhante em equinos na Venezuela, isolou-se um vírus imunologicamente distinto dos vírus da EEE e da WEE^[3]. Em 1943 ocorreu um novo surto na costa da Venezuela e, em 1945, Gilyard isolou o vírus e elaborou uma vacina, mantendo o surto sob controle. Seis semanas antes desse surto, marinheiros da Força Naval Americana morreram de encefalite no mesmo local, sendo essa a primeira descrição de infecção em humanos pelo vírus da VEE. Antes de 1969, os surtos de VEE se limitavam à América do Sul, predominantemente Colômbia e Venezuela, e em menor extensão, Peru, Equador e Trinidad^[11]; de 1962 a 1964, ela matou milhares de cavalos e atingiu três mil pessoas, com 300 mortes.

Depois de ausente por muito tempo, reapareceu em 1995 na Colômbia, afetando mais de 75 mil pessoas, das quais 3 mil apresentaram problemas neurológicos, com 300 casos fatais. Do total de 50 mil equinos da região, pelo menos 8% morreram. O vírus encontrou uma população suscetível, e a precipitação pluviométrica permitiu o aparecimento de grande número de mosquitos

Aedes taeniorhyncus, que disseminou a enfermidade. O uso de pesticidas e programas de vacinação controlaram o surto e impediram a disseminação do vírus^[17].

No Brasil, atualmente, a ocorrência da encefalomielite viral equina é esporádica em sua maior parte, embora já tenha sido diagnosticada infecção em vários estados^[1,5,6,8,13,15]. Em um estudo realizado no Paraná, determinou-se que o vírus da EEE foi o causador de encefalite em equinos e ressalta que a América do Sul faz parte do roteiro migratório de aves silvestres (residentes e migratórias), em especial a região amazônica, que pode servir de reservatório natural do vírus devido ao clima. Foram analisadas 22 amostras de sangue equino, das quais 12 apresentaram sorologia positiva contra o vírus da EEE, embora o vírus não tenha sido isolado em nenhuma amostra^[8]. Em relação ao vírus da WEE, os resultados mostram uma baixa prevalência em relação ao vírus da EEE^[12]. Nesse estudo, a soroprevalência de anticorpos contra os dois vírus (EEE e WEE) foi calculada no estado do Pará. Foram testados os soros de 95 equídeos e foram detectados anticorpos contra EEE em 27,37%, e WEE em 1,09% dos 95 animais, em 32 propriedades analisadas. Resultados semelhantes foram encontrados apenas uma fazenda com animais sororreativos ao vírus da WEE^[13].

Recentemente, em 2007, a Prefeitura Municipal de Campinas informou a ocorrência de dois casos de EEE no município. E em 2005, haviam sido diagnosticados outros dois casos nos municípios de Piracaia e Mococa.

b) Sinais clínicos

As encefalites por *Alphavirus* apresentam uma diversidade de sinais clínicos que variam desde a ausência deles até a apresentação de disfunção cerebral e espinhal^[10]. As infecções sub-clínicas, ou pequenas alterações, como febre, anorexia e depressão, são mais frequentes, mas podem ocorrer doença sistêmica progressiva com alterações neurológicas mais severas nos casos da EEE^[12]. A doença é mais grave em animais não vacinados^[4]. Nos casos de EEE, a infecção febril envolve todo o SNC, e os cavalos ficam extremamente apáticos, atáxicos, sem vontade de se mover, apresentam paralisia nos nervos cranianos (facial, lingual e faringiano), nistagmo e nenhum ou pouco reflexo cutâneo^[10,23]. Os casos terminais apresentam demência, movimentos compulsivos dos membros, compressão da cabeça, e precedem um período de decúbito, durante o qual os cavalos ficam comatosos^[10].

Devido à alta mortalidade da EEE, os poucos animais sobreviventes, usualmente, ficam com alguma sequela do SNC. Na WEE os sinais são semelhantes aos da EEE, porém menos graves em cavalos e mais graves em humanos^[23]. A VEE pode apresentar sinais semelhantes aos da EEE e da WEE ou diferentes, sendo mais provável que isso se deva à diferença na patogenicidade das cepas. Normalmente, começa com febre e depressão, mas em breve surgem os sinais neurológicos. Hemorragias ocasionais podem ocorrer em diversos órgãos. Outros sinais associados incluem aborto, úlcera bucal, diarreia, hemorragia pulmonar e epistaxe^[4,23].

c) Patologia

Macroscopicamente, o cérebro e a medula espinhal não costumam apresentar alterações. Em alguns casos, observam-se congestão e alteração da cor do SNC. As alterações do líquido cefroespinhal são semelhantes a outras encefalites virais, e incluem aumento da celularidade (50 a 400 células mononucleares/ μ L) e da concentração de proteínas (100 a 200mg/dL). As lesões específicas incluem embainhamento perivasicular acentuado com infiltração por monócitos e neutrófilos, gliose, degeneração neuronal e inflamação meníngea mononuclear. Na VEE é comum encontrar necrose liquefativa e hemorragia do córtex cerebral, atrofia das células acinares pancreáticas e hiperplasia das células ductais pancreáticas^[4].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser feito pelo isolamento do vírus ou sorologia, com aumento na titulação de anticorpos, em soro pareado. Há também a descrição de diagnóstico por imuno-histoquímica, mas de qualquer forma, os resultados devem ser confirmados por isolamento viral ou sorologia^[16]. Os testes sorológicos são realizados nas fases convalescente e aguda da doença. No soro e no liquor, a presença de anticorpos é detectada pelos testes de inibição da hemaglutinação^[4,8], soroneutralização^[2], fixação de complemento^[4] e ELISA^[18]. Uma elevação de quatro vezes na titulação de anticorpos é considerada diagnóstico da doença, porém o aumento de anticorpos nem sempre é detectado^[2,4,10].

Os anticorpos estão presentes 24 horas após a viremia inicial e precedem os sinais de encefalite, sua concentração aumenta rapidamente e depois decresce, em seis meses. Cavalos com EEE geralmente não vivem tempo suficiente para obter soro pareado; por outro lado, títulos altos de IgM sugerem exposição recente ao vírus^[10]. ELISA pode detectar IgM específico contra a superfície glicoproteica do vírus cerca de 3 dias após o início dos sinais clínicos. Tais anticorpos não são produzidos em resposta à vacina. Em potros, os anticorpos do colostro podem interferir no diagnóstico. Os títulos de anticorpos no soro de potros com 2 a 8 dias de vida são semelhantes aos das respectivas mães, e a meia-vida sérica é em torno de 20 dias^[7].

Em infecções agudas, o vírus também pode ser isolado do liquor. As alterações no líquor incluem aumento na celularidade (50 a 400 células mononucleares/ μ L) e na concentração de proteínas (100 a 200mg/dL)^[4,10]. Essas alterações são mais proeminentes com a EEE do que a WEE e a VEE. O isolamento dos vírus do cérebro é feito por cultivo celular ou inoculação intracerebral em camundongos^[2,8,10]. O vírus da EEE foi isolado por cultivo celular, inoculando-se em células primárias renais de macaco Rhesus (RMK) A549 (carcinoma pulmonar humano) e MRC-5 (fibroblasto pulmonar fetal humano)^[19]. Os cultivos celulares eram examinados diariamente para observação de replicação viral. Para a detecção do antígeno viral da EEE, foi usado soro controle positivo (anticorpos polivalentes para arbovírus).

Os vírus também podem ser isolados do sangue total, porém este só deve ser colhido para diagnóstico na fase virêmica, quando os animais estão febris sem sinais neurológicos. Outro método de diagnóstico definitivo é pela identificação do ácido nucleico viral, através da reação de Transcriptase Reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)^[10].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da encefalomielite viral equina inclui o de outras doenças que também causam encefalite, como raiva, mieloencefalite por protozoário, encefalite verminosa, mielopatia degenerativa, meningite bacteriana, hepatoencefalopatia, leucoencefalomalacia, *herpesvirus* equino tipo 1, traumatismo craniano, botulismo e toxicoses^[4,10].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser enviado inclui soro, cérebro, liquor e sangue^[4]. É muito importante, por se tratar de material destinado à pesquisa de vírus viável, que o envio ao laboratório seja o mais rápido possível^[9]. O vírus é inativado rapidamente após a morte, por isso, para o diagnóstico laboratorial, é melhor “eutanasiar” o animal do que deixá-lo morrer naturalmente. O coletor deve sempre utilizar luvas e máscara, e todo o material deve ser coletado de forma estéril, de modo a não contaminar a amostra. Para a coleta de soro deve-se ter cuidado de modo a minimizar a hemólise. Acondicionar os soros em tubos estéreis de plástico ou vidro e enviá-los em gelo, em até 24 horas, resfriados e não congelados. O mesmo se deve fazer para o liquor. Os vírus também podem ser isolados do sangue total, porém este só deve ser colhido na fase virêmica, quando os animais

estão febris sem sinais neurológicos e, também, deve ser mantido refrigerado até a chegada ao laboratório^[4,9]. O cérebro, ou fragmentos dele, deve ser removido rapidamente e resfriado; pode ser conservado em glicerina a 50% ou em solução salina tamponada, pH 7^[5]. Se não chegar ao laboratório em até 48 horas, deve ser congelado e enviado em gelo seco. É recomendado que uma parte do cérebro seja enviada para diagnóstico de raiva.

Referências bibliográficas

1. ALICE, F.J. Encefalomielite eqüina na Bahia: estudo de três amostras isoladas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 11, p. 125-144, 1951.
2. BARROS, C.S.L. Encefalomielites virais dos eqüinos. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L.; MENDES, M.D.C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Pelotas: UFPEL Universitária, 1998.
3. BECK, C.E.; WYCKOFF, R.W.G. Venezuelan encephalitis. **Science**, v. 88, p. 530, 1938.
4. BERTONE, J.J. Encefalite causada por Togavírus. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
5. BRUNO-LOBO, J. et al. Isolamento de um vírus sorologicamente relacionado ao sub-grupo Western-Sindbis, de um caso de encefalomielite eqüina, ocorrida no Rio de Janeiro. **Anais de Microbiologia**, v. 9, p. 183-195, 1961.
6. CUNHA, R. Estudos sobre uma amostra de vírus da encefalomielite eqüina isolada de material proveniente de Recife. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina veterinária**, v. 14, p. 201-215, 1954.
7. FERGUSON, J.A. et al. Studies on immunity to alphaviruses in foals. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, p. 5-10, 1979.
8. FERNÁNDEZ, Z. et al. Identificação do vírus causador da encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.
9. FLORES, E.F. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007.
10. FONTAINE-RODGERSON, G. Viral Encephalitides. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**, v. 5. Missouri: Saunders, 2003.
11. GROOT, H. The health and economic impact of Venezuelan equine encephalitis (VEE). In: **Venezuelan Encephalitis**. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 1972.
12. HEINEMANN, M.B., et al. Soroprevalência da encefalomielite eqüina do leste e do oeste no Município de Uruará, PA, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 137-139, 2006.
13. IVERSSON, L.B. et al. Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiúma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 355-359, 1993.
14. MORRIS, C.D. Eastern equine encephalomyelitis. In: MONATH, T. P. **Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Florida: Boca Raton, 1988.
15. NILSON, M.R.; SUGAY, W. Ocorrência da encefalomielite eqüina em Itaporanga estado de São Paulo, I isolamento e identificação do vírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 29, p. 63-68, 1962.
16. PATTERSON, J.S. et al. Immunohistochemical diagnosis of eastern equine encephalomyelitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 156-160, 1996.
17. RIVAS, F. et al. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colômbia, 1995. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 828-832, 1997.

18. SAHU, S. P. et al. Diagnosis of eastern equine encephalomyitis virus infection in horses by immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 34-38, 1994.
19. SOTOMAYOR, E.A.; JOSEPHSON, S.L. Isolation of Eastern Equine Encephalitis Virus in A549 and MRC-5 Cell Cultures. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 193-195, 1999.
20. TEN BROECK, C; MERRILL, M.H. A serological difference between eastern and western equine encephalomyelitis virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 31, p. 217-220, 1933.
21. UDALL, D.H. A report on the outbreak of cerebrospinal meningitis (encephalitis) in horses in Kansas and Nebraska in 1912. **Cornell Veterinary**, v. 3, p. 17-43, 1913.
22. VASCONCELOS, P.F.C. et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia Brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 465-476, 1991.
23. WINTZER, H.J. et al. Doenças do sistema nervoso central. In: WINTZER, H-J. **Doenças dos eqüinos**. São Paulo: Manole, 1990.

2.4 Influenza equina

Conceito

A influenza, ou gripe, equina é uma das principais doenças infectocontagiosas que acometem os equinos, causando perdas econômicas para a equinocultura mundial. A enfermidade afeta as vias respiratórias superiores dos equinos e caracteriza-se por sua aparição repentina e epizoótica^[8].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico pertence à família Orthomyxoviridae, do gênero *Influenzavirus* tipo A, subtipos equi-1 e equi-2^[1,14]. O vírus da Influenza tem um RNA segmentado, encapsulado no genoma da nucleoproteína e na proteína matriz, e o envelope contém neuraminidase e hemaglutinina^[3,15]. A neuraminidase e a hemaglutinina, são antígenos de superfície do envelope viral que conferem variabilidade genética aos subtipos A/equino/1 (H7N7) e A/equino/2 (H3N8)^[12]. Essa variabilidade genética contribui para a suscetibilidade continua dos equinos à infecção^[10].

A infecção inicia com a inalação do vírus, observando-se um período de incubação de 1 a 3 dias, podendo variar de 18 horas até 7 dias. Depois, o vírus liga-se nas células epiteliais do trato respiratório, através da hemaglutinina, fusionando-se com a célula e replicando-se no citoplasma. Com isso, vírions são liberados infectando outras células e sendo expelidos para o ambiente. A proteção do trato respiratório é perdida quando a neuraminidase se encontra em quantidade suficiente, destruindo o muco. A infecção leva a morte das células epiteliais, inflamação, edema e diminuição da depuração mucociliar, dificultando o transporte mucociliar e predispondo a infecção bacteriana secundária^[10,12,15]. Em caso de viremia, ela será branda, mas pode estar relacionada com sinais sistêmicos da doença, como miosite e encefalite, mas o vírus não é detectado fora do trato respiratório^[10].

Diagnóstico

O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos, nas características epidemiológicas da afecção, assim como nos testes laboratoriais realizados a partir da coleta de material do animal suspeito.

a) Epidemiologia

Os vírus da influenza tipo A acomete, além de equinos, seres humanos, suínos, mamíferos marinhos e aves^[7]. Porém o vírus H7N4 da influenza aviária tem gerado preocupação em todo o mundo, enquadrando-se no grupo A de epizootias da Organização Internacional de Epizootias (OIE), causando muitas mortes em humanos^[5].

Equinos de todas as idades são sensíveis à enfermidade, sendo infectados através da inalação do vírus em aerossóis. O agente é depositado na camada ciliar do trato respiratório superior, onde se replica, podendo chegar até o trato inferior^[6,15].

A influenza equina pode ser fatal para animais mantidos em más condições zootécnicas, não vacinados e imunossuprimidos. Potros com idade abaixo de 8 meses parecem estar protegidos por anticorpos maternos, porém se o anticorpo materno está ausente no momento da exposição, esses potros podem desenvolver pneumonia que os conduz rapidamente para a morte^[3,11].

A enfermidade caracteriza-se pela alta morbidade e baixa mortalidade, tendo o estresse como um fator pré-determinante para a instalação da doença. A doença manifesta-se geralmente em locais com grande população e aglomerados equinos; dessa forma, nos surtos da doença, praticamente 100% dos animais podem ser afetados. A severidade da epidemia depende das características antigênicas do vírus circulante e do estado imunitário da população no momento da exposição^[16].

b) Sinais clínicos

Observa-se início súbito e rápida disseminação da doença. A doença manifesta-se com febre, podendo atingir 41°C, sendo, por vezes, bifásica. Tosse seca no início, tornando-se úmida com a progressão da doença, sendo estimulada pela compressão da traqueia. Secreção nasal serosa, faringite, traqueíte, aumento moderado dos linfonodos submandibulares também são observados. Descarga nasal mucopurulenta e presença de crepitação e sibilos pulmonares podem ocorrer em casos de infecção bacteriana secundária. Também são descritas anorexia, depressão e relutância ao movimento. A recuperação ocorre em duas a três semanas, podendo, em casos complicados, levar até 6 meses^[10,12,15].

c) Patologia

Os animais acometidos pela influenza apresentam, em geral, uma bronquiolite característica, com presença de exsudato mucoso e seroso nos bronquíolos. Entretanto, podem também apresentar bronquite e bronquiolite seguidos de pneumonia intersticial acompanhada de congestão, edema e infiltração de neutrófilos^[3].

d) Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico laboratorial pode-se coletar exsudato nasal da nasofaringe através de suave estéril para realizar o isolamento e a identificação viral. Apesar de existirem suaves específicos, muitas vezes não são disponíveis em campo. Nesses casos, podem-se utilizar cotonetes de uso humano, com ressalva de que não devam conter antissépticos ou outras substâncias químicas^[4]. O isolamento viral é realizado por cultivado em ovos de galinha embrionados, cultivos celulares, testes de inibição da hemaglutinação (HI), neuraminidase e ELISA. O teste de ELISA detecta os抗ígenos virais, podendo ter reação cruzada com outros vírus da influenza.

Entretanto, pode-se realizar o teste de inibição da hemaglutinação com a coleta de amostras de sangue assépticas por venopuncção jugular^[9]. A hemaglutinação é o resultado da ligação de glicoproteínas da superfície de vírions (hemaglutininas) com receptores da superfície dos eritrócitos. Portanto, a técnica de inibição da hemaglutinação é uma prova sorológica que se baseia na

capacidade de anticorpos se ligarem nas hemaglutininas virais e inibirem sua atividade hemaglutinante^[4]. O soro obtido após a retração do coágulo deve ser estocado a -20°C até o momento do teste diagnóstico^[2].

Outra forma de diagnóstico é a utilização de soro pareado, com amostras coletadas na fase aguda e outra na fase convalescente, com soroconversão de no mínimo quatro vezes^[15]. Deve-se executar essa técnica em amostragem de 10% do rebanho.

e) Diagnóstico diferencial

Deve-se realizar o diagnóstico diferencial de infecção por *Streptococcus equi* (Garrotilho) e *Herpesvirus equino-1 e 4*. O garrotilho é geralmente uma doença mais grave que a influenza e apresenta corrimento nasal purulento. Já as infecções por herpesvírus, que são também mais graves, apresentam corrimento nasal mucopurulento e causam, diferentemente da influenza, conjuntivite^[15].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A colheita de material para realizar o isolamento e a identificação viral é realizada passando-se o suave pela nasofaringe através do meato ventral, retirando o suave de dentro de sua cobertura protetora e esfregando-o contra a mucosa faríngea. A amostra deve ser remetida em meio com antibiótico (gentamicina 50µg/L) para evitar o crescimento bacteriano, e com proteínas (BSA) para estabilizar o vírus^[13]. O material deve ser transportado e mantido entre 0 e 4°C.

Outro método de coleta de secreção é a técnica de lavado nasal, no qual o líquido de lavagem é depositado na porção caudal das passagens aéreas e então é coletado à medida que refluxo das narinas pela gravidade. O material a ser utilizado consta de cateter acoplado em seringa de 50ml, contendo 30ml de solução salina de fosfato tamponado, coletado em frasco estéril^[11]. As amostras devem ser acondicionadas em tubos individuais, identificados e transportados em caixa isotérmica contendo gelo^[14]. O diagnóstico sorológico é realizado em uma amostra de soro coletado na fase aguda e em outra amostra na fase convalescente e enviadas juntas ao laboratório, devendo ocorrer soroconversão de, no mínimo, quatro vezes^[15].

Referências bibliográficas

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: OPAS, v. 2, 488p. 2003.
- AGUIAR, D.M. et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em eqüídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.
- DALY, J.M.; MUMFORD, J.A. Equine Respiratory Diseases. **International Veterinary Information Service**. New York, 2001.
- FLORES, E.F. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 296-326, 2007.
- LUQUETI, B.C., BARBOSA, M.C., BRAZ, M.A.; PEREIRA, R.C. Ocorrência da Influenza Aviária mundial e seus aspectos epidemiológicos. **Ciências Agrárias e da Saúde**. Andradina: FEA, v. 3, n. 1, p. 42-48, 2003.
- MILLER, W.M.C. Equine influenza. Further observations on the coughing outbreak. **Veterinary Record**, v. 77, p. 455-456, 1965.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed, Brasília, 2005.
- MUÑOZ, V., VICENTE, M., AGUILERA, E.; BERRIOS, P. Brotes de Influenza Eqüina en Chile. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**, 1979.

9. OLIVEIRA G.S. et. al. Prevalência de anticorpos para o vírus da Influenza Eqüina, subtipo H3N8, em eqüídeos apreendidos no estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1213-1215, 2005.
10. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan; 2002.
11. RUSH, B.R. Infectious Respiratory Disease. **Proceedings of the North American Veterinary Conference**. Orlando, v. 20, p. 87-92, 2006.
12. SMITH, B.P. Moléstias virais. In: Smith, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**, v. 2, São Paulo: Manole, p. 1.260-1.262, 1990.
13. SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 366p.
14. THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. Botucatu: Livraria Varela. 1997. 643p.
15. WEIBLEN, R. Influenza Equina. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L.; MENDES, M. D.C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Pelotas: UFPEL Universitária, 1998. 651p.
16. WILSON, D.W. Equine Influenza. In: Sellow, D.C. **The veterinary clinics of North America. Equine Practice**. 1. ed. W.B. Saunders Company Philadelphia, 1993.

2.5 Papilomatose

Conceito

Papilomatose é uma enfermidade infectocontagiosa, de caráter tumoral benigna, causada pelo papilomavírus.

Etiologia e Patogênese

O papilomavírus é um vírus DNA de dupla cadeia, pertencente à família Papillomaviridae^[3]. Esta doença é caracterizada pela hiperqueratose, que consiste no crescimento excessivo das células basais da epiderme, formando excrescências verrucosas chamadas comumente de verrugas^[29]. Modificações de caráter proliferativo nas células do epitélio escamoso queratinizado e não queratinizado induzem a neoplasias benignas de natureza fibroepitelial, originando as saliências sólidas na epiderme^[4,9,13,20,31]. A afecção viral pode acometer o pavilhão auricular, os lábios, as narinas, as pálpebras e os membros dos equinos^[28]. Ocasionalmente ocorrem casos de papilomas generalizados, indicando baixa resposta imunológica do animal^[9].

O termo papiloma deriva do latim *papila*, que significa ‘pústulas’, e *oma* que significa ‘tumor benigno’, e esse tipo de tumor, de origem epitelial e melanocítica, é um dos mais comumente encontrados em equinos^[12,33].

O sequenciamento gênico do *Equus caballus papillomavirus* tipo 1 (EcPV-1), obtido de um papiloma cutâneo equino, corroborou para elucidar a patogênese da papilomatose^[10], no qual foram descritos três tipos diferentes de papilomavírus: dois responsáveis pela papilomatose cutânea e placas aurais, e um terceiro, que está associado à papilomatose genital ou sarcóide^[19,24,32].

Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado clinicamente, pois as alterações macroscópicas são características (coloração branca ou acinzentada) e classificadas de acordo com o aspecto da lesão: arborescentes, em forma de couve-flor, ou filamentosas, com aspecto filiforme^[15,23]. Porém, se os sinais clínicos forem confusos, pode-se confirmar o diagnóstico por meio de biópsia, enviando o material para análise laboratorial e obtendo-se o diagnóstico definitivo.

a) Epidemiologia

A transmissão ocorre por contato direto com animais portadores através de abrasões na pele, vetores e fômites contaminados^[23]. Na espécie equina verrugas congênitas têm sido descritas, porém a origem viral tem sido posta à prova e explicada por uma possível infecção transuterina^[16]. O período de incubação varia de três semanas a quatro meses, e o curso da doença poderá estender-se por até 18 meses^[9,17]. Animais jovens ou imunossuprimidos podem apresentar múltiplos papilomas ocasionando perda de peso e consequente retardo no crescimento, além de causar perdas econômicas relacionadas com a estética do animal, impedindo, muitas vezes, sua comercialização ou participação em exposições^[22,25,30]. Em alguns casos são observadas infecções secundárias em consequência da invasão bacteriana através das lesões na pele, que se tornam porta de entrada de microrganismos devido aos traumas sofridos pelas verrugas.

Cerca de 4 meses após o aparecimento do papiloma na pele, este tende a desaparecer, sendo considerada, dessa forma, uma doença autolimitante. Na maioria dos casos ocorre regressão espontânea com desaparecimento das lesões, sem a instituição de tratamento^[5,6,18]. Após o crescimento completo da verruga, esta sofre necrose e queda, dependendo da resposta imunocelular do hospedeiro.

b) Sinais clínicos

A papilomatose cutânea tende a ocorrer com maior frequência na cabeça, no pescoço, no ventre, no dorso, no úbere, na região do focinho ou ainda de forma generalizada. Pode assumir formato arborescente (forma de couve-flor), filamento (filiforme) ou de placas aurais como uma variante da papilomatose cutânea. No caso das placas aurais, elas podem ocorrer unilateral ou bilateralmente na superfície interna dos pavilhões auriculares. São lesões, planas, com dimensões de menos de um milímetro até mais de dois centímetros, acinzentadas ou esbranquiçadas e hiperqueratósicas que tendem à coalescência^[2,7].

O sarcoide equino é uma neoplasia de tecido fibroso, localmente invasivo, com origem fibroblástica, não metastática, que pode ocorrer em qualquer região do corpo, porém com maior frequência na cabeça, na comissura labial, na região periocular, na região cervical, nos membros e na região ventral. Acomete principalmente animais com idade inferior a 4 anos. Seis tipos de apresentação clínica são descritas para a forma sarcoide, considerando as características histológicas, sendo: a) oculto ou superficial: áreas circulares alopecicas na pele; b) verrucoso: semelhante a uma verruga; c) nodular: nódulos únicos ou segregados, ou múltiplos nódulos; d) fibroblástico: com base pedunculada ou invasiva e aparência exofítica fibrovascular; e) maligno: mais agressivo e invasivo formando múltiplos cordões de massas tumorais. f) mistos: dois ou mais tipos dos descritos anteriormente^[14].

c) Patologia

As lesões macroscópicas da papilomatose são características na maioria dos casos, constando de aspecto filiforme, com superfície rugosa ou em formato de couve-flor. Microscopicamente, os papilomas apresentam tecido conjuntivo e hiperplasia do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado^[11,23].

d) Diagnóstico laboratorial

A biópsia excisional total da lesão é indicada, pois provê tanto o tratamento quanto o diagnóstico, já que é o material de eleição para a maioria dos testes laboratoriais quando se suspeita de neoplasia^[27]. Desta forma, ressalta-se a realização de exame histopatológico no qual, com biópsia da lesão, se observam as características microscópicas do corte histológico, que apresentam

hiperplasia das células do estrato espinhoso, inclusões intranucleares de partículas virais, hiperqueratose e paraqueratose que levam a formações nodulares^[4,5,13,18]. Observa-se, ainda, vacuolização citoplasmática do estrato granuloso, bem como projeções da epiderme para o interior da derme, com projeções denominadas cristas interpapilares. A apoptose apresenta-se em muitas células acantóticas, caracterizada pela diminuição do citoplasma^[1,29]. Entretanto, a técnica de microscopia eletrônica determina as partículas víricas presentes pela observação morfológica do agente, tais como morfologia, diâmetro, estrutura do capsídeo e envelope, permitindo, assim, a identificação dele^[8,32].

A amplificação de ácidos nucleicos virais pode ser realizada pela utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que detecta e identifica, com quantidades mínimas de material genético, o agente suspeito. Entre suas vantagens estão a sensibilidade, a especificidade e a detecção de vírus já inviáveis^[8].

e) Diagnóstico diferencial

As lesões macroscópicas da papilomatose podem ser confundidas com outras dermatopatias, tais como sarcoides, carcinomas epidermoides e placas aurais, confirmado a necessidade de ser realizado o diagnóstico diferencial por meio de exames laboratoriais^[21]. Entre os testes confirmatórios para papilomatose destacam-se a microscopia eletrônica e a PCR.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A colheita do material é realizada por biópsia das lesões, geralmente com o paciente equino sob sedação e com infiltrado subcutâneo de anestésico local (hidrocloreto de lidocaína 2%). A amostra a ser remetida para análise deve ser submersa em formalina a 10% tamponada e, para assegurar a fixação, estas não devem ultrapassar a espessura de 1cm. Pode-se também utilizar a biópsia por *punch*, obtendo-se um corte de toda a espessura de uma lesão de modo relativamente atraumático, sendo obtida colocando-se o *punch* sobre a pele e girando-o ao mesmo tempo que se exerce a pressão para baixo.

As embalagens contendo material a ser analisado devem ser identificadas individualmente e acondicionadas de forma a evitar rupturas durante o transporte até o laboratório^[26,27]. Para a produção de vacinas autógenas, a colheita de material não deve ser realizada durante o desenvolvimento da doença, pois não há produção viral, nem na fase de regressão. São colhidos 5g de papilomas dos animais afetados e enviados ao laboratório sob refrigeração, onde o material é macerado e inativado^[34].

Referências bibliográficas

1. ABDOUSLAM, O.E., LEVKUT, M., LEVKUTOVÁ, M., REVAVOVÁ, V., ONDREJKÁ, R. e BENÍZEK, Z. Immunohistochemistry of the progressive and regressive stages of bovine papillomatosis. **Acta Vet Brno**, v. 66, p. 245-248, 1997.
2. BINNINGER C.E. e PIPER R.C. Hyperplastic dermatitis of the equine ear. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 1968, v. 153, n. 1, p. 69-75.
3. CARTER, G.R. e WISE, D.J. Papillomaviridae. In: CARTER, G.R., WISE, D.J.; FLORES, E.F. A Concise Review of Veterinary Virology. **International Veterinary Information Service**. Ithaca. 2005.
4. CORRÊA, W.M. e CORRÊA, C.C.M. **Enfermidades Infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 843p., 1992.

5. DUBELCCO, R.; GINSBERG, H.S. Os vírus de tumores. In: DUBELCCO, R.; GINSBERG, H.S. **Microbiologia de Davis: virologia**. 2.ed, São Paulo: Harper e Row do Brasil, p. 1679-1716, 1979.
6. DYSON, S.J. **Clínica de Eqüinos**. São Paulo: Manole. 1997. 294p.
7. FADOK, V.A. Overview of equine papular and nodular dermatoses. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** 1995, v. 11, n. 1, p. 61-74.
8. FLORES, E.F. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 296-326, 2007.
9. FOZ FILHO, R.P.P., LUCAS, R., MAIORKA, P.C.; YOSHINO, M.L. Retirada cirúrgica de fibropapiloma eqüino por meio de criocirurgia. In: V Congresso Brasileiro de Medicina e Anestesiologia Veterinária. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 9, p. 282-283, 2002.
10. GHIM, S.J., RECTOR, A., DELIUS, H., SUNDBERG, J.P., JENSON, A.B.; RANST, M.V. Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 324, p. 1108-1115, 2004.
11. HARGIS, A.M. Neoplasias cutâneas. In: **Patologia Especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Armed, p. 533-540, 1998.
12. HAYWARD, M.L.R., BAIRD, P.J.; MEISCHKE, H.R.C. Filiform viral squamous papillomas on sheep. **Veterinary Record**, v. 132, p. 86-88, 1993.
13. JONES, T.C., HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6. ed, São Paulo: Manole, 415p., 2000.
14. KNOTTENBELT, D.C. A suggested clinical classification for the equine sarcoid. **Clin Tech Equine Pract.** 2005; n. 4, p. 278-295.
15. KNOTTENBELT, D.C. Neoplasia della cute: i sarcodi. **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, Pisa, Italy, 2003.
16. MARINS, R.S.Q.S. **Epidemiologia da papilomatose cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em micro-regiões dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 127p. 2004.
17. MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia veterinária**. 3;ed, Porto Alegre: Sulina. 476p., 1988.
18. MURPHY, F.A., GIBSS, P.J., HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3.ed, Academic Press, 629p., 1999.
19. O'BANION, M.K., REICHMANN, M.E.; SUNDBERG, J.P. Cloning and characterization of an equine cutaneous papilloma virus. **Virology**, v. 152, p. 100-109, 1986.
20. OLIVEIRA, L.H.S. Vírus oncogênicos. In: Oliveira, L.H.S. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 302-314, 1994.
21. RAMOS, A.T., SOUZA, A.B., NORTE, D.M., FERREIRA, J.L.M.; FERNANDES, C.G. Tumores em animais de produção: aspectos comparativos. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 38, p. 148-154, 2008.
22. SANTIN, A.P.I. **Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos e caracterização anatomopatológica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, 147p. 2001.
23. SCHUCH, L.F.D. Papilomatose Bovina. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L.; MENDES, M.D.C. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. Pelotas: UFPEL Universitaria, 1998. 651p.

24. SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: **Equine Dermatology**. W.B. Saunders, St Louis, p. 698-795, 2003.
25. SMITH, B.P. Moléstias virais. In: Smith, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**, v. 2, São Paulo: Manole, p. 1.260-1.262, 1990.
26. SOUSA, N.R., ADORNO, V.B., MARCONDES, J.S., OLIVEIRA FILHO, J.P., CONCEIÇÃO, L.G., AMORIM, R.L.; BORGES, A.S. Características clínicas e histopatológicas da placa aural em equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, p. 279-284, 2008.
27. SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 1999. 366p.
28. THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**. Botucatu: Livraria Varela. 1997. 643p.
29. VIDOR, T., PFEIFER, J.C., SUÑE, J.A., BORGES, J., AZEVEDO, C.A. Papilomatose dos Bovinos – Tipos de papilomas e incidência no gado leiteiro da bacia leiteira de Porto Alegre. **Arquivo do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Especial, p. 31-39.
30. WADHWA, D.R., PRASAD, B., RAO, V.N. e DHALIWAL, A.S. Clinicotherapeutic and histopathologic studies on bovine cutaneous papillomatosis. **Indian Journal Dairy Science**, v. 49, p. 206-208, 1996.
31. WILLIAM, B.J.; KIRUBAHARAN, J.; MOHAMMED UTHUMAN, K.; KUMANAN, K.; BALACHANDRAN, S. Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis. **Indian Veterinary Journal**, v. 69, p. 843-844, 1992.
32. WILLIAMS, M.A. Papillomatosis: warts and aural plaques. In: Robinson, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 389-390, 1997.
33. WITTMANN, W. Infecções por papovavírus. In: Beer, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, p. 256-261, 1999.
34. EMBRAPA. **Papilomatose ou Verruga dos Bovinos**. Disponível em: <HTTP://www.cnpgl.embrapa.br/nova/sala/artigos/artigolinha.php?id=38> Acesso em: 29 nov. 2010.

2.6 Raiva

Conceito

A raiva é uma encefalite aguda e invariavelmente fatal, causada por um vírus que se alastrá pelo sistema nervoso central e se encontra em grandes concentrações nas glândulas salivares. Trata-se de uma doença de potencial zoonótico, notificável em todo o mundo e transmitida por mamíferos. A notificação é obrigatória, devendo ser informada o mais rápido possível para que seja realizada investigação epidemiológica para evitar ocorrência de novos casos e mortes.

Etiologia e Patogênese

O vírus da raiva pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e ao gênero *Lyssavirus*^[5,21]. Um grande grupo de vírus RNA envelopado em forma de bala, que, além de mamíferos, pode infectar peixes, insetos e plantas^[1,8]. Dentro do gênero *Lyssavirus* existem sete genotipos, sendo o principal o vírus da raiva clássico, ou genótipo 1, que tem distribuição mundial^[30,31]. Os principais hospedeiros do vírus clássico são os mamíferos terrestres, mas ele também infecta morcegos. Os genótipos 2 a 7 estão relacionados ao vírus da raiva. São eles: genótipo 3, ou *Mokola*, que também infecta mamíferos terrestres; genótipo 2, ou *Lagos Bat Virus*; genótipo 4, ou *Duvenhage*; genótipo 5, ou *European Bat Lyssavirus 1*; genótipo 6, ou *European Bat Lyssavirus 2*, e genótipo 7, ou *Australian Bat Lyssavirus*, que infectam apenas morcegos^[31].

Diagnóstico

O diagnóstico antes da morte é difícil, porém a doença deve ser considerada em equinos que apresentem sinais neurológicos rapidamente progressivos ou difusos^[28].

a) Epidemiologia

A raiva é uma das doenças mais temidas no mundo por seu caráter agudo e fatal^[35]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem em torno de 50 mil mortes humanas por ano no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Na Índia, são relatadas 20 mil mortes humanas por ano. O vírus da raiva é mantido na natureza por dois ciclos ocasionalmente inter-relacionados: o ciclo urbano, associado a cães e gatos, e o ciclo silvestre, associado a morcegos (particularmente à espécie hematófaga *Desmodus rotundus*, conhecidos como morcegos-vampiros), canídeos selvagens (raposa, guaxinin, lobo-guará, coiote, quati) e primatas não humanos^[4,31].

A raiva causa perdas econômicas significativas para a produção animal^[6]. É uma das víruses mais importantes para a pecuária e para a saúde pública, no Brasil e no mundo^[17,22]. Todos os animais de sangue quente são suscetíveis à infecção pelo vírus clássico, estando presente em todo o mundo, exceto na Austrália, Groenlândia, parte da Europa e algumas ilhas^[31,34]. A Austrália, no entanto, já relatou casos de morte humana por doença semelhante à raiva, causada por *Australian Bat Lyssavirus*^[13,19]. Atualmente, a raiva humana e a animal continuam sendo grandes problemas de saúde pública em vários países da Ásia, África e América do Sul^[20,33]. Na América do Norte, está reemergindo, uma vez que várias mortes humanas ocorreram devido à exposição de pessoas a morcegos^[24]. Recentemente, nos EUA (em 2005), ocorreram mortes causadas pela raiva em pessoas que receberam transplante de órgãos^[29].

Na América do Sul, o maior reservatório do vírus é o quiróptero *Desmodus rotundus*^[3,10]. O Brasil é um dos países mais afetados pela morte de animais herbívoros por raiva, e a raiva urbana é endêmica, em sua maior parte^[6,30]. O principal vetor são os cães, que são os maiores responsáveis pela raiva humana^[9,14,25]. No entanto, segundo o Instituto Pasteur (2000), o número de casos notificados de raiva humana vem diminuindo desde 1980. A infecção em animais e humanos, normalmente, ocorre pela mordida de um animal raivoso, mas, em ocasiões raras, a transmissão pode ocorrer via aerossóis e rotas oral e nasal^[11,33]. Cavalos geralmente se infectam pela mordida de canídeos selvagens ou mesmo de morcegos, que carregam o vírus na saliva^[12].

O período de incubação da raiva equina é variável, de 9 dias a 1 ano, dependendo da localização e severidade da mordida (inoculação do vírus), e da quantidade de vírus presente na saliva (dose do inóculo) do animal raivoso^[3,12]. Períodos de incubação mais curtos podem estar associados à penetração do vírus diretamente nos nervos periféricos em vez de multiplicação nos locais da inoculação ou mordida. Alguns autores consideram a raiva equina uma doença silenciosa, porque muitas vezes não é detectada pelos criadores, particularmente por sua duração curta, de geralmente apenas 12 horas. No estado de São Paulo, 571 casos de raiva equina foram notificados no período de 2000 a 2003, e foram relatados um caso na Etiópia e dois casos no Brasil de transmissão de raiva equina para humanos^[6].

b) Sinais clínicos

O vírus da raiva é altamente neurotrópico, portanto causa sinais neurológicos^[12,21]. Em equinos, no entanto, os sinais são altamente variáveis. Sinais iniciais incluem hiperestesia, intolerância ao treinamento, cólica, automutilação ou claudicação aparente. Febre pode ou não estar presente. Alterações comportamentais são: disfagia, andar em círculos, depressão acentuada, na forma paralítica e hiperexcitabilidade, convulsões, medo e agressão, na forma furiosa. Problemas

de andadura, como ataxia e paresia, são comuns. Como o vírus se propaga por todo o sistema nervoso central, um único caso pode apresentar um ou todos os sinais acima, e novos sinais podem ser desenvolvidos, em qualquer momento durante a evolução clínica.

Tipicamente, os sinais clínicos progredem rapidamente e a morte ocorre dentro de 5 a 10 dias após o seu aparecimento^[12]. Se não conseguir localizar o animal responsável pela mordida, pode-se iniciar o tratamento antirrábico para os indivíduos que foram mordidos. O soro antirrábico equino é mais comumente utilizado para tratamento de pessoas infectadas, devido ao custo mais baixo, em comparação ao soro humano^[7,22]. O soro equino, rotineiramente usado no Brasil, é uma solução purificada de imunoglobulinas equinas, preparada a partir do soro de equinos hiperimunizados pela vacina contra raiva e inoculação do vírus. A dose (40UI/kg) é segura e eficaz, pois o soro é purificado por processos de digestão enzimática, precipitação com sulfato de amônia e remoção do excesso de proteínas por termocoagulação, e contém concentrações menores de proteína animal indesejável^[14].

c) Patologia

As lesões da raiva geralmente são limitadas ao SNC. Macroscopicamente, as lesões, quando aparecem, são inespecíficas. Alterações histopatológicas comuns são: meningite e encefalomielite não supurativa, embainhamento perivascular por células mononucleares, gliose, nódulos gliais e degeneração neuronal^[26]. É mais comum ver alterações no hipocampo, no tronco cerebral, no cerebelo e na substância cinzenta da medula espinhal. Podem ser encontrados os corpúsculos de Negri dentro dos neurônios cerebrais e das células gliais, que são considerados lesões patognomônicas da infecção. Os corpúsculos de Negri são grandes inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas, ovais ou redondas; são aglomerados do vírus. No entanto, há casos em que não se encontram tais corpúsculos, principalmente se o animal tiver morrido ou sido sacrificado no início do processo mórbido^[17,28]. Porém, o fato de não os encontrarmos não exclui a hipótese de raiva definitivamente. Da mesma forma, as demais alterações patológicas são mais facilmente observadas quando os tecidos são colhidos após a morte do animal em consequência da infecção^[26].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico baseado nos sinais clínicos torna-se mais fácil à medida que a doença evolui. O vírus permanece no local de entrada por quase todo o longo período de incubação; depois, ele se espalha centripetamente para o sistema nervoso central (SNC)^[15]. Depois de o vírus ter alcançado o SNC, ele atinge porções do cérebro e começa a espalhar-se de forma centrífuga, pelos nervos, para todos os tecidos do hospedeiro. Atinge, também, os tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital, em especial as glândulas salivares, tornando o animal contagioso pela mordida^[23,24]. Além das glândulas salivares, o vírus pode ser encontrado na córnea, na pele, no líquido cérabro-espinhal e, em menor quantidade, em outros órgãos, como coração, língua e laringe^[34].

Conhecer a história clínica de mordidas de animais é importante, e devem-se realizar todos os esforços para localizar o animal suspeito e pô-lo de quarentena. Se o animal morrer durante a quarentena, o encéfalo inteiro ou fragmentos dele e a medula espinhal devem ser enviados para diagnóstico laboratorial, que é essencial para se poder fazer o diagnóstico definitivo da raiva equina^[6,14]. Atualmente, o teste mais utilizado na rotina para a detecção do vírus da raiva é o teste do anticorpo fluorescente (FAT), também chamado de imunofluorescência direta, realizado com esfregaços de tecido do animal^[27,32]. Em comparação com o método de histopatologia da observação dos corpúsculos de Negri, o FAT é muito mais sensível. Esse método consiste em fixar o agente infeccioso numa lâmina de microscópio e em utilizar uma globulina marcada com fluoresceína

conjugada especificamente para uma proteína do nucleocapsídeo do vírus^[27]. No entanto, conforme recomendado pela OMS, para confirmar o diagnóstico de raiva deve-se realizar a inoculação intracraniana, em camundongos, de suspensão cerebral do animal suspeito. Esse sistema é mais específico, pois demonstra a presença de vírus infeccioso nas amostras^[32,34].

Em algumas circunstâncias, no diagnóstico *post mortem* pode-se utilizar a técnica de RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) para testar a presença do RNA viral no cérebro do animal suspeito^[31,32,34]. Essa técnica de biologia molecular é feita com a utilização de *primers* específicos, que transcrevem e amplificam fragmentos de DNA do vírus, o que confere alta especificidade do método. Além do mais, esse método é muito mais sensível e realizável em situações em que o animal está impróprio para outros testes, como histopatologia e FAT, por exemplo^[18]. Eses testes não podem ser usados quando o animal morreu há muito tempo, pois não servem para amostras em decomposição^[16,27]. O FAT também não serve para amostras líquidas, como saliva e líquido cerebroespinal. Apesar de ser usado em poucos laboratórios, esse método, provavelmente, ocupará o lugar do FAT como primeiro teste na rotina, pois além de diferenciar o vírus clássico da raiva de outros *Lyssavirus* relacionados a morcegos pela análise filogenética das sequências dos produtos de RT-PCR, reduz o tempo de diagnóstico para algumas horas^[31].

O vírus também pode estar presente no líquido cerebroespinal e, em casos de suspeita de raiva, o líquido pode ser colhido para análise *ante mortem* pelo ELISA. A técnica do ELISA foi primeiramente desenvolvida para titulação de anticorpos em animais e pessoas vacinados contra raiva, mas depois foi modificado para detecção de antígenos no cérebro^[2].

e) Diagnóstico diferencial

Na maioria dos países, o diagnóstico laboratorial da raiva é feito só em laboratórios qualificados e por pessoas experientes devido ao fato de o diagnóstico clínico nos animais requerer diferenciação de outras doenças, infecciosas ou não, do sistema nervoso central. Em equinos algumas delas são: encefalomielite protozoária equina, *herpesvirus* equino tipo 1, encefalomielites do Leste, Oeste e Venezuela, abscessos e tumores cerebrais^[12]. A raiva ainda é um problema imbatível em muitos lugares do mundo e um constante desafio para os pesquisadores, porém um fato permanece claro: o de que a erradicação da raiva humana e animal dependem, fundamentalmente, de seu controle pela vacinação.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O principal material a ser enviado é o SNC (encéfalo e medula espinhal). O cérebro possui quantidade abundante de vírus^[34]. Ele deve ser dividido em duas partes, sendo uma das metades fragmentada e fixada em formol tamponado a 10%, para estudo histopatológico, e a outra metade refrigerada (não congelada) e enviada ao laboratório de virologia para isolamento^[17]. O envio deve ser o mais rápido possível para garantir a viabilidade do vírus. Por se tratar de uma zoonose fatal, é importante ter cuidado na coleta, sempre utilizar luvas e máscara ao manusear o animal, embalar os espécimes colhidos separadamente e identificá-los devidamente antes de enviá-los ao laboratório. O material deve ser acondicionado em saco plástico duplo hermeticamente fechado e colocado em uma caixa de isopor com gelo. Na falta de refrigeração, o material deve ser conservado em solução salina com glicerina a 50%.

No caso de óbito, até 6 dias após, se a carcaça tiver sido enterrada, ela pode ser recuperada e encaminhada ao laboratório, onde será avaliada para realização dos exames. Os laboratórios para onde as amostras devem ser encaminhadas podem ser encontrados no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: www.agricultura.gov.br.

Referências bibliográficas

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Rabia. In: **Zoonosis e enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed., Organización Panamericana de la Salud, Washington, p. 351–383, 2003.
2. ATANASIU, P. et al. Use of enzyme immunoassay protein A for rabies antigen and antibody determination. **Developments in Biological Standardization**, v. 46, p. 207-215, 1979.
3. BAER, G.M. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: Baer, G.M. **The natural history of rabies**. 2. ed., Boca Raton: CRC Press, p. 389-403, 1991.
4. BARROS, J.S. et al. Raiva em animais silvestres no Estado do Ceará particularmente na raposa (*Dusicyon vetulus*). **Zoon. Rev. Int.**, v. 1, p. 9-13, 1989.
5. CALISHER, C.H. et al. Antigenic relationships among rhabdoviruses from vertebrates and haematophagous arthropods. **Intervirology**, v. 30, p. 241-57, 1989.
6. CARRIERI, M.L. et al. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. **Journal of Virological Methods**, v. 138, p. 1-9, 2006.
7. CREPIN, P. et al. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1117-1121, 1998.
8. CUPO, P. et al. Equine antirabies serum treatment during an epizootic outbreak in the city of Ribeirao Preto, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 349, 1998.
9. FINKE, S.; CONZELMANN, K-K. FINKE, S.; CONZELMANN, K-K. Replication strategies of rabies virus. **Virus Research**, v. 111, p. 120-131, 2005.
10. GERMANO, P.M.L. et al. Variantes antigenicas de la virus de rabia aisladas en el norte y sudeste del Brasil: estudio preliminar. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 108, p. 39-45, 1990.
11. GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 86-91, 1994.
12. HEMACHUDHA, T. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **Lancet Neurology**, p. 101-109, 2002.
13. HINES, M.T. Changes in Mentation, Seizures, and Narcolepsy. In: Robinson, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. Missouri: Saunders, 2003.
14. HOOPER, P.T. et al. A new Lyssavirus: the first endemic rabies related virus recognized in Australia. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, n. 95, p. 209-218, 1997.
15. INSTITUTO PASTEUR. Profilaxia da Raiva Humana. In: **Manual Técnico do Instituto Pasteur**, n. 4. 2. ed., São Paulo, 2000.
16. JACKSON, A.C. Rabies virus infection: An update. **Journal of NeuroVirology**, v. 9, p. 253-258, 2003.
17. KAMOLVARIN, N. et al. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 207-210, 1993.
18. LIMA, E.F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 250-264, 2005.
19. LIMA, K.C. et al. The heminested RT-PCR for the study of rabies virus pathogenesis. **Journal of Virological Methods**, v. 124, p. 79-85, 2005b.
20. MACKENZIE, J.S. Emerging viral diseases: an Australian perspective. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 1-8, 1999.

21. MADHUSUDANA, S.N. et al. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 339-345, 2004.
22. METLIN, A.E. et al. Imported case of equine rabies in Finland: clinical course of the disease and the antigenic and genetic characterization of the virus. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, p. 584-587, 2006.
23. MORIMOTO, K. et al. High level expression of a human rabies virus-neutralizing monoclonal antibody by a rhabdovirus-based vector. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p. 199-206, 2001.
24. MURPHY, F.A. et al. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: Infection of the central nervous system and centrifugal spread of virus to peripheral tissues. **Laboratory Investigation**, v. 29, p. 1-16, 1973.
25. MURPHY, F.A.; BAUER, S.P. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. **Intervirology**, v. 3, p. 256-268, 1974.
26. NOAH, D.L. et al. The epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. **Annals of International Medicine**, v. 11, p. 922-930, 1998.
27. RODRIGUEZ, L.L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: Editora da UFSM, 2007.
28. RUDD, R.J. et al. A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. **Virus Research**, v. 111, p. 83-88, 2005.
29. SOMMARDAHL, C.S. Raiva. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000.
30. SRINIVASAN, A. et al. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1103-1111, 2005.
31. TEIXEIRA, T.F. et al. Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 271-275, 2005.
32. VÁZQUEZ-MÓRON, S. et al. RT-PCR for detection of all seven genotypes of *Lissavirus* genus. **Journal of Virological Methods**, v. 135, p. 281-287, 2006.
33. WACHARAPLUESADEE, S. et al. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 317-320, 2008.
34. WOLDEHIWET, Z. Rabies: recent developments. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 17-25, 2002.
35. WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.

3. PRINCIPAIS DOENÇAS MICÓTICAS DOS EQUINOS

3.1 Leucoencefalomalacia

Conceito

Doença caracterizada por síndrome neurológica aguda que afeta equídeos de todas as idades, acomete a substância branca do encéfalo e possui distribuição sazonal. É causada pela ingestão de fumonisinas B₁, B₂ e B₃, produzidas pelos fungos *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*^[1]. Antigamente, essa doença era relacionada ao milho mofado, mas sabe-se que outros alimentos, cereais ou mesmo ração comercial podem abrigar o fungo e suas toxinas. Essas micotoxinas de-

sencadeiam um processo degenerativo do sistema nervoso central (SNC), com amolecimento e liquefação da substância branca do encéfalo.

Etiologia e Patogênese

Essa doença é causada pela ingestão de toxinas, fumonisinas B_1 , B_2 e B_3 do fungo *F. moniliforme* presente em alimentos mofados. O fungo pode desenvolver-se em grãos mofados atingidos por chuvas, quando ainda na planta, ou se armazenado úmido. Também pode aparecer em animais que ingeriram rações comerciais, mesmo que peletizadas^[1].

Após a ingestão das toxinas, principalmente fumonisina B_1 , que tem maior relação com essa doença, elas são absorvidas e ganham a corrente sanguínea, na qual bloqueiam a síntese dos esfingolipídeos (classe de lipídeos de membrana que desempenham importante papel na regulação celular, encontrados em todas as células eucarióticas que, entre outras atribuições, são cruciais para a manutenção da estrutura lipoproteica das membranas, comunicação celular, diferenciação e morte da célula). Esse bloqueio leva ao acúmulo de esfingosina e esfingamina intracelular, e também à necrose das células por coagulação nos órgãos sensíveis, principalmente cérebro, coração, fígado e rins. No sistema nervoso central podem ser observadas lesões como edema, tumefação e necrose da substância branca em um hemisfério ou em ambos.

Diagnóstico

O diagnóstico clínico é realizado de acordo com a epidemiologia, os sinais clínicos e o histórico de exposição a alimento mofado. Os achados clinicopatológicos não são exclusivos da doença. No líquido cerebroespinhal, as alterações não são específicas, assim como a bioquímica sérica. O diagnóstico definitivo é realizado após a morte, associado com lesões verificadas na necropsia.

a) Epidemiologia

Leucoencefalomalacia é uma doença de distribuição mundial, geralmente em forma de surtos, ocorrendo principalmente no inverno e início da primavera. Apresenta taxa de morbidade bastante variável, entretanto com mortalidade muito próxima de 100%. Os alimentos tornam-se contaminados principalmente durante seu desenvolvimento, embora muitas vezes se contaminem no armazenamento. A temperatura ideal de crescimento micelial é entre 18 e 25°C e a umidade geralmente acima de 15%. A sensibilidade às toxinas é variável de animal para animal, aumentando com a idade. O alimento pode ser administrado aos animais na forma de ração, milho moído, milho em espigas, entre outras.

b) Sinais clínicos

Caracterizam-se pelo aparecimento abrupto de distúrbios neurológicos, porém alguns animais morrem repentinamente sem apresentar sinais clínicos^[2,3]. Os sinais incluem anorexia, sonolência, fraqueza, dificuldade de apreensão de alimentos, tremores, pressão da cabeça contra obstáculos e cegueira unilateral ou bilateral. Com a evolução do quadro, o animal apresentará desorientação (tendência a movimentar-se em círculos ou inclinar-se para um lado), disfagia, quedas, movimentos de pedalagem, coma e morte. Raramente os animais apresentam febre. O aparecimento dos sinais clínicos está relacionado com a quantidade de micotoxina ingerida, apresentando variação (tolerância) individual. Os sinais clínicos podem ser observados em poucas horas, até 12 dias após a ingestão de milho contaminado com *F. moniliforme* e fumonisinas. Normalmente, em menos de 1 dia após o aparecimento dos sinais clínicos o animal morre.

c) Patologia

As características mais importantes estão relacionadas com as lesões vasculares causadas pelas fumonisinas na substância branca do SNC^[3]. Na necropsia as lesões estão confinadas ao SNC e geralmente são unilaterais, em que se observam perda das circunvoluçãoes, aumento de tamanho e amolecimento dos hemisférios cerebrais. Na superfície de corte se observam, na substância branca, áreas amareladas que podem conter cavidades com líquido, geralmente associadas à hemorragia. Microscopicamente, observa-se malacia difundida na substância branca com infiltrados nos espaços perivasculares, principalmente de eosinófilos e células plasmáticas. Também se verificam lesões nas paredes dos vasos acompanhadas de hemorragia e edema periférico. As áreas de necrose liquefativa são preenchidas por células gliais.

d) Diagnóstico laboratorial

Os dados laboratoriais são obtidos através da bioquímica sérica, em que aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamiltransferase (GGT), sorbitol desidrogenase (SDH) e bilirrubina podem estar elevados. Outras alterações inespecíficas podem ocorrer associadas à desidratação (hematócrito elevado, azotemia pré-renal) e ao decúbito, como elevação da creatina cinase. Pode-se proceder à colheita do líquido cerebroespinal, mas ele tampouco apresenta alterações específicas^[3]. Outro método para o diagnóstico é o envio de amostras do alimento contaminado para pesquisa de esporos do fungo, ou mesmo da toxina. Mas o diagnóstico definitivo é realizado pelo exame *post mortem*.

e) Diagnóstico diferencial

Deve-se realizar o diagnóstico diferencial com a raiva e mieloencefalite protozoária equina (EPM), que normalmente não ocorrem em surto, acometendo um único animal, e encefalite viral equina, doença essa que ocorre geralmente no verão e tem como vetores artrópodos hematófagos.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem-se enviar ao laboratório de patologia animal fragmentos do SNC contendo área acometida pela doença e também sem alterações, fixadas em formalina 10%. Também enviar, sob refrigeração, amostras do milho ingerido pelos animais ao laboratório de microbiologia para isolamento do fungo.

Referências bibliográficas

1. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
2. RIET-CORREIA, F.; SOARES, M. P.; MENDEZ, M. C. Intoxicações em Equinos no Brasil. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 715-722, 1998.
3. SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed., Barueri, SP: Manole; 2006.

3.2 Pitiose

Conceito

A pitiose eqüina é uma doença infecciosa fungica com característica granulomatosa, ulcerativo-proliferativa. Atinge eqüinos, caninos, bovinos, felinos e humanos, mais freqüente em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas^[4,6].

A doença também é conhecida como *Bursattee*, zigomicose, hifomicose, granuloma ficomítico, câncer dos pântanos (*swamp cancer*) na Flórida, ou, ainda, ferida brava e ferida da moeda no Pantanal Mato-Grossense, local de maior incidência no Brasil, onde é endêmica^[1,2,12].

Etiologia e Patogênese

O agente etiológico da pitiose pertence ao reino Stramenopila, filo Oomycota, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *Pythium insidiosum*^[5]. Esse microrganismo é um parasita de plantas aquáticas e vive na vegetação aquática ou em resíduos orgânicos. Possui distribuição mundial e é característico de regiões alagadiças de clima tropical, subtropical e temperado de todos os continentes. Comum na região da Costa do Golfo dos Estados Unidos, na América do Sul e na Austrália^[1,8,10].

O fungo tem acesso ao tecido animal através de feridas na pele em contato com água contaminada com zoósporos do fungo^[10]. O fungo coloniza as plantas aquáticas e, em temperaturas elevadas, produz zoósporos biflagelados livres, que são a forma infectante. Para que haja o desenvolvimento da forma infectante, são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água^[11]. Os zoósporos se deslocam na água e têm tropismo positivo por pelo e cabelo, penetrando na pele dos equinos. As áreas ventrais do corpo e os membros são as mais afetadas devido ao maior contato dessas regiões com a água. O tecido nasal também pode ser envolvido, além da região do peito. Tecidos e órgãos, como pulmão, linfonodos e ossos, são raramente atingidos^[3]. Cortes por arame, feridas e dermatite da linha média causada por moscas são as principais portas de entrada do fungo.

A pitiose equina é uma enfermidade crônica granulomatosa do tecido cutâneo e subcutâneo, e não apresenta predisposição diferente por sexo, idade e raça. Não há relatos de transmissão direta entre animais nem entre animais e humanos^[1,7].

Diagnóstico

O diagnóstico precoce e correto é fundamental para o sucesso da terapia, pois o tratamento é difícil e apresenta risco de vida para os animais e humanos afetados. O diagnóstico baseia-se nos dados epidemiológicos, sinais clínicos, achados histopatológicos e isolamento do agente. Entretanto, o diagnóstico precoce é difícil por desses métodos, e é necessária a diferenciação de outras lesões granulomatosas ou a identificação do agente^[5,12].

a) Epidemiologia

A grande maioria dos casos de pitiose é observada durante ou após a estação chuvosa. Acredita-se que o período de incubação seja de várias semanas^[3]. No Pantanal Mato-Grossense, a maior parte dos registros de pitiose é nos meses de fevereiro a maio, que corresponde ao ápice das cheias. A doença atinge equinos, caninos, bovinos, felinos e humanos, mas a espécie mais atingida é a equina, principalmente nas formas cutânea e subcutânea, e é seguida pelos caninos^[8].

b) Sinais clínicos

Nas lesões recentes se observam pequenas áreas elevadas, em torno de 5mm de diâmetro, alopecicas, com superfície ulcerada e fístula na pele, onde flui conteúdo serossanguinolento. Essas lesões tendem a aumentar, podendo atingir 50 cm. Há descrições de feridas únicas e multifatoriais. Como ocorre prurido, pode haver automutilação, o que contribui para disseminação da doença. A úlcera, em seu centro, apresenta massas amareladas e endurecidas chamadas de *kunkers*, em cujo interior se localiza o agente. Geralmente as lesões são únicas e encontradas nas áreas do corpo que estão em maior contato com a água. Pode haver infecção de órgãos internos e ainda le-

sões atípicas onde as áreas da lesão são recobertas por massas teciduais e pele escura. Ao corte essas lesões são recobertas por tecido fibroso isolando-as do organismo.

c) Patologia

Os primeiros sinais de invasão são minúsculos focos simples ou múltiplos de necrose, que evoluem rapidamente e se desenvolvem em massas granulomatosas ulcerativas circulares, com corrimentos serossanguinolentos, mucossanguinolentos, hemorrágicos e, às vezes, mucopurulenos^[5,10]. Essas massas, de cor branca a amarelada, têm consistência arenosa ou dura, semelhante a tumores. Devido ao intenso prurido, a automutilação é frequente, sendo causa de hemorragia. As massas possuem bordas irregulares com hifas recobertas por células necróticas, com infiltrações de eosinófilos, semelhantes a corais chamadas de *kunkers*^[3]. Os *kunkers* são compostos por hifas fúngicas, exsudato do hospedeiro e proteína, além do tecido necrosado. Os *kunkers* variam de tamanho entre 2 e 10mm de diâmetro e penetram no tecido granular. Em casos crônicos atingindo os membros, os animais apresentam claudicação, podendo, às vezes, apresentar comprometimento ósseo. A pitiose tem evolução rápida seguida de morte devida a diagnóstico errôneo ou demorado, quando os animais não respondem mais ao tratamento^[12].

d) Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico definitivo são necessários biópsia, cultura e exame citológico do exsudato ou do tecido afetado. Amostras do tecido podem ser submetidas a exame histológico. Os achados comuns são inflamações piogranulomatosas com grandes quantidades de eosinófilos.

A cultura é feita com incubação em ágar de extrato vegetal e isolamento. O tecido colhido deve ser lavado em solução salina estéril e incluído profundamente no meio. Para o exame citológico, o tecido é macerado e picado com bisturi, e o material é colocado em uma lâmina microscópica e incubado, durante a noite, em uma mistura de hidróxido de potássio 10% e tinta nanquim (1:1). As hifas coram em preto e aparecem como amplas estruturas ramificadas de paredes espessas^[10]. A realização do teste de ELISA para diagnosticar pitiose em humanos, equinos e cães obteve 100% de detecção nos soros testados, ao passo que o método de imunodifusão em gel de ágar detectou 61,5% dos soros. O teste de imunodifusão é específico, porém pouco sensível em comparação à técnica de ELISA^[9].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui outras doenças de pele, como habronemose, tecido de granulação exuberante, neoplasia, granulomas bacterianos e carcinoma de células escamosas invasivo^[10].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Um pouco antes da morte do animal e logo após, um número de bactérias intestinais pode invadir o tecido do hospedeiro. Devido a isso, muitas vezes o espécime colhido fica prejudicado para análise laboratorial, e a colheita de amostras frescas, tão logo quanto possível, é importante. O material a ser coletado inclui soro, biópsia da lesão e exsudato do tecido afetado. Enviar as amostras a um laboratório de micologia para isolamento e cultura e para um laboratório de patologia para histopatologia. O material de biópsia, que contém os *kunkers*, deve ser dividido em duas porções: uma para exame histopatológico e outra para o isolamento do agente. Os fragmentos destinados à histopatologia devem ser fixados em solução de formol a 10%^[3]. O restante do material deve ser colocado em sacos plásticos ou jarras inquebráveis refrigeradas, ou em isopor com gelo. Gelo seco, com isolamento completo, é preferido para longas preservações.

Referências bibliográficas

1. FREY JR., F. et al. Pitiose eqüina na região sul do Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 107-111, 2007.
2. GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 695-720, 2003.
3. LEAL, A.T. et al. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, p. 735-743, 2001.
4. LEAL, A. B. M., LEAL, A. T., SANTURIO, J. M. et al. Pitiose eqüina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2001.
5. MEIRELES, M.C.A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, v. 36, p. 139-142, 1993.
6. MENDOZA, L., AJELLO, L., McGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.
7. MENDOZA, L.; ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, p. 123-129, 1986.
8. MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Mycology Medicine**, v. 6, p. 151-164, 1996.
9. MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.
10. MORIELLO, K.A. et al. Enfermidades da Pele. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000.
11. SANTURIO, J.M. et al. In: Simpósio Brasileiro sobre Micoses Animais - HCPA, 1, Porto Alegre, RS: 28-44, 2000.
12. SANTURIO, J.M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006.

4. PRINCIPAIS DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS EQUINOS

4.1 Endoparasitoses

4.1.1 Estrongilose

Doença causada pela infestação por grandes estrôngilos (*Strongylus* sp., *Triodontophorus* spp.) e pequenos estrôngilos (grupo Trichonema - *Cyasthotominae*). A estrongilose equina geralmente é causada pela infestação mista desses parasitos. A doença pode acometer animais de todas as idades, entretanto é mais comum em animais entre 1 e 3 anos de idade. A infestação severa é caracterizada por perda da condição corporal e anemia.

Os estrôngilos são parasitas do intestino grosso, e os gêneros mais importantes para equinos são: *Strongylus*, *Triodontophorus* e *Trichonema* (ciatostomíneos).

Etiologia e epidemiologia

Os estrôngilos podem ser separados em grandes e pequenos.

- **Grandes estrôngilos**

Os grandes estrôngilos podem ser classificados como pertencentes à ordem Strongylida, superfamília Strongyloidea: as principais características são: macho com bolsa copuladora bem desenvolvida, constituindo a verdadeira bolsa ou bolsa estrongilata (estrongilorida), existente apenas nessa superfamília, que se movimenta para auxiliar o movimento da cópula. Os espículos são iguais entre si. Seus representantes diferem em estrutura e hábitos. Possuem ovos de casca dupla e fina com várias células no seu interior (ovo morulado). Família Strongylidae: presença de cápsula bucal, esôfago claviforme, cavidade oral bem desenvolvida e geralmente circundada por coroa raiada. O corpo é espesso. Quando adultos, parasitam trato digestivo, principalmente ceco e cólon. A infecção é passiva, via oral, através de L₃. Subfamília Strongylinae: cápsula bucal com formato subglobular; os adultos são hematófagos. Sulco cervical ausente, bolsa copuladora bem desenvolvida e gênero *Strongylus* (gr. *strongylos*, redondos). Quanto às espécies de importância, podem ser citadas: *Strongylus vulgaris* (intestino grosso); *Strongylus equinus* (intestino grosso, ceco e cólon); *Strongylus edentatus* (intestino grosso, ceco e cólon); e *Triodontophorus* (gr. *tri*, três; *odontos*, dente; *phoros*, portador), *T. serratus*, *T. tenuicollis*, *T. brevicauda*, *T. minor* (intestino grosso)^[1,2].

a) ***Strongylus vulgaris* (Intestino Grosso)**

Características morfológicas: corpo retilíneo e rígido, de cor cinza-escura, tamanho de pequeno a médio (fêmea com 2 a 2,5cm, macho com 1 a 1,6cm). Adultos hematófagos com cápsula bucal grande, coroa franjada, apresentando dois dentes arredondados e um ducto da glândula esofagiana. Esôfago claviforme. Machos com bolsa copuladora e dois espículos de tamanho médio. Fêmeas terminando afiladamente^[1,2].

Ciclo biológico: os parasitos adultos vivem no ceco e no cólon. Os ovos são eliminados nas fezes e se desenvolvem até L₃ (forma infectante) em aproximadamente duas semanas, no verão, em climas temperados. As L₃ penetram na mucosa intestinal e se transformam em L₄ na submucosa. Depois, estas entram em pequenas artérias e migram no endotélio até a artéria mesentérica cranial e seus ramos principais, local de predileção. Depois de meses, ocorre a transformação em L₅, com retorno à parede intestinal através das luzes das artérias. Ocorre a formação de nódulos ao redor das larvas, principalmente nas paredes do ceco e cólon. Em função do seu tamanho, não podem mais seguir dentro das artérias. Ocorre, então, a ruptura desses nódulos liberando os parasitos adultos jovens na luz intestinal. O período pré-patente é de 6 a 7 meses^[3].

O *S. vulgaris* é a espécie mais patogênica para equinos, e a patogenia está na dependência do número de estrôngilos, da idade do equino e de seu estado físico. Os nódulos formados na artéria mesentérica anterior são responsáveis por tromboembolias que levam a cólicas, o que pode ser letal ao animal por hemorragia interna pelo rompimento da artéria^[2]. Nódulos hemorrágicos na mucosa do intestino grosso podem formar abscessos e aneurisma na artéria mesentérica cranial e em suas ramificações, renal, esplênica e cecal média. Endarterite com trombose, estenose ou oclusão nas artérias com consequente enfarto nos órgãos por elas irrigados também podem acontecer.

b) ***Strongylus equinus* (intestino grosso, ceco e cólon)**

Características morfológicas: coloração cinza-escura ou castanho-avermelhada quando recentemente coletada, tamanho de pequeno a médio (fêmea entre 3,5 e 5,5cm; macho entre 2,5 e 3,6cm). Adultos hematófagos possuem cápsula bucal grande, com coroa franjada e três dentes pontiagudos (sendo um deles com ponta bífida) e um ducto da glândula esofagiana. O esôfago é claviforme. Os ovos medem de 92 a 98µm de comprimento por 54µm de largura. As larvas se localizam no fígado, pâncreas, pulmões, tecido conjuntivo e parênquimas^[1,2].

Ciclo biológico: pouco se conhece da migração larval desse parasito, porém há sugestão de que as L₃ perdem as cápsulas enquanto penetram na parede do ceco e do cólon ventral, e dentro

de uma semana provocam a formação de nódulos nas camadas intestinais da mucosa e subserosa, onde ocorre a muda para L_4 . As L_4 seguem pela cavidade peritoneal, para o fígado, onde migram no parênquima hepático por seis semanas aproximadamente. Depois disso, L_4 e L_5 são encontradas no pâncreas e ao redor dele antes do aparecimento na luz do intestino grosso. O período pré-patente é de 8 a 9 meses^[3].

c) ***Strongylus edentatus* (intestino grosso, ceco e cólon)**

Características morfológicas: a cabeça é mais larga e bem distinta do corpo por uma constrição, tamanho de pequeno a médio (fêmea entre 3,3 e 4,4 cm; macho entre 2,3 e 2,8cm). Os adultos são hematófagos, possuem cápsula bucal grande, com coroa franjada, um ducto da glândula esofagiana, não apresentam dentes, e o esôfago é claviforme^[1,2].

Ciclo biológico: Depois de penetrar na mucosa intestinal, as L_3 seguem via sistema porta até o parênquima hepático, e em poucos dias ocorre a muda para L_4 . De seis a oito semanas após a infecção, larvas podem ser encontradas sob o peritônio ao redor do ligamento hepatorrenal seguindo para diversos locais, principalmente flancos e ligamentos hepáticos. Depois de 4 meses ocorre a muda final, e cada L_5 sob o peritônio segue até a parede do intestino grosso, onde se forma um grande nódulo purulento, que se rompe liberando o parasita adulto jovem na luz. O período pré-patente vai de 10 a 12 meses^[3].

d) ***Triodontophorus* (gr. *tri*, três; *odontos*, dente; *phoros*, portador), *T. serratus*, *T. tenuicollis*, *T. brevicauda*, *T. minor* (intestino grosso).**

Características morfológicas: parasitos avermelhados robustos, facilmente visíveis na mucosa do cólon, tamanho de pequeno a médio (fêmea 2,5cm; macho 1,8cm). Os adultos são hematófagos. Cápsula bucal de tamanho médio, com coroa franjada, ducto da glândula esofagiana e com lâminas serrilhadas no fundo da cápsula^[1,2,3].

Ciclo biológico: não migratório; os adultos também são hematófagos. Não há muitas informações sobre o ciclo de desenvolvimento desse parasito^[2].

• **Pequenos estrôngilos**

Existem mais de 40 espécies. São encontrados no intestino grosso, principalmente ceco e cólon de equinos. Os efeitos sobre seu hospedeiro variam de sintomas frustros a sintomas clínicos de enterite grave. As espécies mais comuns nesse grupo são: *Oesophagodontus* spp., *Poterostomum* spp., *Gyalocephalus* spp. e os do grupo Trichonema, *Cyatostomum* spp., *Cylcocycclus* spp. (gr. *cyllico*, taça; *kyklos*, circular), *Cylicodontophorus* spp., *Cylicostephanus* spp. (gr. *cyllico*, taça; *stephanos*, coroa)^[1,3]. Como as espécies envolvidas são muito semelhantes, tanto na morfologia como em seu comportamento, estes serão aqui tratados como pequenos estrôngilos.

Características morfológicas: tamanho pequeno (menores que 1,5cm). Não são hematófagos, possuem cápsula bucal de formato retangular e com parede espessa e bem desenvolvida, com coroa franjada dupla, ducto da glândula esofagiana e com lâminas no fundo da cápsula. O esôfago é claviforme. A coloração varia de branca a vermelho-escura. A maioria é visível ao exame minucioso da mucosa ou do conteúdo do intestino grosso^[1,2].

Ciclo biológico: Após serem ingeridas, as L_3 infectantes penetram nas glândulas do intestino grosso (ceco e cólon) e migram dentro da mucosa. O hospedeiro desenvolve uma reação inflamatória ao redor das larvas que mudam para L_4 dentro desses nódulos após a segunda semana da infecção e emergem para o lúmen 1 a 2 meses depois para amadurecerem formando as L_5 . Em animais reinfectados as L_4 permanecem nos nódulos por vários meses, fenômeno conhecido como hipobiose larval, estimulada pela imunidade do animal. Os ovos começam a aparecer nas fezes de

seis a 14 semanas na primeira infecção e 12 a 18 semanas na reinfecção. No ambiente as larvas passam a L₁- L₂- L₃ em 4 a 5 dias. O período pré-patente deste grupo, em geral, varia de 2 a 3 meses, embora isso possa ser ampliado em função da hipobiose de algumas espécies^[2,3].

Diagnóstico

Pode ser feito através da anamnese, dos sinais clínicos e identificação e constatação de ovos em exames parasitológicos de fezes pelo método de flutuação.

a) Sinais clínico-patológicos

Os parasitos adultos podem causar diarreia fétida, anorexia, emagrecimento, anemia, edema (abdome e pernas) e cólicas (geralmente de curta duração). Os sinais clínicos das larvas geralmente não são notados (lesões no fígado e pâncreas), porém quando ocorre orquite ou claudicação, pode-se suspeitar de *S. vulgaris*. As larvas podem causar cólicas. As características clínico-epidemiológicas particulares são descritas abaixo:

- *S. vulgaris*: embora as lesões mais frequentes sejam na artéria mesentérica e na parte anterior da aorta, também são verificadas nas artérias ilíaca externa (embolia, claudicação intermitente ou permanente), hepática e espermática (orquite). Pode ocorrer aneurisma com ruptura do vaso e morte. Há associação entre os casos de cólicas e aneurismas da artéria mesentérica cranial e tromboses nas artérias intestinais. Pode ocorrer vôlvulo, paralisia e invaginação intestinal por compressão sobre os nervos, levando a uma vasodilatação e congestão. As larvas provocam elevação de temperatura do corpo, perda de apetite, diminuição do peso, depressão, apatia, diarreia ou constipação, cólica e morte em 14 a 20 dias. A arterite devida à presença de *S. vulgaris* é grave. A formação de trombos interfere na circulação sanguínea, diminuindo o suprimento de sangue ao intestino e o equino fica predisposto à cólica e à oclusão intestinal^[1].

- *S. equinus*: dependendo da quantidade de L₃ ingerida, o animal pode apresentar emagrecimento, dor e cólica pelo fato de a função hepática ou pancreática estar anormal^[2]. Esta é a espécie que menos migra, porém os prejuízos causados à parede intestinal são consideráveis.

- *S. edentatus*: dependendo da quantidade de L₃ ingerida, o animal pode apresentar emagrecimento, dor e cólica ocasionados pela função hepática anormal e pelos nódulos no ceco e no cólon^[2]. Podem ocorrer anemia e cólica, esta última em consequência dos nódulos que o parasita forma no tecido conjuntivo sob o peritônio. Diarreia e morte do animal parasitado são causadas provavelmente pela presença dos estrôngilos na cavidade peritoneal, que contém um líquido sanguinolento. Na necropsia podem ser observadas peritonite, petéquias no miocárdio e inflamação no baço. A diarreia é consequência da absorção do líquido da cavidade peritoneal em virtude da reação proliferativa e inflamatória crônica, ocasionada pela migração das larvas^[1].

- Os parasitos do gênero *Triodontophorus* causam lesões na mucosa do intestino grosso que se manifestam pelos hábitos alimentares dos parasitas adultos, em particular *T. tenuicollis*, cujos adultos se nutrem em grupos e provocam a formação de grandes úlceras profundas com diâmetro variado.

- Pequenos estrôngilos: a infecção pode produzir diarreia, cólica e, ocasionalmente, morte. Na necropsia pode ser observada inflamação no ceco e no cólon, com numerosas larvas dentro da mucosa. A patogenicidade é baixa^[2].

b) Diagnóstico laboratorial

A identificação e constatação de ovos são obtidas por meio de exames parasitológicos de fezes pelo método de flutuação. Como em algumas espécies os ovos são indistinguíveis, tornando-se difícil sua identificação, deve-se recorrer à coprocultura para o reconhecimento específico das larvas. A constatação das formas adultas é possível durante a necropsia^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser enviado é amostra de fezes frescas, de preferência colhidas do reto.

Referências bibliográficas

1. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed., São Paulo: Icone, 2004. 607p.
2. MONTEIRO, S.G. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Santa Maria: UFSM, 2007. 271p.
3. URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

4.1.2. Oxiurose

Conceito

Doença comum, de distribuição mundial, causada pelo *Oxyuris equi*, de importância patogênica limitada no intestino. Os parasitos fêmeas podem causar intenso prurido anal durante o processo de ovoposição. Os hospedeiros são equinos e asininos. O parasito localiza-se no ceco, cólon e reto^[3].

Etiologia e epidemiologia

O parasito pertence à ordem Oxyurida, superfamília Oxyuroidea, família Oxyuridae, gênero *Oxyuris*, e espécie *O. equi* (*Trichocephalus equii*, *O. curvulata* e *O. mastigodes*).

Características morfológicas: é de cor esbranquiçada, corpo espesso, orifício oral hexagonal, circundado por três lábios (trilobado) e seis papilas (quatro grandes e duas pequenas), vestíbulo curto, esôfago longo com dilatação posterior, rabditiforme (corpo, istmo e bulbo). A fêmea (50 a 150mm) é maior que o macho (9 a 12mm) e apresenta a extremidade anterior curva semelhante a uma bengala e a posterior afilada e de comprimento variável, com dois ovários situados posteriormente, um útero, e vulva no terço anterior do corpo. Os ovos são ovalados, providos de opérculo em uma das extremidades, medem cerca de 85 a 95 μ de comprimento por 40 a 45 μ de largura e estão embrionados por ocasião da ovoposição. O macho apresenta um único espículo, o gubernáculo está ausente e é provido de bolsa caudal típica sustentada por cinco pares de papilas. Os adultos nutrem-se da mucosa e do conteúdo intestinal^[1].

Ciclo biológico: os parasitos adultos são encontrados na luz do cólon, após a fertilização; a fêmea grávida migra para o ânus, projeta a extremidade anterior e põe ovos em grumos, de 8 mil a 60 mil, vistos macroscopicamente semelhantes a estrias gelatinosas branco-amareladas na pele perianal. A postura ocorre frequentemente à noite, e logo depois as fêmeas são eliminadas com a defecação seguinte. O ovo com L_3 infectante é eliminado e ingerido. As larvas são liberadas no intestino delgado, movem-se para o intestino grosso e migram para as criptas mucosas do ceco e do cólon, onde se desenvolvem em L_4 dentro de 10 dias, emergem e se nutrem da mucosa antes de atingir os estágios adultos. O período pré-patente é de 4 a 5 meses^[1,2,3].

A patogenia se expressa pela ação das larvas que, em grande número, produzem inflamação intestinal, às vezes com diminutas feridas, pequenas erosões da mucosa, pela constante mudança de lugar ocasionando danos. Se em pequeno número não são patogênicas, tampouco os adultos são. Durante a postura as fêmeas eliminam uma substância aderente que causa intenso prurido^[1,3].

Pelo fato de os animais se esfregarem contra obstáculos, frequentemente flocos de substância gelatinosa contendo ovos são espalhados no ambiente. Por esse motivo, podem instalar-se cargas maciças em equinos em estábulos contaminados. Parece haver pouca imunidade à reinfecção^[3].

Diagnóstico

a) Sinais clínico-patológicos

Febre, inapetência e cólica podem ocorrer. O prurido anal em consequência da ovipostura na região perianal leva os animais a se coçarem, roçarem contra obstáculos sólidos, o que provoca queda de pelos, áreas alopecicas, com formações semelhantes à sarna na pele sobre a anca e na parte superior da cauda. As lesões produzidas pelo constante coçar podem ser invadidas por bactérias, causando infecção secundária^[1,3].

b) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico pode ser realizado pelos sinais clínicos, como prurido anal, massas de ovos amarelo-acinzentados na pele perineal e pendentes do ânus, bem como pelos dados epidemiológicos e da pesquisa do parasita. O diagnóstico laboratorial é realizado pelo exame parasitológico de fezes para pesquisa de ovos pelo método de flutuação^[1,3].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser enviado é amostra de fezes frescas, de preferência colhidas do reto.

Referências bibliográficas

1. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Icone, 2004. 607p.
2. SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias: en los animales domésticos**. 7. ed., México: Interamericana, 1987. 823p.
3. URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

4.1.3 Parascariose

Conceito

Doença de ocorrência mundial importante para potros jovens, podendo causar-lhes definhamento. Os principais hospedeiros são equinos e asininos. Os parasitos adultos localizam-se no intestino delgado^[1,3].

Etiologia e epidemiologia

Os parasitos pertencem à superfamília Ascaroidea, família Ascaridae, subfamília Ascarinae, gênero *Parascaris* (gr. *para*, ao lado de; *askaris*, verme), espécie *Parascaris equorum*. É maior que o *Ascaris* e tem lábios quadrangulares, revestidos na face interna por uma membrana transparente com bordas denticuladas. A expansão cervical é ausente. Seus espículos são iguais entre si. Seus ovos têm a casca finamente pontilhada. Há uma única espécie que parasita equinos^[1,3].

Características morfológicas: *P. equorum* tem coloração branco-amarelada, muito grande, podendo chegar a até 40cm de comprimento, corpo robusto, rijo e elástico, cabeça grande e bem distinta. O orifício oral é circundado por três lábios e pequenos interlábios; lábio dorsal com dupla papila na base e os dois ventro-laterais, cada um com uma grande papila dupla também localizada na base. A extremidade posterior do macho é cônica, com asa caudal estreita e provida de papi-

las pré- e pós-cloacais. A extremidade posterior da fêmea tem pequeno prolongamento cônico; a vulva está situada a 40 a 90mm da extremidade anterior. Os ovos medem de 90 a 100 μ de diâmetro e são quase esféricos, acastanhados, de casca espessa e com uma camada externa escavada^[1,3].

Ciclo biológico (ciclo direto): os ovos eliminados nas fezes podem atingir o estádio infectante contendo L₂ já em 10 a 14 dias, dependendo da temperatura. Após a ingestão e a eclosão, as larvas penetram na parede intestinal e em 48 horas atingem o fígado, por via linfática e pela veia porta. Em duas semanas chegam aos pulmões, onde migram para os brônquios e para a traqueia, são deglutidas e retornam ao intestino delgado. O local de ocorrência e a época das mudas larvais parasitárias não são conhecidos com exatidão. Porém, parece que a muda de L₂ para L₃ ocorre entre a mucosa intestinal e o fígado; e as duas mudas subsequentes, no intestino delgado. O período pré-patente mínimo do *P. equorum* é de 10 semanas. Não há evidência de infecção pré-natal^[3].

A patogenia se desencadeia pelas formas imaturas que podem causar no fígado hemorragias focais e trajetos eosinofílicos, que desaparecem deixando áreas esbranquiçadas de fibrose. A migração larval nos pulmões também resulta em hemorragias por rompimento capilar e infiltração por eosinófilos, que mais tarde são substituídos por acúmulo de linfócitos, enquanto se desenvolvem nódulos linfocíticos verde-acinzentados subpleurais ao redor de larvas mortas ou que estão morrendo. Esses nódulos são mais numerosos após a reinfecção. Ocorre estimulação da secreção de muco. Há o desenvolvimento de bronquite e bronquiolite eosinofílica^[3].

Os parasitos adultos que apresentam rápido crescimento e alta produção de ovos requerem grande quantidade de alimentos, podendo levar o animal a diminuição do ganho de peso e hipoalbuminemia. Devido a alterações da motilidade intestinal e à ação mecânica dos novelos do parasita, pode ocorrer invaginação, obstrução intestinal, perfuração, peritonite e morte. A alta fecundidade da fêmea do parasito adulto faz com que os potros infectados eliminem milhões de ovos nas fezes por dia, e a extrema resistência do ovo no ambiente garante sua persistência durante vários anos.

As temperaturas mais altas no verão fazem com que os ovos se tornem infectantes na mesma época em que há uma população de potros suscetíveis, que contaminarão os pastos com ovos que, por sua grande durabilidade, sobrevivem durante vários períodos subsequentes de pastejo. Cargas maciças de ovos são usualmente eliminadas por animais jovens de até 1 ano de idade e potros, que se infectam a partir do primeiro mês de vida aproximadamente, com a infecção mantendo-se amplamente por transmissão sazonal entre esses grupos de animais jovens. Equinos adultos podem abrigar parasitos adultos, porém a eliminação de ovos não é muito alta nesses animais^[3].

Diagnóstico

O diagnóstico é realizado pela identificação do parasita em necropsias ou pela identificação microscópica dos ovos nas fezes.

a) Sinais clínico-patológicos

Os sintomas mais comuns são respiratórios, como taquipneia, dispneia, tosse, secreção nasal, porém os potros permanecem alerta. Esses sintomas podem ser acompanhados de febre, anorexia, diminuição do crescimento, emagrecimento, pelos opacos e sem brilho, ventre abaulado, diarreia e cólicas. Pode haver cólica e obstrução no intestino delgado de potros^[2].

b) Diagnóstico laboratorial

É realizado pelo exame parasitológico de fezes de equinos e asininos pelo Método de Flutuação, para identificação microscópica de ovos de *P. equorum*.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser enviado é amostra de fezes frescas, de preferência colhidas do reto.

Referências bibliográficas

1. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed., São Paulo: Ícone, 2004. 607p.
2. MONTEIRO, S.G. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Santa Maria: UFSM, 2007. 271p.
3. URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

4.1.4 Piroplasmose

Conceito

Piroplasmose equina é uma doença causada por protozoários, transmitida por carrapatos que podem acometer equídeos, como cavalos, mulas, burros e zebras. É conhecida também como nutaliose, babesiose e tristeza parasitária equina.

Etiologia e epidemiologia

Os agentes etiológicos são protozoários parasitas do sangue, que pertencem à classe Piroplasmida, ordem Piroplasmorida e família Babesiidae. Nessa família os parasitos possuem forma arredondada, piriforme ou ameboide, com estádios em eritrócitos, linfócitos, histiócitos e eritroblastos, são desprovidos de pigmentos, e a multiplicação se dá por cissiparidade simples e esquizogonia. O ciclo biológico é indireto, heteroxeno. Os hospedeiros definitivos são vertebrados e os intermediários são artrópodos (carrapatos). Gênero *Babesia* (*Piroplasma*, *Nuttalia*, *Babesiella*, *Rangelia*, *Rossiella*, *Microbabesia*, *Nicollia*, *Achromaticus*, *Pattonella*, *Francaiella*, *Lushia*, *Sogdianella*, *Entopolypoides* e *Smithia*). O nome do gênero é dado em homenagem a Victor Babés, nascido em Viena em 1854, que constatou pela primeira vez o parasito em sangue de bovinos da África que apresentavam hemoglobinúria. É o mais importante gênero da família Babesiidae, e suas espécies, transmitidas por carrapatos, têm estruturas semelhantes e causam os mesmos efeitos em seus hospedeiros, porém variam em virulência.

Os trofozoítos se multiplicam em eritrócitos por divisão binária formando pares. Quando a divisão é feita por esquizogonia formam tétrades. Apresentam dois grandes grupos de espécies, as grandes, com mais de 3 μ de comprimento (2,5 a 5 μ), e as pequenas, com menos de 3 μ de comprimento (1 a 2,5 μ). Nos eritrócitos os trofozoítos são piriformes, arredondados, ovalados ou irregulares, geralmente aparecendo aos pares, sendo unidos pela extremidade mais fina. As formas esféricas no ovário do carrapato estão circundadas por membrana da célula do hospedeiro^[1].

A espécie *Babesia equi* (*Theileria equi*, *Nutallia equi*, *N. asini*, *N. minor*, *Achromaticus equi*, *Piroplasma equi*) é considerada uma pequena babesia, medindo de 2 a 3 μ . Causa uma parasitemia muito alta e aparecem um, dois, três ou quatro trofozoítos nos eritrócitos dos hospedeiros. Quando aparecem quatro, eles têm forma de cruz de malta. O animal permanece portador por toda a vida. Os possíveis hospedeiros intermediários no Brasil são carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, experimentalmente incapazes de transmitir a *B. equi*^[5]. A espécie *Babesia caballi* (*Piroplasma caballi*) é considerada uma grande babesia, mede em sua forma ovalada 1,5 por 3 μ e na piriforme de 2 a 5 μ de comprimento. Aparece um a dois trofozoítos dentro do eritrócito. Os hospedeiros intermediários são os mesmos citados anteriormente^[1,2].

Ciclo biológico: ao fazer o repasto sanguíneo no hospedeiro definitivo, o carapato ingere sangue com merozoítos, que se diferenciam e fazem reprodução sexuada (gametogonia) originando um zigoto denominado oocineto, que penetra nas células do tubo digestivo do hospedeiro intermediário e se multiplica por divisão binária ou múltipla até as células se romperem e liberarem organismos claviformes, móveis e alongados. Estes, por sua vez, migram para os tecidos da fêmea do carapato, através da hemolinfa, chegando aos ovários (transmissão transovariana) ou às glândulas salivares (transmissão transestacial) na forma de trofozoítos. O carapato, ao sugar o hospedeiro definitivo, inocula as formas trofozoíticas que penetram nos eritrócitos deste e se dividem assexuadamente (divisão binária ou esquizogonia) formando merozoítos. A célula se rompe e os merozoítos são liberados penetrando em outros eritrócitos. A transmissão ocorre de duas formas; isso vai depender do hospedeiro intermediário em questão. A forma transovariana ocorre nas babesioses transmitidas por carrapatos monoxenos, como *Anocentor nitens*, em que a transmissão é da fêmea para seus ovos, o carapato adulto infecta-se mas não transmite a doença, porém larvas ou ninhas originadas destes contaminarão o hospedeiro definitivo. A forma transestacial ocorre nas babesioses transmitidas por carrapatos heteroxenos, como *Amblyomma cajennense*, nos quais os protozoários são transmitidos pelos diversos estádios de uma mesma geração, a larva infectada muda para ninfa com as formas infectantes, ocorrendo então a transmissão ao hospedeiro definitivo^[1,2].

Os parasitas são encontrados na Europa, Ásia, África, América Central e no sul dos Estados Unidos. E no Brasil, resultados sorológicos positivos para *B. equi* foram relatados no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais e em Santa Catarina (no Planalto Catarinense)^[4].

Os animais infectados podem permanecer portadores por longos períodos e agir como fontes de infecção para carrapatos, que atuam como vetores. A introdução de animais portadores em áreas onde os carrapatos vetores são predominantes pode levar a uma epizootia com propagação da doença^[3].

Geralmente se afirma que há resistência etária inversa à infecção por babesia, visto que animais jovens são menos suscetíveis à babesiose que animais mais velhos. Ainda se desconhece a razão desse fato^[6].

Diagnóstico

O diagnóstico é realizado por sinais clínicos, identificação da presença de carrapatos vetores e pesquisa do parasito em esfregaços sanguíneos.

a) Sinais clínico-patológicos

A *B. equi* é a espécie mais patogênica. O período pré-patente vai de 10 a 21 dias, tendo como primeiro sinal clínico a elevação da temperatura, com febre intermitente, mucosas pálidas, ictericas, taquipneia, hemoglobinúria e constipação. Não há paresia do trem posterior. Podem ocorrer hemorragias leves nas mucosas nasal, oral e ocular. Normalmente a doença regredirem em 7 a 12 dias, e em casos agudos a morte ocorre em 1 a 2 dias ou pode cronicizar-se, levando semanas ou meses até a cura. Na necropsia a carcaça está anêmica, icterica e edematosa. Há acúmulo de fluidos nas cavidades pericárdica e peritoneal, esplenomegalia e hepatomegalia, e estômago e intestinos hemorrágicos. Na *B. caballi* o período pré-patente varia de 6 a 10 dias, com sinais de prostração, anorexia, febre com a temperatura podendo exceder a 40°C e permanecer assim por uma semana. Algumas vezes há hemoglobinúria. Anemia, ictericia e gastroenterite também são observadas. É frequente a paresia do trem posterior em consequência de lesões nervosas^[1,6].

b) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é definitivo e pode ser realizado por esfregaço sanguíneo, corado com Giemsa. É importante salientar que o encontro dos parasitos nos eritrócitos ocorre na fase febril aguda; uma vez cessada essa fase, torna-se difícil o encontro deles. Podem ainda ser feitos testes sorológicos como imunoensaio enzimático (ELISA), fixação de complemento (FC) e imunofluorescência indireta (IFI). Técnicas moleculares com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenvolvidas e continuam a se expandir, tendo-se mostrado altamente específicas e sensíveis, sendo uma promessa, com papel crescente, no diagnóstico dessas infecções^[3].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para demonstração e identificação dos parasitos pelo exame de esfregaço sanguíneo, o sangue deve ser coletado de capilares sanguíneos superficiais da pele do cavalo na fase aguda da doença. Para testes de IFI, ELISA e FC, as amostras de sangue devem ser coletadas em tubos de ensaio sem anticoagulante. Para a realização de PCR, coletam-se 5ml de sangue para cada animal, com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na proporção de 1mg/ml de sangue, sendo essas amostras acondicionadas em tubos e mantidas refrigeradas até a realização do teste.

Referências bibliográficas

1. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed., São Paulo: Icone, 2004. 607p.
2. MONTEIRO, S.G. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Santa Maria: UFSM, 2007. 271p.
3. OIE – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE SAÚDE ANIMAL. **Manual de piroplasmose equina**. 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.08_EQUIINE_PIROPLASMOSIS.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2009.
4. SOUZA A.P.; BELLATO V.; SARTOR A.A.; SILVA A.B. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia equi* em eqüinos no planalto catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 119-121, jan./mar. 2000.
5. STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 97-108, 1995.
6. URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

4.1.5 Surra

Conceito

Surra é o termo que designa a doença causada pelo protozoário *Trypanosoma evansi*, sendo uma tripanossomose que afeta qualquer espécie animal^[25]. Em eqüinos, a doença também é conhecida como “derrengadera”, “mal das cadeiras” ou “peste quebra-bunda”, dependendo do local onde ocorre^[15,24]. A doença já foi descrita na África, Ásia, América Central e América do Sul, e está associada a distúrbios hematopoiéticos, circulatórios e nervosos. A primeira descrição da doença foi em 1881, no sangue de eqüinos e camelos, embora já fosse observada havia muitos séculos. Mais tarde, em 1885, o mesmo agente foi encontrado no sangue de mulas. No Brasil, a doença foi primeiramente observada na Ilha de Marajó, entre 1827 e 1830, de onde se espalhou pela América do Sul^[15].

Etiologia e epidemiologia

O agente etiológico da surra é o protozoário flagelado *Trypanosoma evansi*. Os tripanossomas pertencem ao reino Protista, filo Protozoa, Sub-filo Sarcomastigophora, superclasse Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, subgênero *Trypanozoon*. No passado, o *T. evansi* foi denominado de *T. equinum*, *T. hippocum* e *T. venezuelense*, no entanto, sabe-se, hoje, que se trata do mesmo parasita^[15,24].

Os tripanossomas são divididos em duas seções: Salivaria, aqueles transmitidos por picadas de vetores biológicos, e Stercoraria, pela contaminação da pele ou mucosa do hospedeiro com as fezes do vetor. Os tripanossomas da seção Salivaria são altamente patogênicos para humanos e animais domésticos; o *T. evansi* pertence a esta seção. Com exceção do *T. equiperdum*, todos os tripanossomas utilizam vetores artrópodes. A transmissão se dá de forma acíclica e mecânica, ou seja, o *T. evansi* não se multiplica no vetor e o protozoário é transferido de um mamífero para outro através da picada dos vetores biológicos. Os vetores do *T. evansi* são insetos hematófagos, das famílias Tabanidae e Stomoxidae^[16], e, na América do Sul, também os morcegos hematófagos, como *Desmodus rotundus*. Esses morcegos atuam tanto como vetores quanto como reservatórios, pois neles o protozoário pode multiplicar-se e sobreviver por longo período^[15].

Pode, também, ocorrer transmissão artificial, através de agulhas contaminadas com sangue infectado. Carnívoros podem infectar-se pela ingestão de carne de animais recentemente mortos por tripanossomíase^[14]. Os tripanossomas multiplicam-se no local da picada do vetor, invadem a corrente sanguínea e o sistema linfático causando ataques febris generalizados e induzindo a uma resposta inflamatória^[4]. Tanto nas infecções transmitidas por vetores biológicos como nas causadas por transmissão mecânica as infecções sanguíneas são caracterizadas por recidivas^[35]. Em um intervalo de 5 a 7 dias são produzidos anticorpos capazes de destruir os tripanossomas levando à queda da parasitemia. Porém os tripanossomas que sobreviveram a essa reação imunemente multiplicam-se até ser destruídos por nova resposta imunológica, e esse ciclo pode continuar até a morte do animal^[29].

Primariamente, a doença afeta camelos e equinos, porém outras espécies também podem ser acometidas, como: asininos^[34], bovinos, búfalos, suínos^[32], cães, capivaras^[8], elefantes^[17], quatis^[13], veados^[33], marsupiais^[14], ovinos, caprinos, pequenos roedores silvestres e, raramente, humanos^[11,20]. A doença foi introduzida nas Américas por equinos contaminados trazidos pelos colonizadores espanhóis^[21]. No Brasil a doença já foi relatada nos estados do Pará, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul. O primeiro relato de um caso em seres humanos, foi descrito em um homem indiano recentemente^[23]. Foi descrito que o paciente afetado apresentava febre recorrente, por cinco meses, e sonolência antes de ser admitido ao hospital.

A doença apresenta ampla distribuição geográfica, com ocorrência, principalmente, na Ásia, África, e Américas Central e do Sul. Na América do Sul, a doença ocorre no Brasil, Argentina, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. No Brasil, a doença afeta, principalmente, equinos e é endêmica no Pantanal Mato-Grossense, onde assume grande importância econômica devido à grande população equina (49 mil) da região^[2]. No Rio Grande do Sul, foram relatados casos de surtos da doença em cavalos^[5,20,25]. No surto relatado por Martins de Moraes^[20], além da morte dos equinos infectados, ocorreu também o óbito de cães e capivaras com sintomas nervosos. Relatos de pecuaristas do Pantanal Mato-Grossense afirmam que a tripanossomíase em equinos é, geralmente, precedida de surtos em capivaras^[28]. Segundo estudo realizado por Krinsky em 1976, existem cerca de 50 espécies de tabanídeos envolvidos na transmissão de *T. evansi*, sendo esses os principais e vetores em condições de campo, existindo também uma correlação estacional na incidência da doença^[10,36].

Diagnóstico

O diagnóstico de surra é baseado em dados epidemiológicos, sinais clínicos, hematológicos, patológicos e principalmente, laboratoriais.

a) Sinais clínico-patológicos

A doença pode apresentar infecção de curso agudo ou crônico. A infecção aguda causa morte rápida nos animais não tratados, enquanto na crônica os animais podem morrer dentro de semanas a poucos meses. Os sinais clínicos incluem: febre intermitente, conjuntivite, perda de pelos, anorexia, emagrecimento e fraqueza progressivos, atrofia muscular e, ocasionalmente, hemorragia na câmara anterior do olho^[19,25]. Em alguns casos, sinais neurológicos são observados, como ataxia, andar em círculos, hiperexcitabilidade, quedas, *deficit* proprioceptivo e desvio da cabeça. A doença apresenta anemia hemolítica, febre progressiva, caquexia, edema das regiões inferiores do corpo e das patas, rebaixamento da região traseira do corpo e manifestações no SNC, como incoordenação motora e paralisia dos membros posteriores^[21]. No Rio Grande do Sul, um cavalo desenvolveu a “posição de cão sentado”^[25]. Existem, ainda, relatos de que a doença causa imunodeficiência^[22].

Devido à afinidade que o *T. evansi* tem por tecidos, ele causa alterações inflamatórias, degenerativas e necróticas resultantes de sua invasão nos espaços extravasculares^[18]. A principal alteração encontrada é hematológica, ou seja, anemia acentuada. Além de diminuição no hematócrito, as alterações podem incluir microesferócitos, acantócitos, dacriócitos, micrócitos, vacuolização eritrocitária, policromasia, poiquilocitose, adesão eritrocitária dos tripanossomas aos eritrócitos e eritrofagocitose^[1,5,29]. As alterações de necropsia incluem palidez das mucosas, emaciação, atrofia serosa da gordura, esplenomegalia com hiperplasia da polpa branca, linfadenomegalia, hepatomegalia, hidropericárdio, congestão e hemorragia pulmonar, além de hemorragias petequiais em vários órgãos^[6,9,17,27]. Observa-se também congestão, edema e hiperplasia linfoide no baço e nos linfonodos, assim como necrose multifocal da polpa vermelha do baço^[2,3,7]. Pode-se observar meningoencefalite e o *T. evansi* também pode ser encontrado no líquido cefalorraquidiano. Ainda são encontrados degeneração gordurosa centrolobular no fígado, miocardite e hemorragias multifocais no coração, edema pulmonar e pneumonia intersticial^[2,3,7,14,31].

A babesiose e a anemia infecciosa equina são comumente confundidas com a surra, já que cursam com um quadro clínico semelhante. Porém na babesiose a presença de trofozoítos intraeritrocitários é uma característica importante para o diagnóstico da doença^[26]. Da mesma forma, na anemia infecciosa equina ocorre alteração leucocitária caracterizada pela presença de grânulos de hemossiderina no citoplasma de neutrófilos^[12]. Essas alterações características de cada doença auxiliam na obtenção do diagnóstico diferencial. O diagnóstico definitivo de surra é o achado de tripanossoma no esfregaço sanguíneo.

b) Diagnóstico laboratorial

Os exames laboratoriais para diagnóstico de surra incluem os métodos diretos e indiretos de análise. A investigação da presença do parasito pode ser realizada por esfregaços sanguíneos, de sorologia através de ELISA e de imuno-histoquímica para detecção do parasito no encéfalo do animal suspeito^[24].

Entre os métodos diretos destacam-se os esfregaços para coloração por Giemsa, a biópsia de linfonodos e a inoculação em camundongos de sangue do animal suspeito. O diagnóstico também pode ser realizado pelo teste da centrifugação do microematócrito^[36]. Já para a utilização de cobaias, as amostras de sangue de animais infectados (0,2ml) são inoculadas intraperitonealmente em camundongos. Depois, é realizado esfregaço sanguíneo diário por punção da veia caudal por

2 meses. Esses esfregaços são corados por Giemsa, e a identificação dos parasitas é baseada em dados morfológicos e biométricos.

A morfologia dos tripanossomas pode ser observada através de microscopia de luz e de microscopia eletrônica. Na microscopia de luz observam-se formas alongadas com núcleo evidente, cinetoplasto, membrana ondulante e flagelo que corre ao longo do corpo, podendo haver também um flagelo livre. As formas encontradas em amostras sanguíneas são basicamente lancetadas, o corpo é alongado e achatado, e seu tamanho varia de 15 a 33 μ m, com média de 24 μ m. Nos exames indiretos como o hemograma observa-se marcada diminuição no hematócrito, na concentração de hemoglobina e no número de eritrócitos totais^[15,26].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de sangue podem ser obtidas por punção da veia jugular usando sistema a vácuo para coleta. Ou então punção de sangue periférico através de vaso da orelha ou cauda. O sangue (5 a 10ml) deve ser depositado em tubos ou frascos estéreis, identificados e bem vedados, para evitar o vazamento do material ou a entrada de contaminantes externos. Pode-se também utilizar a análise de líquido cefalorraquidiano com a coleta dele no local lombossacral. É utilizada agulha espinhal e mandril calibre 18 com 15cm, realizando a penetração com o animal contido no tronco em estação. O liquor deve ser analisado o mais cedo possível após a coleta. Caso não seja possível, ele deve ser diluído em igual volume de álcool para preservar as células^[30]. É importante esterilizar os instrumentos ou utilizar material descartável para evitar a transmissão da infecção a outros animais através do sangue residual.

Referências bibliográficas

1. ANOSA, V.O.; KANEKO, J.J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 4, p. 645-651, 1983.
2. AQUINO, L.P.C.T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 255-260, 1999.
3. CADIOLI, F.A. **Infecção experimental em jumento (*Equus asinus*) com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcostigophora: Trypanosomatidae)**. 135f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
4. CONNOR, R.J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2. ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v. 1. cap. 12, p. 251-296.
5. CONRADO, A.C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 928-931, 2005.
6. DAMAYANTI, R.; GRAYDON, R.J.; LADDS, P.W. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 110, n. 3, p. 237-252, 1994.
7. DARGANTES, A.P. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II. Pathology. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 4, p. 267-276, 2005.
8. FRANKE, C.R. et al. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v. 58, p. 159-169, 1994.

9. FRAZER, H.; SYMONDS, S.L. Surra in Federated Malay States. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 22, p. 185-192, 1909.
10. GRUVEL, J.; BALIS, J. La trypanosomiase a *Trypanosoma evansi* chez le dromadarie au Tchad et ses principaux vecteurs. **Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 18, p. 435-439, 1965.
11. HARTWIGK, H.; GERBER, H. Doenças infecciosas. In: WINTZER, H-J. **Doenças dos eqüinos**. São Paulo: Manole, 1990.
12. HARVEY, J.W. **Atlas of Veterinary Hematology** - Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 228p.
13. HERRERA, H.M. et al. *Trypanosoma evansi* experimental infection in south american coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 209-216, 2001.
14. HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.
15. HOARE, C.A. **The Trypanosomes of Mammals**: A Zoological Monograph. Oxford: Blackwell, 1972.
16. KRINSKY, W. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 3, p. 225-275, 1976.
17. LEVINE, N.D. **Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973.
18. LOSOS, G.J. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*, a review. **Vet. Res. Com.**, v. 4, p. 165-181, 1980.
19. LOSOS, G.J.; IKEDE, B.D. Review of pathology of diseases of domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, v. 9 (Suppl.), p. 1-71, 1972.
20. MARTINS de MORAES, C. et al. Infecção por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 159-163, 2007.
21. MADEIRA, A.M.B.N. Kinetoplastida – *Trypanosoma*. MANUAL of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5. ed., 2004.
22. OLAHO-MUHANI, W.; MUNYUA, W.K.; MUTUGI, M.W.; NJOGU, A.R. (1994). Comparison of antibody and antigen detection enzyme immunoassay for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections in camels. **Vet. Parasitol.**, v. 45, n. 3-4, p. 231-240.
23. POWAR, R.M. et al. A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 72-74, 2006.
24. RODRIGUES, A. **Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em eqüinos**. Dissertação de mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2006.
25. RODRIGUES, A. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 1-22, 2005.
26. RADOSTITS, O.M. et al. Doenças virais caracterizadas por sinais nervosos. In: _____. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suíños, Caprinos e Eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1069-1113, 2002.
27. SEILER, R.J.; OMAR, S.; JACKSON, A.R.B. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection (Surra) of horses. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 120-122, 1981.
28. SILVA, R.A.M.S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle**. Embrapa Pantanal: Corumbá, 2002.

29. SILVA, R.A.M.S.; BARROS, A.T.M.; DAVILA, A.M.R.; RAMIREZ, L.; SAHIB, C.A.; FERREIRA, M.S.J.; HERRERA, H.M. **Tripanosomose por Trypanosoma evansi (Mal-de-cadeiras):** uma avaliação sobre fatores de risco no Pantanal. Corumbá. MS: EMBRAPA-CPAP, 1996. 29p. EMBRAPA-CPAP. Boletim de Pesquisa, 6.
30. SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Eqüinos.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul. 1999. 366p.
31. TUNTASUVAN, D. et al. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 3-4, p. 357-363, 1997.
32. TUNTASUVAN, D; LUCKINS, A.G. Status of surra in Thailand. **Journal of the Tropical Medicine and Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 1998.
33. TUNTASUVAN, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 2-3, p. 223-230, 2000.
34. TUNTASUVAN, D. et al. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 227-233, 2003.
35. TURNER, M.J. Biochemistry of the variant surface glycoproteins of Salivarian Trypanosomes. **Advances in Parasitology**, v. 20, p. 69-153, 1982.
36. WOO, P.T.K. Salivarian Trypanosomes producing disease in Livestock Outside of Sub-Saharan Africa in Parasitic Protozoa. In: KREIER, J.P. (Editor) **Taxonomy, Kinetoplasts and Flagellates of Fish.** v. 1, chapter 7, New York: Academic Press, 1977. p. 270-288.

4.1 Ectoparasitoses

4.2.1 Infestação de carrapatos em eqüinos

Conceito

Os carrapatos, como são vulgarmente conhecidos os acarinos de dimensões relativamente grandes, visíveis a olho nu em todos os estágios, incluindo os ovos, possuem um par de estigmas laterais após o terceiro ou quarto par de patas, hipostômio com dentes recorrentes para a fixação e são parasitos obrigatórios^[2]. Existem duas grandes famílias: Argasidae e Ixodidae, e em equinos somente a segunda tem importância, por serem esses os carrapatos encontrados nessa espécie animal.

Os carrapatos mais comumente encontrados em equinos são o *Anocentor nitens* e o *Amblyomma cajennense*. Além das perdas sanguíneas, da espoliação e do estresse que esses parasitos causam ao hospedeiro, podem servir de vetor a alguns agentes causadores de enfermidades graves e ocasionar a perda do pavilhão auricular, deixando-os esteticamente comprometidos.

Etiologia e epidemiologia

- *Anocentor nitens*: pertencente à classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Ixodides, família Ixodidae, subfamília Amblyomminae, gênero *Anocentor*, espécie *Anocentor nitens* (*Dermacentor nitens*, *Otocentor nitens*) (gr. *ano*, em cima; *kentor*, que pica)^[2]. Carrapato da orelha dos equinos.

Espécie registrada pela primeira vez no Brasil por Aragão em 1936, mais tarde Souza Lopes e Macedo (1950) e Malheiro (1952). Eles destacam a grande distribuição geográfica da espécie no Brasil^[2,4].

Características morfológicas: rostro e palpos relativamente curtos, peritremas circulares (semelhantes a um disco de telefone), escudo sem ornamentação, sete festões. Coxas IV muito maiores que as demais. Sem placas adanais.

Ciclo biológico: ocorre em um único hospedeiro (monoxeno). As fêmeas põem em média 3 mil ovos no solo. O macho vive apenas 100 dias, partindo da data de sua fixação no hospedeiro. Os adultos copulam dois dias após o nascimento e assim permanecem até o desprendimento da fêmea. As larvas (hexápodes) podem resistir até 71 dias sem se alimentar quando as condições são favoráveis. O período de pré-postura é de 3 a 15 dias^[2]. Pode transmitir vários agentes patogênicos como, *Babesia caballi* e *B. equi*^[1].

Amblyomma cajennense pertencente à classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Ixodidae, família Ixodidae, subfamília Amblyommatae, gênero *Amblyomma*, espécie *Amblyomma cajennense* (gr. *amblys*, encoberto; *omma*, olho; foi descrito em Caiena (Guiana Francesa), por isso o nome da espécie), também é conhecido como carapato-estrela, carapato-do-cavalo^[2]. O gênero *Amblyomma* possui aproximadamente 100 espécies descritas, 33 das quais ocorrem no Brasil, sendo o *A. cajennense* a espécie que possui um papel de maior destaque. Sua área de distribuição abrange a América do Sul, América Central, sul da América do Norte e Caribe, sendo mais frequente nas regiões quentes do que nas frias^[1].

Características morfológicas: palpos e hipostômios longos. O escudo é ornamentado, com um desenho de estrela prateada. Na fêmea o escudo é triangular, arredondado anteriormente e apresenta desenhos de cor castanho-avermelhada sobre um fundo mais claro. Olhos e festões estão presentes. A base do gnatossoma é de formas variadas. Placas adanais estão ausentes no macho. Peritremas são em forma de vírgula ou triangular. O macho mede de 3,9 a 4,9mm de comprimento por 2,3 a 3mm de largura. A fêmea não ingurgitada mede de 3,3mm de comprimento por 2,6mm de largura, e a fêmea ingurgitada pode atingir até 12mm de comprimento por 8mm de largura por 6mm de espessura.

Amblyomma cajennense apresenta pouca especificidade parasitária, sobretudo nos instares larval e ninfal, que vulgarmente são conhecidos como micuins ou carrapatinhos. Podem parasitar a maioria dos animais domésticos e alguns silvestres, podendo parasitar até mesmo o homem.

Ciclo biológico: para realizar o ciclo biológico, *A. cajennense* exige três hospedeiros (trioxeno), pois todas as mudas são feitas fora dos hospedeiros. A fêmea põe de 6mil a 8 mil ovos em toda a sua vida. As larvas (hexápodes) eclodidas atacam mamíferos, nutrem-se de sangue, crescem e depois de 3 a 5 dias destacam-se, e no solo mudam e originam as ninfas (octópodes), que se fixam em um novo hospedeiro e nele permanecem de 5 a 8 dias, nutrindo-se de sangue. Depois se destacam, mudam, originando machos e fêmeas. Após 4 dias os adultos atacam um novo hospedeiro. Os machos caem depois da fertilização das fêmeas e estas, ingurgitadas, se desprendem para a oviposição no solo.

Pode transmitir vários agentes patogênicos, como *Borrelia burgdorferi*, agente da doença de Lyme, *Rickettsia rickettsi*, causadora da febre maculosa, e também a *Babesia equi*, causadora da nutaliose.

Diagnóstico

O diagnóstico pode ser feito pela constatação da presença dos carapatos. É importante a pesquisa e a coleta dos carapatos para identificação microscópica.

a) Sinais clínico-patológicos

Anocentor nitens: algumas vezes pode ocorrer obstrução do conduto auditivo em função da grande quantidade de secreção mais larvas e ninfas. Sua picada pode originar ferimentos na pele até com perda da orelha. Favorece miases, pois a fêmea segregá, durante o repasto sanguíneo, uma substância que, ao secar, lembra sangue coagulado, que pode supurar, e também podem ocorrer infecções bacterianas secundárias.

Amblyomma cajennense: as infestações maciças são responsáveis por irritação e por anemia em consequência da ação espoliadora que exercem nos animais parasitados.

b) Diagnóstico laboratorial

Carapatos adultos, especialmente, fêmeas ingurgitadas, são facilmente observados na pele, sendo seus locais preferidos face, orelhas, axilas e região inguinal. Observam-se também pequenos nódulos inflamados nessas regiões, resultado da reação inflamatória.

Os espécimes devem ser submetidos a chaves dicotômicas para identificação.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A coleta de material deve ser feita por profissional habilitado, pois os espécimes podem estar na fase de vida livre, a fase em que o carapato se encontra fora do hospedeiro, ou na fase parasitária. Além disso, dados completos devem ser enviados junto com o material, que deve estar em boas condições, tais como: nome do hospedeiro, área geográfica de procedência do material, região do corpo do hospedeiro onde os espécimes foram encontrados, período de maior quantidade (noturno ou diurno), data, nome do responsável pela coleta, etc.

Na fase de vida livre o carapato se encontra sobre ou sob folhas de vegetação em grande número. A captura pode ser manual ou com pinças de dissecação. Pode-se remover a folha contendo os carapatos. Pode-se arrastar um lençol de flanela sobre áreas suspeitas, que depois será enrolado, encerrado em saco plástico e lacrado até a chegada ao laboratório. De preferência, devem ser enviados ainda vivos ao laboratório.

Na fase de vida parasitária, os carapatos estão sobre os hospedeiros, e podem estar em toda a superfície corporal, fixados, além de dobras de pele e interior de cavidades revestidas pela pele, como ouvido externo. O mais prático é a coleta no hospedeiro, que deve ser realizada girando-se o carapato em torno de seu eixo longitudinal, de preferência com a mão. Os exemplares, em todas as fases, podem ser enviados ao laboratório vivos, em frascos com pequenos orifícios para respiração ou preservados em etanol 70°GL, ou formol 3%^[3].

Referências bibliográficas

1. CUNHA, A.P. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), (Acarí: Ixodidae) e *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acarí: Ixodidae) em eqüinos, Minas Gerais, Brasil. 2006, 62p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
2. FORTES, E. Parasitologia Veterinária. 4. ed. São Paulo: Icone, 2004. 607p.
3. MARCONDES, C.B. Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Atheneu, 2001. 432p.
4. SERRA-FREIRE, N.M.; MELLO R.P. Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2006. 200p.

3.7 Habronemose cutânea

Conceito

A habronemose cutânea, também conhecida como ferida de verão, é uma dermatite granulomatosa causada pela migração intradérmica errática das larvas do *Habronema muscae*, *H. megastoma* ou *H. microstoma*.

Etiologia e epidemiologia

A doença é causada por parasitos da superfamília Spiruroidea, família Spiruridae, subfamília Habronematinae, gênero *Habronema* sp. (gr. *habros*, delicado; *nema*, fio). São parasitos brancos e delgados, de 1 a 2,5cm de comprimento, macho com a cauda enrolada em espiral^[2,4,5]. Os ovos são alongados, têm parede fina e são larvados quando postos.

Ciclo biológico: os ovos, ou L₁, eliminados com as fezes dos equídeos são ingeridos por estágios larvais de vários muscídeos, incluindo *Musca*, *Stomoxys* e *Haematobia*, que frequentemente estão presentes nas fezes. O desenvolvimento em L₃ ocorre junto com o desenvolvimento do hospedeiro intermediário muscídeo até a maturidade. Quando a mosca se alimenta ao redor da boca do equino, as larvas passam de suas peças bucais para a pele do lábio do equino e são deglutidas, ou as moscas podem ser deglutiidas. O desenvolvimento em adulto ocorre na área glandular do estômago, em aproximadamente 2 meses. Além da boca, as moscas procuram locais úmidos, como feridas, olhos e fossas nasais para se alimentar, promovendo “deposição” das larvas de *Habronema* sp. nesses locais. Dos lábios as larvas migram para o estômago, local em que formam nódulos e as fêmeas promovem a liberação de ovos, ocasionando habronemose estomacal, porém comumente essa infecção ocorre pela ingestão de moscas contaminadas na água. Das fossas nasais as larvas migram e formam nódulos próximos a bronquíolos, acarretando habronemose pulmonar. As larvas presentes nos tecidos oculares determinam a habronemose ocular. As larvas depositadas em feridas geram a habronemose cutânea, e essa dermatite ocorre em lesões onde o animal não consegue espantar as moscas, como a parte inferior dos membros, na face abaixo do canto médio do olho, linha média do abdômen, e nos machos pode chegar até o prepúcio e o pênis. A patogenia se desenvolve pela invasão errática de larvas de *Habronema* sp. em feridas abertas, nos olhos, ou nas mucosas e causam inflamação local e o desenvolvimento de extenso tecido de granulação.

O *Habronema* sp. é de distribuição mundial e parasita a porção glandular do estômago de equídeos^[1]. A doença tem ocorrência predominante em ambientes quentes e úmidos pelo melhor desenvolvimento dos hospedeiros intermediários. Os adultos “residem” em nódulos no estômago dos equinos, dificilmente causando distúrbios. Lá depositam ovos que serão eliminados pelas fezes. As duas primeiras espécies de *Habronema* sp. possuem, preferencialmente, como hospedeiro intermediário a *Musca domestica* (mosca doméstica); já a *H. microstoma* prefere a *Stomoxys calcitrans* (mosca dos estábulos).

Diagnóstico

É realizado pela observação de lesões características circulares na pele, de 5 a 15cm de diâmetro aproximadamente, com superfície ulcerada; ao corte, há um tecido esbranquiçado com áreas focais branco-amareladas e, ocasionalmente, focos mineralizados. A confirmação se dá com o resultado histopatológico da biópsia que, microscopicamente, apresenta áreas multifocais de necrose, geralmente mineralizadas, com infiltrado inflamatório de eosinófilos, linfócitos, macrófagos, células epitelioides e gigantócitos, além de proliferação de tecido conjuntivo fibrovascular. No centro dessas áreas de necrose podem ser observadas larvas ou restos de larvas de nematódeos, porém, em muitos casos, as larvas não são observadas. A superfície da lesão está coberta por um exsudato fibrinonecrótico. A infecção gástrica não é facilmente diagnosticada, pois os ovos e as larvas de *Habronema* sp. não são facilmente demonstráveis nas fezes por técnicas de rotina^[3,5].

a) Sinais clínico-patológicos

Geralmente as manifestações clínicas da doença são raras^[1]. As lesões invadidas pelas larvas de *Habronema* sp., geralmente locais do corpo sujeitas a traumatismos, evoluem rapidamente

podendo atingir grandes diâmetros em poucos meses. Durante as fases iniciais, há intenso prurido da ferida infectada ou abrasão, que pode resultar em posterior lesão autoinfligida^[5].

As lesões caracterizam-se por tecido de granulação avermelhado, podendo estar recoberto por uma crosta acinzentada, sendo o centro ligeiramente rebaixado e as bordas elevadas. As lesões não cicatrizam espontaneamente, porém podem regredir em clima frio e recidivar num aumento de temperatura. Essas lesões causam graus variados de incômodo nos animais acometidos.

As larvas do parasito também podem ser encontradas no pulmão de potros, associadas com abscessos causados por *Rhodococcus equi*^[1]. Deve-se fazer o diagnóstico diferencial de todas as lesões ulcerativas não cicatrizantes, em especial de pitiose e sarcoide equino.

b) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é obtido com exame histológico e biópsia. Biópsia das lesões, conservando material em formol a 10% e remetendo para um centro onde haja laboratório de patologia animal. Na microscopia é possível observar as características das lesões. Entretanto o diagnóstico definitivo é obtido a partir da observação das larvas da mosca e posterior classificação e identificação pelas saliências espinhosas na cauda.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se fazer biópsia das lesões, conservá-la em formol a 10% e remetê-la para um laboratório de patologia animal.

Referências bibliográficas

1. BELLI, C.B.; SILVA, L.C.L.C. da; FERNANDES, W.R. Aspectos endoscópicos da habronemose gástrica eqüina. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 8, p. 13-18, 2005.
2. FORTES, E. **Parasitología Veterinaria**. 4. ed. São Paulo: Icone, 2004. 607p.
3. SALLIS, E.S.V.; PEREIRA, D.I.B.; RAFFI, M.B. Pitiose cutânea em eqüinos: 14 casos. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, p. 899-903, 2003.
4. SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias**: en los animales domésticos. 7. ed. México: Interamericana, 1987. 823p.
5. URQUHART, G.M. et al. **Parasitología Veterinaria**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

3.8 Pediculose

Conceito

A pediculose é causada pela infestação de insetos vulgarmente conhecidos como piolhos no corpo do animal, principalmente na pelagem da crina, da base da cauda, do espaço submaxilar, e do boleto em raças com membros pilosos^[1,2 e 4]. A partir desses locais poderá ocorrer a disseminação para o corpo inteiro do animal.

Em equinos, os piolhos mais comuns são o sugador *Haematopinus asini*, que em infestações maciças pode causar anemia e levar os animais a tornarem-se inquietos e susceptíveis a enfermidades pelo estresse e pela baixa na imunidade, e o mastigador *Damalinia equi*, que, por ser mais ativo, causa intensa irritação, o que faz com que os animais fiquem com pelos emaranhados e se cocem contra obstáculos levando à formação de lesões^[4].

Etiologia e epidemiologia

Esses piolhos pertencem à Ordem *Phthiraptera*, são altamente hospedeiro-específicos e sempre ectoparasitas, sendo a maioria incapaz de sobreviver por poucos dias fora do hospedeiro. Têm coloração variável, todos são achatados dorsoventralmente, e a maioria é cega. As patas terminam em apenas uma garra^[3,4].

- Subordem Anoplura (gr. *anoplos*, desarmado; *aura*, cauda): são os piolhos sugadores e ocorrem exclusivamente em mamíferos. Alcançam até 5mm, com pequena cabeça pontiaguda e peças bucais terminais. Em geral, têm movimentos lentos e possuem patas potentes, cada uma delas com uma garra grande e única^[1,3,4]. Em equinos, geralmente é achado o *Haematopinus asini*.

Haematopinus asini (gr. *haima*, sangue; *pino*, beber): conhecido como “piolho do nariz curto”, é maior entre os piolhos de animais domésticos. Tem até 5mm (em média 2,6 a 3,6mm) de comprimento, de coloração amarela ou castanho-acinzentada com uma listra escura de cada lado, cabeça longa e estreita, antenas com numerosos pelos, tórax retangular, mais longo e curto que a cabeça. Normalmente, localizam-se na base da crina e da cauda^[1,3,4].

- Subordem Mallophaga (gr. *mallos*, velo, lã; *phagein*, comer): são os piolhos mastigadores, ou falsos piolhos. Ocorrem em mamíferos e em aves. São geralmente menores, até 3mm, têm cabeça bem maior, ocupando a largura do corpo, arredondada anteriormente, com peças bucais ventrais. Têm garras pequenas, sendo duas nos das aves e uma nos dos mamíferos^[1,3,4].

Damalinia equi (gr. *damalos*, terneiro, bezerro), (*Bovicola equi*, *Trichodectes equi*): piolhos de coloração castanho-avermelhada, com listras de cor castanho-escura. Cabeça, mais larga que longa e arredondada anteriormente. Antenas iguais nos dois sexos. O protórax é o mais largo dos metâmeros torácicos. O abdome apresenta uma placa tergal mediana castanho-avermelhada em cada metâmero. O macho mede aproximadamente 1,6mm, e a fêmea, 1,9mm. Localiza-se nos pelos do pescoço e dorso dos animais, menos frequentemente nos membros^[1,3,4].

Os piolhos podem causar intensa irritação, obrigando os animais a se coçar, esfregar e arranhar. Ocorre, ainda, emaranhado e perda de pelos, escoriações, com quase todo o corpo envolvido em casos mais graves. Os animais ficam inquietos, estressados, o que os leva a ficar com a imunidade comprometida e sujeitos a afecções, além de ocorrer anemia em casos de infestações maciças por *Haematopinus asini*.

Em infestações mais leves, as duas espécies ocupam os mesmos locais, reservatórios na densa pelagem da crina, na base da cauda e no espaço submaxilar, também no boleto em raças com patas peludas. Pode ocorrer disseminação por todo o corpo quando a pelagem de inverno é mais densa. Isso também pode ocorrer no início de primavera e do inverno, e o número de piolhos é muito grande. A disseminação ocorre por contato e por equipamento para raspar e escovar, além de mantas, cobertas e arreios.

Animais debilitados não conseguirão perder a pelagem de inverno, o que levará a uma maior quantidade de piolhos abrigados. Em animais que não são escovados a quantidade de piolhos se multiplicará muito rapidamente.

Diagnóstico

a) Sinais clínico-patológicos

Animais inquietos, com lesões de escoriação de pele, e que frequentemente se coçam e se esfregam sugerem a presença de piolhos. Ao se repartir o pelo se encontram os piolhos. No caso de *Haematopinus asini*, é grande e facilmente visível e, em dias quentes e ensolarados, vai até a superfície da pelagem.

Pode ocorrer debilidade e má aparência em decorrência da irritação que os malófagos causam aos hospedeiros. Animais com esses parasitos podem apresentar-se inquietos, sem se alimentar e repousar adequadamente.

b) Diagnóstico laboratorial

O *Haematopinus asini* é grande, castanho-amarelado, de fácil visualização. *Damalinia equi* aparece como pequenas pintas amareladas na pelagem, e os ovos, pequenos e pálidos, facilmente são encontrados, espalhados por toda a pelagem. Os espécimes devem ser submetidos a chaves dicotômicas para identificação.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os exemplares podem ser enviados ao laboratório vivos, em frascos com pequenos orifícios para respiração ou preservados em etanol 70°GL, ou formol 3%^[2].

Referências bibliográficas

1. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Icone, 2004. 607p.
2. MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. 432p.
3. SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos**. 7. ed. México: Interamericana, 1987. 823p.
4. URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

3.9 Sarna

Conceito

A sarna é uma condição nosológica parasitária causada por pequenos ácaros parasitas que, com poucas exceções, ficam em prolongado contato com a pele do hospedeiro, causando variados graus de inflamação e lesões dermatológicas.

A sarna em equinos é causada por diferentes ácaros, que serão descritos separadamente, cada um com suas características.

• Demodicose equina

Doença causada por um ácaro pertencente à classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Trombidiformes, família Demodicidae, gênero *Demodex*, espécie *Demodex equi* (gr. *de*mas, corpo; *dexis*, picada)^[1].

Características morfológicas: são os ácaros causadores da “sarna do folículo piloso”, “sarna folicular” ou “sarna demodélica”. São ácaros pequenos, medem entre 0,1 e 0,4mm de comprimento, têm idiosoma de aspecto vermiforme, com cutícula do podossoma lisa e a do opistossoma estriada transversalmente, conferindo um aspecto anelado. Os quatro pares de patas são muito curtos e telescópicos, as quelíceras são estileiformes e muito curtas, a abertura genital do macho é dorsal na linha de transição entre o propodossoma e o metapodossoma, e na fêmea é ventral na linha de transição entre o podossoma e o opistossoma^[3].

O gênero *Demodex* é descrito como tendo uma única espécie com variedades que parasitam o homem e vários outros mamíferos, ou simplesmente com as espécies designadas de acordo com o hospedeiro que parasitam, como *Demodex equi*^[1].

Ciclo biológico: conta com as fases de ovo; larva (hexápoda), na qual as patas são representadas por pequeninas protuberâncias; dois estádios ninfais octópodes e adultos^[1].

• **Sarna sarcóptica**

Causada por um ácaro pertencente à classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Sarcoptiformes, família Sarcoptidae, gênero *Sarcoptes*, espécie *Sarcoptes scabiei* (gr. *sarkos*, carne; *kopto*, cortar), variedade *Sarcoptes scabiei* var. *equi*^[1].

São os ácaros ditos escavadores, pois escavam galerias na pele, intradérmicas, na qual penetram profundamente provocando um espessamento da pele, sem formação de crostas. Têm corpo globoso, rostro curto e largo, patas curtas e grossas, sendo as posteriores encaixadas total ou parcialmente no idiossoma (parte final do corpo). Os machos não têm ventosas copuladoras adanais.

Características morfológicas: de 0,2 a 0,5mm, gnatossoma cônico, tão longo quanto largo, corpo estriado com áreas escamosas e espinhos curtos e grossos na face dorsal. Machos com ventosas nas patas I, II, e IV. Fêmeas com ventosas nas patas I e II. Ânus terminal. Pedicelo longo e simples e corpo globoso^[2].

Ciclo biológico: apresentam as fases de ovo, larva, duas fases de ninfa, macho, fêmea imatura e fêmea adulta ou ovígera. A transformação da fêmea imatura em adulta ocorre após a fertilização. A fêmea fertilizada escava galerias na epiderme, onde se nutre de linfa. À medida que escava seu túnel, vai efetuando a postura dos ovos. Esses vão surgindo com 2 a 3 dias de intervalo e se sucedem durante 2 meses, ficando para trás os mais velhos. A fêmea gasta cerca de meia hora para atravessar a camada córnea da pele. O trajeto das galerias pode ser reconhecido pelo aspecto irritativo e pelas excreções enegrecidas que a fêmea vai deixando. As larvas eclodem em cerca de 5 dias, hexápodes, e passam para a superfície da pele onde procuram alimento, abrigo e passam por uma ecdisse, surgindo as ninfas, octópodes. Após nova muda de pele, surgem os machos e as fêmeas imaturas, quando aqueles procuram estas para a fertilização. Passados alguns dias, a fêmea imatura, já fertilizada, passa por nova ecdisse resultando em uma fêmea adulta, que procura penetrar na pele recomeçando o ciclo, que se completa em 10 a 14 dias^[2].

• **Sarna psoróptica**

Causada por um ácaro pertencente à classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Sarcoptiformes, família Psoroptidae, gênero *Psoroptes*, espécie *Psoroptes equi* (gr. *psora*, sarna; *kopta*, cortar)^[1].

São os ácaros ditos não escavadores, superficiais, que produzem formação de crostas espessas. Têm corpo ovoide, face dorsal sem espinhos, rostro longo e cônico, patas longas e espessas. Os machos têm duas ventosas (copuladoras), e o quarto par de patas nos machos é bem reduzido, menor que o terceiro^[2].

Características morfológicas: cerca de 0,5 a 0,8mm, com gnatossoma mais longo que largo. Suas patas são grossas e longas e terminam em longos pedicelos trisegmentados. Os machos têm ventosas nas patas I, II e III, e as fêmeas têm ventosas nas patas I, II e IV. O ânus é terminal^[2].

Ciclo biológico: caracteriza-se por serem sarnas não penetrantes, superficiais, em que o ácaro não produz galerias dentro da pele do hospedeiro; alastrase, de preferência, nas regiões do corpo do animal dotadas de pelos. Apresenta as mesmas fases evolutivas em seu ciclo que *Sarcoptes scabiei*, no entanto, não produz galerias no interior da pele. Esses ácaros picam a pele causando irritação, descamação e exsudação de soro. Vivem e se multiplicam sob a descamação provocada e sua contínua atividade provoca o agravamento da lesão^[2].

- **Sarna corióptica**

Causada por um ácaro pertencente à classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Sarcoptiformes, família Psoroptidae, gênero *Chorioptes*, espécie *Chorioptes equi* (gr. *chorion*, pele; *kopto*, cortar)^[1].

Características morfológicas: cerca de 0,3 a 0,6mm, com gnatossoma tão longo quanto largo. Machos com ventosas nas patas I, II, III e IV. Fêmeas com ventosas nas patas I, II e IV. Pediocelos curtos e simples, sem segmentação. Peças bucais arredondadas. Machos com tubérculos abdominais^[2].

Ciclo biológico: igual ao do *Psoroptes equi*.

Diagnóstico

Os ácaros de sarna são pesquisados em material procedente de raspagem de pele. As raspagens devem ser bem profundas e realizadas em diversas partes do corpo, em especial na margem das lesões de aparência recente.

a) **Características clínico-patológicas**

- **Demodicose:** em equinos a sarna demodélica é muito rara, porém pode ocorrer nas formas escamosa ou pustular, acometendo principalmente o focinho, a fronte e a área periocular^[4]. Pode ocorrer, também, regiões com lesões de alopecia, principalmente na região cervical e no peito^[3].

- **Sarna sarcóptica:** as primeiras lesões visíveis ocorrem na cernelha e em torno da cabeça, porém pode começar no peito ou nos flancos. O prurido intenso faz com que os animais se esfreguem fortemente contra obstáculos. A atividade intensa e a presença dos ácaros causam forte irritação. As lesões podem ser semelhantes às do cão, nos quais as áreas afetadas apresentam pelos eretos e sua queda. Nos equídeos a sarna sarcóptica pode ter curso rápido ou não, e seu contágio pode ser feito por contato direto entre os animais ou por fômites usados indiscriminadamente entre os animais^[3].

- **Sarna psoróptica:** os sinais clínicos são avaliados pela intensa coceira, associada à intensa descamação de pele, no início, junto à área da cabeça, associada à síndrome de “balanço da cabeça”.

- **Sarna corióptica:** determina uma parasitose semelhante àquela causada por *Psoroptes*, mas as lesões estão geralmente confinadas às partes inferiores das patas, notadamente do boleto, sendo, por isso, também denominada sarna das patas dos cavalos. Embora os ácaros sejam ativos apenas superficialmente, seu movimento provoca irritação e inquietação, especialmente à noite, quando os animais estão estabulados, podendo ocorrer pequenos traumatismos na região do boleto em função dos coices nas paredes^[2].

b) **Diagnóstico laboratorial**

O material deve ser tratado pelo lactofenol ou potassa a 10% e ligeiramente aquecido para ser examinado ao microscópio^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A coleta de material deve ser realizada por profissional habilitado. Fazer, nos locais das lesões, raspado de pele profundo com lâmina de bisturi, passar o material raspado para uma lâmina, cobrir com lamínula e, depois, usar fita autocolante. Finalmente, enviar para o laboratório o mais breve possível para que se proceda à identificação do ácaro.

Referências bibliográficas

1. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Icone, 2004. 607p.
2. MONTEIRO, S.G. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2007. 271p.
3. SERRA-FREIRE, N.M.; MELLO R.P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2006. 200p.
4. URQUHART, G.M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1998. 273p.

3.10 Gasterofilose

Conceito

A gasterofilose envolve uma série de condições estressantes para o animal. As moscas adultas são grandes e causam muito aborrecimento aos equinos ao aproximarem-se para pôr seus ovos. Além disso, as larvas na cavidade bucal podem causar estomatite, e no estômago podem causar úlceras. Há ocorrência de irritação e prolapsos retais pela fixação delas. As larvas dessas moscas desenvolvem-se no estômago e no intestino de equinos e, ocasionalmente, do homem, de cães e de coelhos^[1].

Moscas de tamanho médio, semelhantes a abelhas, tanto pelo aspecto como pelo zumbido, de cor escura, peças bucais atrofiadas, arista nua, vibrissas ausentes, célula apical aberta, calípteras reduzidas, tórax piloso. No gênero *Gasterophilus* a fêmea tem ovopositor alongado. A fase larval parasita o trato digestivo dos equinos^[2].

Etiologia e epidemiologia

A mosca pertence à família Gasterophilidae, gênero, *Gasterophilus* (gr. *gaster*, estômago; *philos*, amigo) e persegue os equinos em épocas de calor. As formas larvais causam úlceras de bordos elevados no estômago deles. As espécies mais comuns são: *Gasterophilus nasalis* (*G. veterinus*), *G. intestinalis*, *G. haemorrhoidalis*. São espécies de distribuição mundial; *G. pecorum*, de distribuição na Europa, África e Ásia; as duas espécies menos importantes são: *G. inermis*, norte da Europa, norte da Ásia, África do Norte e ao sul de Zululândia na África do Sul, e *G. nigricornis*, Espanha, Oriente Médio, sul da Rússia e China^[2,4,5].

A mosca adulta mede cerca de 8 a 18mm, possui o corpo recoberto por pelos sedosos e amarelos e lembra uma abelha, porém esta tem dois pares de asas. As larvas marrom-avermelhadas com forma de barril, de aproximadamente 1,5cm de largura, grandes com ganchos orais em forma de foice, corpo segmentado coberto por espinhos, uma fileira no caso de *G. nasalis* e duas no caso das outras espécies, estigmas com aberturas cheias de trabéculas, se desenvolvem no pseudoútero da fêmea. Localizam-se preferencialmente no estômago e no duodeno. *G. nasalis* e *G. haemorrhoidalis* realizam oviposição nos pelos da região da ganacha, enquanto *G. intestinalis* prefere pelos dos membros anteriores^[2,3,5].

Durante os meses mais quentes as fêmeas adultas depositam os ovos, muito resistentes e providos de uma cola especial, na pelagem do cavalo. Quando este lambe as regiões infestadas, as larvas de primeiro estádio penetram na mucosa, dentro da boca do cavalo. Para abandonar o ovo, a larva necessita de um estímulo térmico de umidade e fricção, e esse estímulo é dado pela lambida do cavalo. Após a ecdisse, as larvas de segundo estádio migram para sua localização definitiva, o estômago, onde se desenvolvem as larvas de terceiro estádio. Elas podem permanecer no estômago de 8 a 10 meses. As larvas de terceiro estádio são eliminadas finalmente com as fezes no começo da estação quente^[2,5].

A pupação ocorre no solo, onde se enterra para fugir da predação. A fase de pupa dura de três a quatro semanas, quando emergem as moscas adultas que logo em seguida começam o processo de oviposição^[2,5]. As moscas adultas não têm aparelho bucal, por isso sobrevivem sem se alimentar por aproximadamente três semanas. Nesse tempo, colocam os ovos.

A patogenia se manifesta pelas larvas de primeiro estádio, que saem dos ovos, depositados principalmente na região de membros anteriores, cerviz e ganachas, e que, pelo ato de lamber-se, o cavalo ingere. Isso pode causar inflamação de mucosa na região oral. Na língua podem permanecer por três a quatro semanas, podendo ocorrer edemaciação dela e do palato mole, levando à dificuldade de mastigar e deglutir. Após sua maturação, as larvas migram para sua localização definitiva, o estômago^[2,5].

No segundo e terceiro estádios, com ajuda de seus ganchos bucais, penetram profundamente na mucosa gástrica, o que pode acarretar gastrite crônica e ulcerações de bordos elevados. Pode ocorrer perfuração estomacal seguida de peritonite^[2,5].

Os cavalos ficam inquietos com o som do voo da mosca adulta, que é insistente e os persegue para fazer a postura dos ovos. Esses movimentos provocam correria e pânico, podendo resultar em lesões e fraturas^[2]. O animal se estressa tentando espantar a mosca, faz movimentos de defesa e pode até vocalizar.

Diagnóstico

Pode ser realizado por endoscopia, porém é um procedimento difícil, pois não se dispõe de medidas habituais seguras para se diagnosticar gasterofilose. Deve-se pesquisar a presença de ovos na pelagem dos animais e de larvas nas fezes.

a) Sinais clínico-patológicos

Os animais podem apresentar cólicas, alterações no apetite, diarreia e prolapso retal, já que *G. haemorroidalis*, antes de ser eliminado, se fixa no plexo hemorroidário. Isso pode levar ao apagamento de tétano, já que as fezes dos equinos são ricas em *Clostridium tetani* devido ao fato de o cavalo apreender o alimento bem rente ao solo, trazendo terra junto com esporos. Também, pode ocorrer anemia pela perda de sangue em função de lesões de vasos sanguíneos, além disso, a fixação pelas larvas na mucosa pode ocasionar hiperemia, gastrite, ulcerações, perfuração e peritonite, em casos mais graves obstrução do piloro e ruptura de estômago^[1,3].

Em potros pode ocorrer atraso no desenvolvimento e crescimento, perda do rendimento, comprometimento da resistência e também mortalidade.

b) Diagnóstico laboratorial

Nas épocas de verão e outono, ovos depositados na pelagem dos animais é sinal de futura infestação por gasterófilos. Pode-se suspeitar quando da constatação de ovos nos pelos do hospedeiro. Apesar de raras, deve-se incluir a pesquisa de larvas nas fezes.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser enviado é amostra de fezes frescas, de preferência colhidas do reto.

Referências bibliográficas

1. CORRÊA, O. **Doenças parasitárias dos animais domésticos**. 4 ed. Porto Alegre: Sulina, 1983.
2. FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Icone, 2004. 607p.

3. MONTEIRO, S.G. **Parasitología Veterinária**. 2. ed., Santa Maria: UFSM, 2007. 271p.
4. SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias: en los animales domésticos**. 7. ed., México: Interamericana, 1987. 823p.
5. URQUHART, G.M. et al. **Parasitología Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan, 1998. 273p.

CAPÍTULO 10

DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS CANINOS

Débora Cristina Olsson

Renata Dezengrini Slhessarenko

INTRODUÇÃO

A espécie canina foi a primeira a ser domesticada. Nenhuma outra espécie animal ocupa tantos e diversos papéis na sociedade humana, sendo inestimáveis os benefícios dessa convivência para a melhoria das condições fisiológicas, sociais e emocionais. Entretanto, por estarem envolvidos involuntariamente na transmissão de diversas zoonoses e se constituir em uma importante fonte de infecção por parasitas, bactérias, fungos e vírus, a manifestação de todos os benefícios dessa convivência pode ser perdida se a saúde desses animais não for objeto de maiores cuidados.

A medicina veterinária diagnóstica, bem como todas as áreas da veterinária, está em crescente evolução. É dever do médico veterinário acompanhar esse crescimento e aplicá-lo em sua profissão, possibilitando, assim, o aumento da incidência do diagnóstico correto, obtido com técnicas que favoreçam a acurácia do tratamento instituído. A contribuição do laboratório ao diagnóstico clínico é imensa, desde a hematologia, bioquímica, imunologia, virologia, até as provas de rotina, entre outros.

A cada dia, novos exames e novas técnicas de alta sensibilidade vão sendo desenvolvidos, padronizados, solicitados e acrescentados aos recursos auxiliares do diagnóstico clínico. Às vantagens, além das já anteriormente citadas, soma-se uma maior sobrevida animal. Além de saber quando utilizar os recursos diagnósticos, o importante é obter informações de suas indicações e limitações. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial pode exercer seu papel com excelência, agindo como parceiro do médico veterinário na solução dos diferentes casos que surgem na prática diária da clínica de pequenos animais.

Para auxiliar os clínicos no diagnóstico das principais doenças infecciosas que podem acometer os cães, o texto trata dos aspectos básicos da obtenção do histórico e da suspeita do agente infeccioso e, subsequentemente, das técnicas laboratoriais e de outros testes investigativos, direcionando o envio de material ao laboratório. Esperamos que esta seja uma contribuição útil aos estudantes e clínicos veterinários.

1. PRINCIPAIS DOENÇAS BACTERIANAS DOS CÃES

1.1 Brucelose

Conceito

Os cães de companhia apresentam atualmente uma inserção muito grande na sociedade, o que gera uma preocupação em relação à sanidade desses animais^[10]. Nesse contexto, atenção deve ser dada à brucelose canina, que é uma zoonose prevalente no Brasil, de caráter crônico em cães, em canídeos silvestres e no homem, apresentando distribuição mundial^[1]. Esta doença é responsável por quadros patogênicos nos aparelhos reprodutor e sistêmico em cães^[9].

Etiologia e Patogênese

A brucelose canina tem como etiologia a *Brucella canis*, um cocobacilo aeróbico Gram-negativo que forma colônias rugosas^[9], porém os cães são susceptíveis também à infecção por *Brucella abortus* e *Brucella suis*^[4]. No Brasil, estudos sorológicos em cães demonstraram frequência de infecção por *Brucella canis* entre 0,84% e 58,3%^[4,9]. A infecção ocorre pela penetração nas membranas mucosas oronasal, conjuntival e genital, sendo caracterizada por bacteremia associada à leucocitose prolongada, que pode persistir por até 64 meses^[5]. Os microrganismos do gênero *Brucella* localizam-se com maior frequência nos sistemas linfoide e fagocítico mononuclear, na próstata, nos testículos e no útero gravídico^[11].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A prevalência da infecção varia de acordo com idade, condições de vida, raça e distribuição geográfica. Suspeita-se de brucelose em qualquer cadela que abortar duas semanas antes do parto^[7]. O agente é excretado principalmente por sêmen, secreções vaginais e urina. A enfermidade é transmitida por via venérea entre os cães, ocorrendo também por via oral em consequência da ingestão de fetos abortados, restos placentários e contatos com utensílios contaminados com o agente^[8]. O ser humano pode infectar-se por contato com animais infectados ou com suas excreções e secreções. Como sintomas, apresenta febre, enfartamento ganglionar, dor articular, perda de peso e, eventualmente, têm-se observado quadros mais severos da enfermidade^[1].

b) Sinais clínicos

A vigilância deve ser realizada por todos os clínicos de pequenos animais e proprietários de cães e canis para impedir que a doença se propague entre os canídeos. Todos os animais destinados à reprodução devem ser livres da doença com o objetivo de evitar sua disseminação, e todas as suspeitas de brucelose canina devem ser confirmadas para que se possa controlar a doença^[1]. Deve-se ressaltar que a terapia de cães com brucelose deve ser avaliada de forma rigorosa pelo médico veterinário e indicada somente em condições específicas^[6].

O diagnóstico clínico da infecção por *B. canis* apresenta várias dificuldades. Nos primeiros estágios, os animais infectados podem não apresentar sinais clínicos da doença ou esses podem não ser claramente identificados.

Os sinais clínicos mais evidentes no macho são epididimite e prostatite. Em função da dor causada pela epididimite, os animais lambem com frequência o escroto, desenvolvendo uma dermatite escrotal, que pode vir a ser contaminada por *Staphylococcus aureus*^[6]. A orquite não é frequente na infecção por *B. canis*^[1]. Com o progresso da doença, pode ocorrer atrofia testicular e, ocasionalmente, esterilidade. Em cães infectados por mais de cinco semanas, ocorre decréscimo do volume seminal e ejaculação dolorosa^[11].

c) Patologia

Nos machos a infertilidade e achados físicos de inchaço escrotal, dermatite escrotal, aumento de volume do epidídimo e atrofia testicular são comuns, sendo apresentados para exame com maior frequência que as fêmeas. Nas fêmeas é observado o abortamento de fetos parcialmente “autolisados” entre 45 e 59 dias de gestação sem a apresentação prévia de quaisquer outros sinais clínicos. Descargas persistentes por uma a seis semanas após o abortamento e falha reprodutiva com morte uterina e reabsorção fetal podem ser observadas^[10]. Sinais não reprodutivos incluem esplenomegalia e linfadenomegalia difusa, poliartrite, osteomielite, sinais neurológicos, dermatite piogranulomatosa crônica e multifocal e lesões oculares, embora estas sejam pouco frequentes.

d) Diagnóstico laboratorial

O teste laboratorial de eleição para o diagnóstico de brucelose canina, por tratar-se de uma brucela rugosa, assim como *Brucella ovis*, é o teste de imunodifusão em gel de ágar (AGID). Outra metodologia é a cultura sanguínea baseada na bactеремia prolongada da brucelose. Aglutinações espermáticas estão presentes a partir de 12 semanas de infecção e ocorrem porque os animais desenvolvem uma resposta autoimune, produzindo anticorpos contra os espermatozoides^[6]. Essas lesões causadas pela *B. canis* no sistema reprodutivo dos machos fazem com que o prognóstico reprodutivo dos animais acometidos pela doença seja altamente desfavorável^[4]. Anormalidades do sémen são observadas cinco semanas após a infecção, e 80% dos casos constam de alterações na morfologia dos espermatozoides, com elevação dos leucócitos, aglutinação e aspermia nos estágios avançados da doença, acompanhada de atrofia testicular bilateral. Nas fêmeas, abortos no terço final de gestação, que podem apresentar prolongada descarga vaginal amarronzada, são sugestivos de infecção por *B. canis*. As fêmeas dão à luz filhotes fracos que podem morrer poucos dias após o parto^[11]. Em função das dificuldades e da baixa especificidade do diagnóstico clínico, a confirmação do diagnóstico de brucelose canina deve ser realizada por métodos laboratoriais^[1].

A sorologia é bastante empregada no diagnóstico da brucelose canina, e a primeira classe de anticorpos a aparecer após a infecção é a IgM, portanto, sua presença no soro indica infecção recente^[6]. Em seguida, aumentam os níveis séricos de IgG, que permanecem por longos períodos, principalmente em infecções crônicas^[7]. Como a brucelose canina é uma doença crônica, a principal imunoglobulina a ser detectada pelos testes diagnósticos é a IgG. A soroaglutinação rápida é o teste mais comumente utilizado na triagem das infecções por *B. canis*. O teste rápido de aglutinação em lâmina (ME-RSAT) é um teste de triagem no consultório para detectar anticorpos em animais suspeitos. Ele é rápido, sensível e de baixo custo, porém necessita de testes adicionais para confirmação do resultado^[3]. Apresenta muitas vantagens sobre os outros testes, incluindo a precisão no diagnóstico, pois já revela anticorpos a partir de três a quatro semanas da infecção^[2,3]. Esse teste possui precisão para descartar a infecção quando o resultado é negativo, porém os títulos de anticorpos falso-positivos são comuns, necessitando-se de confirmação dos casos positivos

por meio de outros testes^[6,11]. Cerca de 99% dos resultados negativos são negativos verdadeiros, enquanto somente metade a dois terços dos resultados positivos são confirmados como verdadeiramente infectados pelo teste rápido de aglutinação^[11]. Podem ser encontrados resultados falso-positivos na sorologia devido à presença de outras bactérias, que induzem imunidade e síntese de anticorpos com reação cruzada contra a *B. canis*^[11]. A hemólise (hemoglobina) também provoca resultados falso-positivos^[7]. Outros testes sorológicos utilizados no diagnóstico da brucelose canina incluem a imunofluorescência indireta e o ELISA.

A cultura de sangue total é o material de eleição na ausência de fetos abortados e de secreções vaginais. O cultivo bacteriano pode ser realizado em meio ágar sangue triptose ou caldo fosfato triptose. A bactéria é identificada de acordo com as características tintoriais, de cultivo e bioquímicas (uréase, catalase, oxidase, produção de H₂S, citrato, nitrato, gelatina e crescimento em meios contendo tionina e fucsina). Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) dos testículos afetados visando ao isolamento microbiano também pode ser realizada. O material colhido para citologia também pode ser submetido ao cultivo microbiológico em ágar sangue ovino (5%) desfibrinado, assim como material procedente de sangue, urina ou líquido prostático. A técnica de PCR pode ser utilizada para detectar o DNA da bactéria em amostras de tecidos e fluidos, apresentando resultados rápidos e precisos.

e) Diagnóstico diferencial

No diagnóstico diferencial deve-se levar em consideração: Febre de origem inespecífica, endocardite bacteriana, febre tifoide, aborto em cadelas por herpesvírus canino, epididimite em cães devido a outras etiopatogenias.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o exame sorológico (AGID) recomenda-se a colheita de 3 a 5ml sangue para remeter ao laboratório. A amostra pode ser conservada na geladeira, mas se o tempo transcorrido entre a colheita e processamento laboratorial for maior que 3 dias, o sangue deve passar por centrifugação para separar o soro que deve ser congelado até a realização do exame laboratorial.

A *B. canis* pode ser isolada de diversos tecidos e secreções, como sangue, linfonodos, baço, fígado, medula óssea, próstata, urina, sêmen, fetos abortados e secreções vaginais durante o estro, no pós-aborto e no pós-parto. Amostras desses materiais devem ser colhidas da forma mais asséptica possível e colocadas em meio de transporte que garantam a viabilidade do tecido. Os meios de transporte podem conter azul de metileno, um indicador de pH colorimétrico de estados de oxirredução e ainda meio modificado pela substituição do glicerofosfato por fosfatos inorgânicos e aumento do pH para 8,4, quando o material for processado em laboratório em poucas horas. Se o tempo de colheita for longo e o processamento laboratorial for demorado, é melhor que as amostras sejam congeladas a -20° até seu processamento^[3,4].

Referências bibliográficas

1. ALMEIDA, A.C. et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.
2. CARMICHAEL, L.E.; SHIN, S.J. Canine brucellosis: a diagnosticians's dilemma. **Seminarium Veterinary Medicine Surgery Small Animal**, v. 11, p. 161-165, 1996.
3. CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 248-257.

4. FERREIRA, T. et al. Brucelose canina: ocorrência em um canil comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 555-556, 2003.
5. GERMANO, P.M.L. et al. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campinas, SP, Brasil. **Revista da faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica Universidade de São Paulo**, v. 24, p. 27-34, 1987.
6. MEGID, J. et al., Brucelose canina: relato de caso. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 69, n. 4, p. 103-106, 2002.
7. MINAHARRO, S. et al. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3/4, p. 167-173, 2005.
8. MOLNAR, L. et al. Capacidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico de brucelose canina. **Hora Veterinária**, p. 45-49, 2001.
9. MORAES, C.C.G. et al. Prevalência de brucelose canina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 69, p. 7-10, 2002.
10. SANTOS, R.L. et al. Brucelose: zoonose e bioterrorismo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**. n. 47, p. 83-98, 2005.
11. WANKE, M.M. Canine brucellosis. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 195-207, 2004.

1.2 Campilobacteriose

Conceito

A campilobacteriose¹ é uma zoonose de distribuição mundial e muitos dos casos de enterite humana são associados ao contato com cães e à ingestão de água contaminada ou de alimentos de origem animal. Nos países onde ocorrem casos desta enfermidade, a diarreia é mais frequente nos meses do verão, com um elevado percentual de convalescentes que adquirem a infecção pelo consumo de carne de aves mal cozida^[6].

Etiologia e Patogênese

Os primeiros isolamentos da espécie do gênero *Campylobacter* foram realizados na área de microbiologia veterinária em 1909 e 1913^[2]. As espécies desse gênero agrupam bacilos Gram-negativos curvos, espiralados em forma de “S” que apresentam um flagelo único em ambos os extremos. Em cultivos por vários dias degeneram em formas esféricas ou ovoides e perdem sua viabilidade^[6]. Por apresentar maior frequência de isolamento dentro das espécies do gênero, a bactéria *Campylobacter jejuni* é identificada facilmente pela forma e por características das colônias, sendo chamadas de agentes “termotolerantes” por possuírem a capacidade de crescer a 42°C^[1]. Os agentes “termotolerantes” (*C. subsp. jejuni jejuni*, *C. coli* e *C. lari*) são agentes causadores de gastroenterite e diarreia grave em seres humanos^[5], prevalentes por serem comensais do trato gastrointestinal e possuírem como reservatórios naturais uma grande variedade de espécies de animais domésticos e selvagens^[4].

Diagnóstico

O diagnóstico é realizado pelo isolamento e pela identificação da bactéria através de Imunofluorescência Direta (IFD). Amostras de lavado prepucial e vaginal devem ser fixadas em lâmina com acetona e congeladas a -20°C.

¹ Nota do revisor: Termo ainda não incorporado ao Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa.

a) Epidemiologia

A infecção é predominante nos cinco primeiros anos de vida dos cães. O conhecimento da prevalência nas espécies, como também a individualização e identificação das cepas isoladas, provê informação epidêmica e permite relacionar as fontes de infecção e o modo de transmissão^[3]. Os cães possuem uma relação estreita com o ser humano e são descritos como uma fonte provável de infecção para o homem^[3,4]. Cães adultos criados em residências apresentam menor prevalência que cães de rua ou mantidos em canis e abrigos. A frequência de isolamento de *C. jejuni* em cães diarreicos é de 29%. A transmissão de *Campylobacter* spp. ocorre principalmente pela via fecal-oral, por meio de água e alimentos contaminados, como carne de aves e leite não pasteurizado. Carreadores assintomáticos podem excretar essa bactéria nas fezes por períodos prolongados e transmitir diretamente a outros animais ou contaminar fontes de água e alimentos.

b) Sinais clínicos

O *Campylobacter jejuni* é um enteropatógeno que eventualmente invade a circulação, causando infecção em diferentes órgãos. Esse microrganismo não possui fímbrias, porém os flagelos atuam como adesinas. O mecanismo da diarreia não está esclarecido completamente, porém não há dúvida de que a bactéria invade a mucosa intestinal, determinando ulceração e diarreia muco sanguinolenta^[8]. Entretanto, em alguns casos, a manifestação principal é diarreia aquosa, semelhante à causada por bactérias enterotoxigênicas, por produzir uma enterotoxina semelhante à enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*^[5,6]. Ocorre aumento dos níveis séricos de IgA, IgG e IgM, e as primeiras a aparecer são IgA e IgM (aproximadamente no sexto dia de infecção)^[2] e IgG aparece após 12 dias^[3]. Não se sabe se o aumento no título de anticorpos promove a eliminação desses microrganismos, mas há evidências de que pode impedir o aparecimento de manifestações clínicas em muitos animais portadores da bactéria^[7]. O microorganismo é sensível ao pH gástrico, porém se o cão deve ingerir um inóculo de 10^4 microrganismos, pode desenvolver sinais clínicos da infecção. O período de incubação é de 1 a 7 dias, e a bactéria atinge tanto o intestino delgado como o grosso.

c) Patologia

Muitas cepas podem invadir as células epiteliais, provocando infiltrados inflamatórios e abscessos nas criptas. O agente pode atravessar a mucosa intestinal e proliferar nos gânglios linfáticos^[4].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento é feito em ágar-sangue e a identificação do *Campylobacter jejuni* tem por base sua morfologia, suas características culturais e suas propriedades bioquímicas^[4]. Recentemente foi demonstrado que a espécie pode ser identificada por meio de aglutinação em lâmina, utilizando-se partículas de látex sensibilizadas com anticorpos contra os tipos sorológicos mais frequentes^[7]. Nas infecções intestinais por *Campylobacter* geralmente a cura é espontânea, entretanto, quando a terapêutica for indicada, utiliza-se a eritromicina. Porém, como existem amostras resistentes, é conveniente determinar a sensibilidade da amostra pelo antibiograma.

Os métodos de tipificação convencional são baseados nos testes bioquímicos, na resistência para vários agentes e na tolerância a diferentes temperaturas. Testes fenotípicos são usados para caracterizar as cepas isoladas^[6]. Os diferentes métodos usados em cada laboratório podem conduzir a resultados discrepantes^[3,4]. A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é um método sensível e prático que completa a identificação e classificação dos microrganismos. Pode-se realizar o diagnóstico pela detecção do microorganismo em exame direto

através de cultivo. Os métodos sorológicos para diagnóstico têm grande valor para a investigação. O exame das amostras diarreicas fecais pode ser realizado com o microscópio de campo escuro e por contraste de fase. Dentro de duas horas após a evacuação, pode-se conseguir um diagnóstico presuntivo rápido e observa-se a motilidade das espécies de *Campylobacter*, acompanhadas por eritrócitos e neutrófilos^[5]. Para o cultivo e isolamento a partir do material fecal se requer uma atmosfera microaerófila, meios de cultivos seletivos para inibir a replicação da flora que acompanha a amostra e ótima temperatura (42 a 42°C), mas também podem desenvolver-se em temperatura de 37°C e pH ótimo de crescimento (6,5 a 6,9)^[6].

e) Diagnóstico diferencial

Infecções que cursam com diarreia, como aquelas produzidas pelo parvovírus canino, vírus da cinomose, adenovírus canino tipo 1, coronavírus canino, rotavírus, pela *Salmonella* spp., *Giardia* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, dentre outros.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem ser colhidas amostras fecais diretamente da ampola fecal ou logo após a evacuação. Essas amostras devem ser enviadas ao laboratório em temperatura ambiente o mais rápido possível, pois o *Campylobacter* permanece viável somente por algumas horas, devendo ser cultivado em até seis horas após a colheita, ou refrigeradas a 4°C até a realização dos testes de identificação e caracterização bacteriana. Se for necessário transportar, as amostras fecais devem ser colocadas em meio ágar 0,12% (Cary Blair modificado). Alimentos sólidos, suspeitos de contaminação com o agente e de causarem a infecção, devem ser encaminhados congelados e os líquidos devem ser resfriados.

Referências bibliográficas

1. AL-BANNA, N.A. et al. Histopathological and ultrastructural studies of a mouse lung model of *Campylobacter jejuni* infection. **Journal Medical Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 210-217, 2008.
2. FERNANDEZ, H.R. et al. *Campylobacter* intestinal carriage among stray and pet dogs, **Rivista Saúde Pública**, v. 25, p. 473-475, 1991.
3. ARG, A.X. et al. Arthritis risk after acute bacterial gastroenteritis. **Rheumatologies**, v. 47, n. 2, p. 200-204. 2008.
4. GIACOBONI, G. et al. Identificación mediante biotipos y perfiles proteicos de *Campylobacter* aislados de perros. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 31, n. 2, p. 231-235, 1999.
5. HUBERT, P. et al. Comparison of six media including a semisolid agar for isolation of various *Campylobacters* species from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 1007-1010, 1991.
6. MACDONALD, P.D. et al. Knowledge and practice of foodborne disease clinical specimen testing and reporting in North Carolina, 2004. **North Carolina Medical Journal**, v. 68, n. 5, p. 305-311, 2007.
7. REID, A.N. et al. Identification of *Campylobacter jejuni* genes contributing to acid adaptation by transcriptional profiling and genome-wide mutagenesis. **Application Environment Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1598-1612. 2008.
8. YOKOYAMA, M. et al. Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. **Oral Microbiology Immunology**, v. 23, n. 1, p. 55-59, 2008.

1.3 Traqueobronquite infeccios (Tosse dos canis)

Conceito

A traqueobronquite infecciosa refere-se a um *pool* de doenças infecciosas altamente contagiosas do trato respiratório canino que causam traqueobronquite aguda. Trata-se de uma enfermidade que pode atingir cães de diferentes faixas etárias, dando origem a episódios de tosse^[8]. Em geral, quando esses agentes atuam separadamente, os sintomas são leves e de fácil recuperação; por outro lado, os sinais são mais graves quando os agentes estão associados^[5]. Embora os casos fatais sejam pouco frequentes, essa doença é contagiosa e representa um problema mundial para a saúde canina^[2]. Ocorre em locais onde cães suscetíveis convivem sem condições ideais de higiene. Por tratar-se de uma enfermidade contagiosa, disseminada por aerossóis, cães abrigados em grupos podem contrair a infecção facilmente. Por esse motivo, a doença foi chamada inicialmente de tosse dos canis^[2].

Etiologia e Patogênese

Os agentes etiológicos conhecidos e causadores do complexo são a *Bordetella bronchiseptica*, talvez a causa isolada mais importante da tosse dos canis, o vírus da parainfluenza canina (CPIV), o adenovírus canino do tipo 2 (CAdV-2), o herpesvírus canino, o reovírus canino, além de agentes como micoplasmas e ureaplasmas^[5]. O CPIV e o CAV-2 são considerados conjuntamente, visto estarem ambos associados apenas com infecções respiratórias em cães^[6]. Esses agentes também podem ser transmitidos de forma direta e por fômites contaminados (manipulação e alimentação)^[7].

Diagnóstico

O diagnóstico depende do isolamento e da identificação do vírus, ou da demonstração de título ascendente dos anticorpos contra vírus específico, em soros pareados. Os cães comprometidos imunologicamente ficam sensíveis à invasão bacteriana secundária do trato respiratório inferior e podem apresentar pneumonia e risco de vida^[8]. Na forma suave ou em casos não complicados da doença, o diagnóstico é baseado na história e no exame físico^[3].

a) Epidemiologia

A transmissão da traqueobronquite infecciosa ocorre por contato direto ou indireto com secreções oronasais de cães infectados, principalmente via aerossóis. A doença ocorre com maior frequência em locais de aglomeração de cães, como canis, abrigos, clínicas e hospitais veterinários, *pet shops*, praças e parques, sendo mais severa em cães jovens.

b) Sinais clínicos

O período de incubação é de 5 a 7 dias, podendo chegar a 10 dias^[6]. A tosse paroxística presente é acompanhada de engasgo ou movimentos de esforço de vômito que podem ser confundidos com vômito ou sufocamento^[7]. O volume da tosse pode ser alto pela presença de inchaço das cordas vocais e laringite. Quando o animal se exercita ou está agitado, a tosse surge e permanece até que ele se acalme. As mudanças de temperatura e umidade também favorecem o aparecimento da tosse. A tosse também é facilmente disparada quando existir um estímulo à palpação traqueal ou quando o pescoço do animal é puxado com uma coleira. Observam-se, ainda, espirros e descarga nasocular serosa e suave^[7]. Tipicamente, o cão continua a alimentar-se, permanece alerta e não apresenta mudanças de temperatura corporal, podendo apresentar-se prostrado. Quando a doença é severa, o cão apresenta inapetência, infecções mistas, principalmente em cães não vacinados.

provenientes de loja de animais ou abrigos, sendo a broncopneumonia bacteriana um fator complicante que determina o grau de severidade, determinando a ocorrência de tosse produtiva^[1,3]. Na forma severa o cão apresenta anorexia, depressão e febre, descarga nasocular e conjuntivite serosa ou mucopurulenta. A forma severa confunde-se com cinomose, sendo difícil de distinguir, e pode, algumas vezes, vir acompanhada de sintomas gastrointestinais e nervosos e ser fatal^[1].

A multiplicação dos agentes causadores da doença ocorre em todo o trato respiratório superior e inferior, causando infecção localizada sem que ocorra disseminação para outros sistemas do organismo. As infecções mistas são comuns e possuem um efeito sinérgico na produção da doença clínica. Individualmente, esses agentes infecciosos causam uma doença muito suave ou são albergados nas vias aéreas dos portadores assintomáticos^[9]. Os isolados mais frequentes são o CPIV e a *Bordetella bronchiseptica*, porém não é possível confirmar o diagnóstico etiológico de traqueobronquite induzida por vírus com base nos sinais clínicos^[4]. O alvo primário desses agentes é o epitélio das vias aéreas superiores^[10]. O resultado é uma lesão epitelial das vias aéreas superiores, com inflamação aguda e uma disfunção dos cílios das vias aéreas^[10,11].

A tosse é seca, aguda, curta e repetida por conta da traqueobronquite. O complexo da tosse dos canis é geralmente diagnosticado com evidências circunstanciais dos sinais clínicos e de uma história de exposição. A auscultação da laringe e da traqueia pode revelar áreas de estertores ou estridor. A auscultação dos campos pulmonares pode revelar crepitação e sibilos^[5]. Os hemogramas, as radiografias e as citologias das vias aéreas geralmente não são dignos de nota ou revelam achados inespecíficos^[6]. Na forma suave, geralmente o exame do hemograma não apresenta alterações ou pode observar estresse (neutrofilia adulta, linfopenia)^[9]. Na forma severa, encontra-se leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda em alguns casos. Na radiografia torácica, na forma branca da doença, observa-se uma elevação suave na densidade intersticial do pulmão. Já em formas severas da tosse dos canis, a densidade intersticial está alterada, revelando broncopneumonia^[5].

c) Patologia

Comumente se identifica mucosa da laringe e das cordas vocais hiperêmicas e frequentemente edematosas com presença de macrógrafos eritrofagocíticos, ao mesmo tempo que ao fundo do esfregaço se nota fluido proteináceo granular basofílico que caracteriza edema e fibrose no caso de inflamação crônica. Identifica-se infecção bacteriana primária da cavidade nasal pelo achado de alta população de bactérias monomorfas acompanhado de intensa resposta inflamatória supurativa com várias bactérias “fagocitadas” em casos agudos.

Diagnóstico laboratorial

O isolamento da *Bordetella* ou do *Mycoplasma* permite somente um diagnóstico presuntivo, pois muitos cães assintomáticos albergam esses microrganismos no trato respiratório. A secreção nasal pode ser unilateral ou bilateral com aspecto seroso, mucoso, catarral ou serossanguinolento, dependendo da causa primária. A colheita de suave nasal superficial ou profundo, embora seja um procedimento de fácil execução e relativamente não traumático, com frequência não fornece muita informação além da identificação de inflamação, infecção bacteriana secundária, hemorragia, necrose e muco, enquanto a enfermidade é subclínica^[6].

A avaliação citológica das vias aéreas é opcional nos casos suaves, podendo-se obter amostras por meio de um lavado transtraqueal ou de broncoscopia. Os achados incluem aumento de muco, exsudato mucopurulento e, algumas vezes, bactérias. A lavagem broncoalveolar é útil quando a lavagem transtraqueal falhar em estabelecer um diagnóstico. O líquido e as células colhidas refletem os processos de doença no interstício e nos alvéolos. A lavagem broncoalveolar está contraindicada em animais com distúrbios respiratórios graves.

Para exame pós-morte, deve-se enviar o lobo apical pulmonar afetado refrigerado em temperatura de até -4°C ou enviar uma lavagem broncoalveolar em 50ml de solução hipersaturada de cloreto de sódio até 4°C. Para citologia o material do suave ou lavado traqueal deve ser enviado ao laboratório em temperatura de até 4°C. Os métodos de lavagem nasal foram revisados por Smallwood & Zenoble^[3].

O diagnóstico definitivo pode ser obtido em 50% dos casos, a menos que se utilize um procedimento de lavagem mais invasivo e agressivo durante a obtenção da amostra para avaliação citológica. O fluido e as partículas devem ser colocados em um tubo contendo o anticoagulante EDTA. Caso a amostra apresente aspecto turvo, pode-se preparar um esfregaço direto para o exame citológico, colocando-se uma gota do fluido na lâmina de vidro e recobrindo-a com uma segunda lâmina. Caso haja pequenos fragmentos de tecidos, após a distribuição do fluido entre as lâminas aplica-se pequena pressão^[1]. Quando a amostra se apresentar relativamente clara, ela pode ser concentrada mediante centrifugação e o esfregaço preparado a partir do sedimento suspenso em pequeno volume do sobrenadante remanescente. Quando se obtêm grandes fragmentos de tecido, preparam-se impressões para a avaliação citológica. Uma pequena alíquota de fluido pode ser colocada em um tubo sem qualquer aditivo para a realização de cultura microbiológica e de testes de sensibilidade antimicrobiana, ou o fluido pode ser aplicado a um suave destinado à cultura^[1,2].

d) Diagnóstico diferencial

Doenças do sistema respiratório superior e inferior, doenças virais e bacterianas que acometem o sistema respiratório e traumatismos na traqueias.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exame laboratorial e diagnóstico deve-se optar, inicialmente, por culturas. Colhem-se secreções nasais com o auxílio de suaves ou lavados traqueais ou brônquicos para identificar a *Bordetella* e o *Mycoplasma* e armazenar a 4°C até o envio das amostras. Os suaves são amostras tão eficazes para a cultura quanto as amostras de tecidos das vias aéreas inferiores.

Para análise histopatológica de tecidos de cães necropsiados, podem-se selecionar áreas do cérebro, pulmão, estômago, bexiga, rim, nódulos linfáticos e fígado e colocá-los em frascos com formalina a 10% para o envio ao laboratório^[7,8].

Referências bibliográficas

1. ERLES, K. et al. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4524-4529, 2004.
2. GUEIRARD, P.; GUIZO, N. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4072-4078, 1993.
3. HEADLEY, S.A. et al. Canine distemper virus infection with secondary *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 741-743, 1999.
4. KEIL, D.J.; FENWICK, B. Bordetelosis respiratoria canina: Manteniéndose al día con un patógeno en evolución, **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**, v. 6, p. 201-206, 2000.
5. KEIL, D.J. et al. Cloning and immunologic characterization of a truncated *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin fusion protein. **Vaccine**, v. 18, p. 860-867, 1999.
6. KEIL, D.J.; FENWICK, B. Strain- and growth condition-dependent variability in outer membrane protein expression by *Bordetella bronchiseptica* isolates from dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 60, p. 1016-1021, 1999a.

7. KEIL, D.J.; FENWICK, B. Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and ribotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 41-51. 1999b.
8. KEIL, D.J.; FENWICK, B. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 212, p. 200-207, 1998.
9. LAZZARI, A.M. et al. Infectious agents isolated from *Chinchilla laniger*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 337-340, 2001
10. QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: WOLFE, 1994. 684p.
11. SMALLWOOD, C.J.; ZENOBLE, R.D. Biopsy and cytologic sampling of the respiratory tract. **Seminars in Veterinary Medicine; Surgery**, v. 8, p. 250-257, 1993.

1.4 Doença de Lyme

Conceito

A doença de Lyme, ou borreliose, é uma afecção multilissistêmica causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, uma bactéria Gram-negativa, transmitida principalmente por carrapatos aos animais e ao homem^[8]. A doença é descrita principalmente nos países da América do Norte, Europa e Ásia, sendo pouco relatada no Brasil, mas atualmente tem despertado a atenção na região serrana do estado do Rio de Janeiro^[10].

Etiologia e Patogênese

A borreliose tem como agentes *B. burgdorferi*, que ocorre na América do Norte e Europa, *B. garinii*^[1] e *B. afzelii*^[10], observadas na Europa e no Japão, *B. bissettii*, observada na Eslovênia, *B. japonica*^[12], relatada no Japão, e *B. lusitaniae* na América do Norte^[8]. Esses agentes e suas variantes antigênicas são responsáveis pelos diversos sinais clínicos da enfermidade^[9]. As espécies de *Borrelia* pertencem ao filo eubacteriano das espiroquetas^[11]. A *Borrelia burgdorferi* é fácil de isolar dos carrapatos, mas é difícil de isolar a partir dos animais clinicamente afetados. A membrana externa da espiroqueta pode sofrer variação antigênica durante o curso da infecção, o que pode limitar a eficiência de uma vacina^[10].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

No Brasil, estudos soroepidemiológicos de borrelioses foram realizados em humanos^[2] e em cães^[4]. A soroprevalência relatada em todos os estudos apresentou valores próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte^[6]. Essa doença acomete animais domésticos e silvestres, sendo associada à poliartrite nos cães, bovinos, equinos e humanos. A *Borrelia borgdorferi* não sobrevive no ambiente, sendo transmitida entre hospedeiros vertebrados por vetores hematófagos, como o carrapato *Ixodes dammini*. Outras espécies de carrapatos, incluindo *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis*, e de insetos como mutucas, moscas e mosquitos, podem transportar *Borrelia borgdorferi*, no entanto, só os carrapatos são ligados à transmissão da doença^[12].

A borreliose afeta comumente os cães de caça, mas estes se constituem em hospedeiros acidentais, sendo observada em países de clima temperado, principalmente em épocas mais frias do ano. Cães infectados não transmitem diretamente a infecção para humanos, sendo necessária a presença do vetor e alimentação em mais de um hospedeiro para ocorrer a transmissão. A do-

ença de Lyme é observada com maior frequência em ciclos silvestres, com a aquisição de carapatos por humanos ou animais domésticos em áreas florestais. Animais silvestres como o veado sustentam a população adulta do *Ixodes dammini*, mas não se acredita que se infectem pela espiroqueta^[8]. Os camundongos constituem os principais reservatórios da borreliose, pois mantêm o estágio larval e ninfal de *Ixodes dammini* e podem infectar-se pela espiroqueta^[10]. As aves podem constituir-se em reservatórios importantes, pois possuem a capacidade de carrear carapatos e espiroquetas a grandes distâncias^[7].

b) Sinais clínicos

A poliartrite é o sinal clínico mais comum descrito nos cães^[9]. A artrite é geralmente sub-clínica, mas pode ser séptica ou mediada pelo sistema imune devido à presença da espiroqueta na sinóvia ou no fluido sinovial. Os sinais sistêmicos incluem anorexia, perda de peso, letargia, linfadenopatia e pirexia^[10]. No entanto, o animal pode não demonstrar nenhum outro sinal sistêmico além de claudicação. A claudicação pode ser aguda ou crônica e progressiva^[11]. Pode haver sinais de dor considerável à palpação das articulações, sem nenhuma evidência de instabilidade articular. Podem ocorrer cardiopatias com bloqueio atrioventricular e alteração de ritmo cardíaco^[9]. Comprometimento neurológico tem sido reportado em infecções naturais e experimentais por *B. burgdorferi*; e quadro de meningite por *B. burgdorferi* em cães foi descrito na Europa^[5]. Anemia progressiva pode ocorrer pela característica hemolisante da borrélia, comprovada *in vitro*^[8].

c) Patologia

Pode tornar-se evidente o inchaço de uma ou mais articulações^[4]. Na microscopia observa-se inicialmente infiltrado polimorfonuclear, sendo substituído com a cronização da infecção por intenso infiltrado linfo-histiocitoplasmático, principalmente na cápsula articular.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de borreliose pode ser realizado em cães através de esfregaços sanguíneos periféricos, preferencialmente corados pelo Giemsa ou pelo método de Fontana. Entretanto, os agentes só são detectáveis em casos de presença massiva dessa espiroqueta (espiroquetemia)^[11]. Esfregaços também podem ser feitos a partir de fragmentos de tecidos do carapato, como intestino, glândula salivar e ainda hemolinfa, corados pelo Giemsa, método utilizado originalmente para a observação de *B. burgdorferi* e muito utilizado no estudo de *B. anserina* e *B. theileri* no carapato^[9]. A habilidade na observação microscópica é importante, dado o grande pleomorfismo das borrélias^[11,12]. Recuperação e isolamento podem ser feitos pela filtração em microfiltros de 0,20 a 0,45mm^[5]. O isolamento de borrélia tem sido realizado a partir de saliva, fragmentos de glândula salivar e intestino dos carrapatos *Ixodes*. O DNA bacteriano pode ser detectado em amostras por PCR.

A imuno-histoquímica é um método que apresenta excelentes resultados, pois permite a observação da borrélia, a caracterização microscópica da lesão, revelando marcações de抗ígenos do patógeno no tecido^[12]. A imunofluorescência é usada em tecidos de carrapatos para a observação de espiroquetas, entretanto esta técnica apresenta reação cruzada e inespecífica^[3]. A técnica ELISA de captura foi utilizada em tecidos do carapato *I. dammini* para a detecção de抗ígenos de *B. burgdorferi* com bons resultados, mesmo utilizando-se anticorpos policlonais^[3,9].

Para exames laboratoriais, os testes de anticorpos imunofluorescentes e os ensaios imuno-absorventes ligados à enzima (ELISA) constituem o teste diagnóstico mais preciso. Os títulos séricos < 128 são negativos, os de 128 a 256 são positivos fracos, e acima de 512 são altamente positivos. Em uma área endêmica, um título positivo pode constituir um achado acidental. A análise

do líquido articular quanto aos títulos pode ajudar a estabelecer um diagnóstico. O fluido articular dos cães com doença de Lyme também pode apresentar neutrofilia^[8,9].

e) Diagnóstico diferencial

Outras causas de artrite, doença reumatoide, glomerulonefrite e doenças causadas por espiroquetas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o exame laboratorial recomenda-se o envio de sangue periférico total (aproximadamente 2ml) em tubo sem anticoagulante para sorologia e outro com EDTA para esfregaços, à temperatura ambiente. Enviar em frasco estéril e armazenar a 4°C. Os carapatos podem ser enviados em frascos estéreis, devidamente fechados.

Referências bibliográficas

1. AZUMA, Y. et al. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. **Veterinary Record**, v. 134, p. 369-372, 1994.
2. LABARTHE, N. et al.. Serologic Prevelence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.
3. BARBOUR, A.G. et al. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. **Journal of Infectious Disease**, v. 173, p. 403-409, 1996.
4. BAUERFEIND, R. et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine form dogs by a nested polymerase chain reaction. **Zentralbl Bakteriologie**, v. 287, p. 347-61, 1998.
5. HOSKINS, J.D. Tick-borne zoonoses: Lyme disease, ehrlichiosis, and Rock Mountain spotted fever. **Small Animal**, v. 6, p. 236-243, 1991.
6. HOVIUS, K.E. et al. A serological study of cohorts of young dogs naturally exposed to *Ixodes ricinus* ticks, indicates seasonal reinfections to *Borrelia burgdorferi sensu latu*. **Veterinary Quarterly**, v. 21, p. 16-20, 1999.
7. JOPPERT, A.M. et al. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 251-255, 2001.
8. MERINO, F.J. et al. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borrelioses in the province of Soria. **European Journal of Epidemiology**, v. 16, p. 97-100, 2000.
9. O'DWYER, L.H. et al. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi latu sensu* associada à presença de carapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 201-201, 2004.
10. OLSON, P.E. et al. Canine as sentinels for Lyme disease in San Diego County, California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 126-129, 2000.
11. SOARES, C.O. et al. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, p. 111-114, 1999a.
12. SOARES, C.O. et al. Ensaio imunoenzimático indireto na detecção de anticorpos homólogos da classe IgG contra *Borrelia burgdorferi latu sensu* em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, p. 153-158, 1999b.

1.5 Leptospirose

Conceito

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que atinge várias espécies animais, e se constitui em um problema sanitário de grande importância, não somente pela gravidade de sua patogenia, mas também como elemento potencial de contágio ao ser humano^[1]. É transmitida ao homem através da urina de animais infectados, como roedores e cães, ocorrendo principalmente em agricultores, tratadores de animais, plantadores de arroz, cortadores de cana-de-açúcar, limpadores de esgotos, magarefes, mineiros, veterinários e laboratoristas^[9].

Etiologia e Patogênese

A leptospirose é causada por sorovares² da espécie *Leptospira interrogans*, uma espiroqueta móvel, filamentosa e flexível que infecta a maioria dos animais silvestres, domésticos e o homem^[12]. Os sorovares associados à leptospirose canina incluem *Lepstospira icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. Grippotyphosa*, *L. pomona* e *L. australis*^[5].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

As leptospiras patogênicas são habitantes do tecido renal de mamíferos e outros animais, nos quais não causam infecção sintomática^[7]. Entretanto, essas leptospiras, de acordo com a virulência e patogenicidade, podem causar infecção e doença em outros mamíferos, incluindo o cão e o homem, que se constituem hospedeiros acidentais^[8]. Essa bactéria é transmitida tanto por contato direto como indireto com urina de animais infectados, pela via venérea ou transplacentária, mordidas ou ingestão de tecido infectado. No ambiente, as leptospiras sobrevivem bem em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos e estábulos com excesso de detritos e umidade. Multiplicam-se em pH 7,2 a 7,4 e em temperaturas de 10 a 34°C. São muito sensíveis ao pH ácido da urina não dissolvida (5 a 5,5) e à dessecção. Os hospedeiros naturais ou acidentais adquirem infecção por entrar em contato com os agentes no meio ambiente. A convivência entre os cães errantes ou cães mantidos em grupos em abrigos propicia a manutenção e a transmissão de leptospira^[5].

b) Sinais clínicos

A leptospirose causada pelo sorovar *L. icterohaemorrhagiae* caracteriza-se pelo grave comprometimento hepático e renal. A evolução é aguda, principalmente nos cães mais jovens, culminando com o óbito em poucos dias. O sinal clínico mais evidente é a icterícia. Febre, mialgia, prostração, e com a evolução do processo o cão pode apresentar anuria, oliguria ou poliuria^[3]. As leptospiras alcançam o interstício renal, onde permanecem por longo tempo, causando nefrite intersticial crônica, com a eliminação das leptospiras para o meio ambiente. Como resultado final, instala-se a falência renal, meses ou anos mais tarde, podendo levar o animal a óbito^[13].

c) Patologia

A persistência de leptospiras no rim pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais até extensas lesões, caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal, seguido de cicatrização e localização de leptospiras na superfície luminal das células tubulares^[2].

² Nota do revisor: Termo ainda não incorporado ao Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da leptospirose é estabelecido por isolamento do agente por meio da hemocultura ou da urocultura. Entre as provas sorológicas, a soroaglutinação microscópica (MAT) é a técnica padrão, recomendada pelo Ministério da Saúde brasileiro, sendo a mais utilizada em todo o mundo^[4]. A sorologia pareada deve ser realizada com uma amostra de soro obtido na fase aguda e outra na fase de convalescência^[11]. A soroconversão entre a primeira e a segunda amostra de soro, colhidas em intervalo superior a 15 dias, indica infecção recente^[12]. Por exemplo, um título de anticorpos de 100 na fase aguda e de 800 na fase de convalescência, para o mesmo sorovar, indicam soroconversão. Na prática, por ser difícil a obtenção de amostras pareadas de soro, a presença de sinais compatíveis e um título elevado de anticorpos (por exemplo, 800) para o sorovar suspeito é altamente sugestivo de leptospirose. Embora títulos únicos nunca constituam um diagnóstico de infecção atual, são sugestivos títulos ≥ 300 e os títulos ≥ 1.000 são altamente indicativos de leptospirose^[6]. Para o diagnóstico da leptospirose canina é necessária a realização de exames laboratoriais, sendo o exame bacteriológico considerado definitivo^[4]. A visualização direta de leptospires em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospirúria^[10]. A prova de imunoperoxidase indireta, utilizando soro hipérime com anticorpos contra sorovares de leptospires, tem sido utilizada para o diagnóstico da leptospirose em órgãos de cães infectados^[7]. Provas laboratoriais, como o hemograma, dosagem dos valores séricos de ureia e creatinina e urinanálise, podem ser utilizadas como exames complementares, pois indicam as alterações funcionais nos diferentes órgãos acometidos, contribuindo, assim, para a avaliação clínica do animal^[10].

No Brasil, a maioria dos trabalhos publicados sobre leptospirose canina é baseada apenas em provas sorológicas^[8]. A prova de imunoperoxidase indireta que detecta leptospires coradas em castanho intenso na luz dos túbulos renais pode ser utilizada para o diagnóstico *post mortem*^[6]. Os resultados positivos obtidos no exame direto da urina, na cultura da urina e na prova de imunoperoxidase indireta confirmam a passagem e a permanência, com consequente multiplicação, do sorovar no parênquima renal^[5].

e) Diagnóstico diferencial

Deve-se fazer o diagnóstico diferencial para hepatite infecciosa canina, insuficiência renal aguda, cinomose, toxoplasmose, septicemia estreptocócica e intoxicações^[10].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de urina e sangue devem ser obtidas durante o exame clínico por cistocentese e punção venosa respectivamente. A amostra de sangue deve ser dividida em alíquotas, utilizadas para a realização do hemograma e análises bioquímicas – dosagem sérica de ureia, creatinina, colesterol, bilirrubina, fosfato, cálcio, magnésio, albumina, proteína total, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT)^[12]. Se ocorrer o óbito do animal, o exame histopatológico deverá ser realizado em fragmentos de pulmão, fígado e rim corados por hematoxilina e eosina (HE)^[13].

Referências bibliográficas

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p. 112-120, 425-449, 1986.

2. BISHARA, J. et al. Epidemiological and clinical features of leptospirosis in Israel. **European Journal of Clinical Microbiology; Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 50-52, 2002.
3. BOLIN, C.A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 3, n. 11, p. 166-171, 1996.
4. FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: Medisci, 1999, 272p.
5. FAVERO, A.C.M. et al. Sorovares de leptospiros predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.
6. FREITAS, J.C. et al. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.
7. JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 181-185, 2000.
8. MATHIAS, L.A. et al. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **Journal Wildlife Diseases**, v. 35, n. 1, p. 112-114, 1.
9. PEREIRA, H.C.P. **Prevalência sorológica da leptospirose humana entre trabalhadores de frigoríficos e matadouros com inspeção estadual do Município de Pelotas, RS**. 75p. Dissertação (Mestrado), FURG, Rio Grande, 1996.
10. QUERINO, A.M.V. Fatores de risco associados à leptospirose em cães no município de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.
11. ROCHA, T.A. A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. **Revue Scientifique et Technique**, v. 17, n. 3, p. 699-712, 1998.
12. SCANZIANI, E. et al. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. **Journal of Small Animal Practice**. v. 43, p. 154-157, 2002.
13. WARD, M.P. et al. Sorovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002), **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 12, p. 1958-1963, 200.

1.6 Tuberculose

Conceito

A tuberculose é uma importante causa de incapacitação e morte em muitos países. Para o ser humano, os fatores mais importantes no contágio são a carga do microrganismo expelido pela fonte de infecção e a proximidade de contato^[7]. Casos com baciloscopia positiva (visualizados pelo esfregaço) são altamente infecciosos, enquanto aqueles positivos somente em cultura são menos infectantes^[8]. Muitas espécies de mamíferos domésticos são sensíveis aos agentes da tuberculose.

Etiologia e Patogênese

O agente pertence à ordem Actinomycetales e ao gênero *Mycobacterium*. As espécies causadoras da tuberculose clássica foram agrupadas no “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” e são bacilos resistentes ao álcool-ácido, e quando corados pela fucsina a quente, não se descoram pelo ácido clorídrico (coloração de Ziehl-Neelsen). É moderadamente resistente ao calor, à dissecação e a diversos desinfetantes. Permanece viável em estábulos, pasto e esterco por até 2 anos, até 1 ano na água e por até 10 meses nos produtos de origem animal contaminados.

Agentes desinfetantes, como fenólicos, formólicos, álcool e em especial o hipoclorito de sódio, são bastante eficientes no combate ao bacilo. Entretanto, sua ação pode ser afetada pela concentração do produto, pelo tempo de exposição, pela temperatura e presença de matéria orgânica^[8]. Compostos de amônio quaternários e clohexidine não destroem o bacilo. O calor úmido a 60°C destrói o bacilo rapidamente. A pasteurização, consistindo no tratamento do leite a 62,8 até 65,6°C por 30min ou 71,7°C por 15 segundos mata, além das micobactérias, a maioria dos microorganismos não esporulados^[3,7]. É rapidamente destruído pela luz solar direta em ambiente seco. Em condições de umidade, temperatura e ao abrigo da luz solar, mantém-se viável por longos períodos, como até 2 anos no interior dos estábulos.

A transmissão natural é realizada de maneira direta ou indireta^[1]. A via de transmissão pode ser determinada, sobretudo, descobrindo, na investigação anatomo-patológica, a localização da lesão primária. O foco primário nos pulmões ocupa lugar de destaque na transmissão aerógena, desempenhando importante papel. Quando a infecção se dá pelo trato respiratório (aerossóis), o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos regionais^[6,7]. Porém, quando a infecção é pela via digestiva, a lesão se dá no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. No entanto, pode atingir praticamente todos os órgãos quando da generalização do processo^[1]. Os bacilos vão se alojar no tecido, promovendo uma reação inflamatória, caracterizada como uma pneumonia. A doença se instala basicamente nos pulmões, formando nódulos caseosos, de tamanhos variados, em muitos casos confluentes tomando todo o parênquima pulmonar e formando lesões cavitárias, com expectoração de material bacilífero^[9].

Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose em cães não é realizado com facilidade^[6]. Apesar de estarem associados à doença, debilidade, emagrecimento progressivo e caquexia não são sintomas observados na maioria dos animais^[3]. A prova de tuberculinação, principal arma de diagnóstico na espécie bovina, pode não ser eficiente em cães, apresentando resultados falso-positivos ou falso-negativos, dificultando o diagnóstico *ante mortem*^[5,6]. O isolamento do agente constitui-se no principal critério para o diagnóstico definitivo da tuberculose, sendo considerado como “padrão-ouro” pelo Ministério da Saúde^[1,2].

a) Epidemiologia

Os cães se infectam pela exposição maciça e repetida, ao coabitar com pacientes humanos ou ao consumir repetidas vezes produtos de origem animal contaminados, como leite não pasteurizado^[7]. A infecção por *Mycobacterium bovis* ocorre principalmente pela via digestiva, e por *M. tuberculosis* pela via aerógena. Aproximadamente 75% dos casos em cães são causados pelo *M. tuberculosis*, e somente 25% são devidos ao *M. bovis*^[1]. A importância do ser humano como fonte de infecção para os cães é um fato bastante conhecido, pois animais de comportamento amigável podem favorecer contatos íntimos e constantes. Apesar disso, a avaliação dos animais familiares não é considerada quando do atendimento de pessoas tuberculosas^[8].

b) Sinais clínicos

Para diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*, apreciam-se os sinais clínicos como anorexia e caquexia profunda, dor abdominal e hepatomegalia.

c) Patologia

Na necropsia, macroscopicamente, encontra-se esplenomegalia, hepatomegalia com inúmeros nódulos caseosos no fígado, pneumonia e hipertrofia dos linfonodos mediastínicos com

conteúdo caseoso. No exame histopatológico se observa granuloma pulmonar, hepático e linf nodal, com presença de bacilos resistentes a álcool-ácido (Ziehl-Neelsen)^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

Na análise bioquímica sanguínea, observa-se aumento da fosfatase alcalina e hipoglicemias constante não responsiva ao tratamento sintomático^[5]. O exame de ultrassom abdominal pode revelar presença de nódulos e cistos no fígado, e no exame radiológico de tórax frequentemente se evidenciam nódulos radiopacos em todos os lobos pulmonares. Se possível, realiza-se biópsia hepática que poderá revelar hepatite granulomatosa^[3]. A broncoscopia deve ser realizada para exame de baciloscopia (Ziehl-Neelsen). Nesta, se o cão apresentar o agente, os bacilos serão resistentes a álcool (BAAR) e o animal será considerado uma fonte de infecção em potencial. Apesar da grande prevalência da tuberculose em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, a notificação de tuberculose em cães é muito pouco observada na literatura internacional^[1].

O isolamento do *M. bovis* em cães já foi descrito em vários países^[1], inclusive no Brasil^[8]. Para diagnóstico de *M. bovis* em cães, emprega-se tuberculina PPD aviária e tuberculina PPD bovina, na concentração de 2500 UI e 5000 UI por dose respectivamente^[5]. As tuberculinas devem ser aplicadas via intradérmica na região cervical, tricotomizadas, sendo a primeira de localização anterior e a segunda cerca de 10 a 15cm em sentido caudal.

A leitura deve ser realizada 72 horas após a inoculação. Animais positivos apresentarão acentuada reação alérgica^[6]. Na necropsia se encontram linfonodos mesentéricos aumentados de volume (aproximadamente 6 x 5cm), com aspecto granuloso. O material deve ser inoculado nos meios de Löwenstein-Jensen e Stonebrink^[1] e incubado a 37°C em aerobiose por 60 dias, fazendo-se controle semanal para registrar a velocidade de crescimento, forma e coloração de colônias suspeitas de micobactérias^[3]. Colônias sugestivas de micobactérias apresentam bastonetes resistentes a álcool-ácido (BAAR) pela técnica de Ziehl-Neelsen. Observa-se crescimento de colônias brancas, pequenas, com bordas irregulares e superfície granular típicas de *M. bovis* a partir do 28º dia de incubação da amostra no meio Stonebrink^[4]. Com base nas características culturais e pelo perfil bioquímico é possível diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. *M. bovis* tem seu crescimento dificultado em meios que contenham glicerol, sendo essa uma característica importante para diferenciação entre os dois microrganismos^[2].

A descontaminação das amostras de fígado, pulmão e linfonodos pelo método de Petroff e o cultivo em meios de Stonebrink e Petragnani a 37°C proporcionam o crescimento de colônias acromógenas em quatro semanas, que serão positivas ao teste de niacina e negativas para nitrato e catalase, configurando-se como *Mycobacterium tuberculosis*^[6]. Ao exame microscópico dos cortes corados pela Hematoxilina-Eosina de pulmão, linfonodos mediastínicos, rins e intestino delgado observa-se formação granulomatosa^[1].

e) Diagnóstico diferencial

Inflamações linfocitárias e plasmocíticas de outras origens, sepses, microabscessos, herpesvírose, brucelose, colibacilose, silicose e outras infecções pulmonares.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material destinado ao exame bacteriológico deve ser constituído de fragmentos teciduais (linfonodo reativo ou lesão granulomatosa), que são mantidos refrigerados (4°C) para posterior exame bacteriológico. Para o exame histopatológico, as amostras de tecido devem ser fixadas em formalina 10%.

Referências bibliográficas

1. BIANCHINI, W.; RODRIGUES, E. Tuberculose em animais domésticos, **Publicações em Medicina Veterinária e Zootécnica**, v. 2, n. 2, 2008.
2. CAFFERY, J.P. Status of bovine tuberculosis eradication programs in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 1-4, 1994.
3. CALERO, J.R. Incremento de la tuberculosis y coinfección con el SIDA. **Anales De La Real Academia Nacional De Medicina**, v. 12, p. 21-42, 1995.
4. CHALMERS, J.W.T. et al. An outbreak of bovine tuberculosis in two herds in south west Scotland: veterinary and human public health response. **Journal Public Health Medicine**, v. 18, p. 54-8, 1996.
5. ESSEY, M.A.; KOLLER, M.A. Status of bovine tuberculosis in North America. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 15-22, 1994.
6. MEGID, J. et al. Tuberculose canina e sua importância na saúde pública. **Revista Saúde Pública**, v. 28, n. 4, 309-310, 1994.
7. MOTA, P.M.C. et al. Micobactérias atípicas isoladas de nódulos da esofagostomose bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 7-10, 1987.
8. MOTA, P.M.P.C. et al. Mycobacterium tuberculosis isolation in a dog. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, 2001.
9. ZAKI, M.H.; HIBBERD, M.E. The tuberculosis story: from Koch to the year 2000. **CADUEUS**, v. 12, 43-60, 1996.

1.7 Salmonelose

Conceito

A salmonelose é causada por bacilos Gram-negativos, não capsulados, que pertencem ao gênero *Salmonella*, da família Enterobacteriaceae.

Etiologia e Patogênese

O agente é classificado como um bastonete curto (2 a 4 μ m x 0,5 a 1 μ m). Frequentemente possui fímbrias e flagelos peritríquios^[1]. *Salmonella* spp normalmente é isolada das fezes dos cães sadios, mas o desenvolvimento dos sinais clínicos da salmonelose é incomum, indicando que o estado de portador assintomático prevalece^[4].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A salmonelose é transmitida pela via fecal-oral, através da ingestão de alimentos ou água contaminada. Os microrganismos podem sobreviver no ambiente por longos períodos, consequentemente podendo também ocorrer a transmissão por fômites. O desenvolvimento de sinais clínicos da infecção depende da infectividade da cepa, carga bacteriana do inóculo, competição com a flora estabelecida, idade e fatores de defesa do hospedeiro^[7]. Animais jovens são mais suscetíveis à salmonelose do que animais mais velhos, e as situações de confinamento em grupo com superlotação e falta de higiene, estresse de hospitalização e cirurgias, parto, parasitismo, transporte, excesso de exercício e doenças virais concorrentes são fatores predisponentes.

No Brasil, poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados demonstrando a prevalência de *Salmonella* spp em animais de companhia. Em sociedades mais carentes, os hábitos de higiene não são praticados por toda a comunidade^[1]. Frequentemente, os animais são alimentados com carne e vísceras cruas ou mal cozidos, podendo, assim, contrair o agente e contaminar o ambiente e as fontes de água^[4]. Nos últimos anos, tem-se percebido que a frequência de infecções por *Salmonella* spp tem aumentado tanto em humanos quanto em animais, merecendo um comentário especial no que diz respeito à transmissão zoonótica a partir do cão^[7].

Embora a via oral-fecal seja a mais importante forma de transmissão das salmonelas para os animais, o ciclo de infecção pode ser mais complexo em algumas populações de animais^[2]. A salmonelose geralmente começa com infecção entérica que pode generalizar após a entrada do microrganismo na circulação sanguínea^[5]. O animal pode desenvolver septicemia, meningite, artrite, pneumonia, aborto, ou uma combinação desses quadros. A administração de ampicilina nos doentes foi observada como um fator de aumento dos sinais clínicos, visto que a amostra de *S. Typhimurium* é resistente à ampicilina, permitindo o estabelecimento do clone resistente na mucosa intestinal. A doença pode ser uma complicação da quimioterapia em cães com linfossarcoma. Abortos e morte perinatal em *canis* têm sido atribuídos a *S. Panama*^[3].

b) Sinais clínicos

A salmonelose clínica é incomum em cães embora muitos sorovares possam ser carreados por animais aparentemente normais. Um surto causado pela *S. Typhimurium* associada a gastrenterites e septicemia com uma mortalidade de mais de 60% de cães jovens foi relatado em um hospital veterinário^[3]. Quando presentes, as manifestações clínicas da salmonelose podem ser classificadas em três síndromes: estado de portador subclínico, enterocolite e enterocolite com bacteremia^[6]. A salmonelose clínica é relativamente incomum, comparada com a prevalência do estado de portador subclínico.

A enterocolite caracteriza-se por diarreia aquosa ou mucoide (que contém sangue nos casos severos), vômito, tenesmo, febre, anorexia, letargia, dor abdominal e desidratação^[1]. A maioria dos animais recupera-se em três a quatro semanas embora a eliminação de microrganismos persista frequentemente por seis semanas ou mais^[6]. A *Salmonella* spp. causa diarreia crônica ou intermitente em alguns animais^[7]. A enterocolite raramente progredir para bacteremia ou endotoxemia potencialmente fatais, com sinais de choque endotóxico e coagulopatia intravascular disseminada (CID).

c) Patologia

Os achados macroscópicos são evidentes nos casos de enterocolite e enterite severa. O exame histopatológico, nos casos de enterite severa, apesar de não possibilitar o diagnóstico definitivo, revela neutropenia degenerativa nos casos graves com bacteremia e endotoxemia^[2].

d) Diagnóstico laboratorial

Salmonelas são aeróbicas, facultativamente anaeróbicas, podendo crescer em meios sem fatores de crescimento. Há inúmeros meios seletivos para o isolamento desses agentes a partir da inoculação direta das fezes ou do raspado intestinal. Os mais importantes são: o meio verde brilhante, o MacConkey, o ágar sulfito de bismuto (ASB), SS ágar, xilose-lisina, deoxicolato e hektoen^[4,5]. A maioria das salmonelas utiliza seletivamente o selenito de sódio e o tetratônato de sódio e, desse modo, pode-se recuperar um pequeno número de organismos em amostras contaminadas. A temperatura ótima para crescimento é de 37°C, mas a *Salmonella* também cresce a 43°C, característica frequentemente utilizada para reduzir o crescimento de contaminantes^[5].

Salmonelas produzem gás a partir da glicose, podendo utilizar o citrato como fonte de carbono. Reduzem o nitrato a nitritos, mas não produzem indol ou urease. São reagentes à lisina e à ornitina descarboxilase^[7]. Gás sulfídrico é produzido pela maioria dos sorovares. Lactose não é fermentada a menos que a cepa possua um plasmídio que codifique para a lactose, como a *S. arizona*. Algumas cepas de *S. arizona* fermentam a lactose lentamente, ao passo que outras são mais rápidas^[3]. Têm-se registrado surtos hospitalares com morbidade e mortalidade elevadas nos animais internados, com risco maior em animais com enfermidade severa, que sofrem cirurgia, internados por mais de 5 dias. A confirmação do diagnóstico depende do isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras fecais ou suabe retal durante exame clínico, apropriadamente cultivado, ou de culturas sanguíneas nos animais “bacterêmicos”. Esfregaços de fezes de cães, corados pelo Giemsa, geralmente contêm grande número de neutrófilos e polimorfonucleares, o que é útil no diagnóstico^[7]. O teste de imunoperoxidase tem sido aplicado no reconhecimento de *S. Typhimurium* nos tecidos.

A resposta imune mediada por anticorpos à infecção por *Salmonella* spp. pode ser medida pelo teste de aglutinação, teste da antiglobulina e ELISA^[5]. Títulos de anticorpos contra抗ígenos somáticos e flagelares podem ser mensurados. Muitos cães infectados não possuem títulos positivos, pois o soro foi colhido muito cedo ou a infecção não foi severa o suficiente para estimular uma resposta imune. Os anticorpos contra a *S. Typhimurium* no fluido intestinal de filhotes têm sido medidos por ELISA, que é uma técnica efetiva na mensuração de anticorpos para *S. Typhimurium*. As técnicas sorológicas de diagnóstico são mais valorizadas quando aplicadas na fase aguda^[2].

e) Diagnóstico diferencial

A salmonelose clínica deve ser diferenciada de outras infecções entéricas, como as parasitoses intestinais, parasitas unicelulares, como giardiose, doenças virais como parvovirose, coronavirose, cinomose, além de infecções bacterianas como as produzidas pelo *Clostridium perfringens*, por *E. coli* e outras, que cursam com diarreia.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras fecais ou suaves retais destinados ao exame bacteriológico podem ser colhidos durante o exame clínico e apropriadamente enviadas ao laboratório para cultivo, preferencialmente refrigerados. Outra possibilidade é realizar a cultura a partir de amostras sanguíneas, quando se suspeita de septicemia.

Referências bibliográficas

1. CORRÊA, W.M; CORRÊA, C.N.M. Paratípos em Geral. In: CORRÊA, W.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 1992, p. 163-174.
2. KWAGA, J.K.P. et al. Prevalence of *Salmonellae*, *Shigellae* and *Plesiomonas shigelloides* in dogs in Zaria, Nigeria. **Britanic Veterinary Journal**, v. 145, n. 2, p. 174-177, 1989.
3. MACIEL, B.M. et al. Occurrence of exotic *Salmonella* serovar in asymptomatic dogs in Ilheus City / BA - Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 247-253, 2004.
4. MEGID, J. et al. Salmonellosis in experimental dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 44-45, 2001.
5. MC VEY, D.S. et al. Immunogenicity of c4127phoP – *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in dogs. **Vaccine**, v. 20, p. 1618-1623, 2002.

6. TAVECHIO, A.T. et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman source in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1041-1044, 2002.
7. YOKOYAMA, E. et al. Occurrence of cross-infection of *Salmonella* sp.(1) serovar typhimurium in detained dogs. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 53, n. 5, p. 929- 930, 1991.

1.8 Erliquiose

Conceito

A erliquiose³ canina é uma doença infecciosa severa, que acomete cães (*Canis familiaris*), e recentemente foi confirmada como uma zoonose. Essa doença é causada por bactérias do gênero *Erlichia*, sendo a principal espécie a *Erlichia canis*. Essas bactérias formam agrupamentos intracelulares^[2]. Os sinônimos utilizados na literatura para este distúrbio incluem doença do cão rastreador, pancitopenia canina tropical, febre hemorrágica canina e tifo canino^[5]. Ela se distribui mundialmente e, devido a sua natureza crônica e insidiosa, a erliquiose é prevalente o ano inteiro em vez de somente nos meses quentes do ano^[3].

Etiologia e Patogênese

Atualmente o gênero *Ehrlichia* contempla cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*, todas classificadas na família Anaplasmataceae^[4]. Os agentes possuem cepa mononuclear (*Erlichia canis*), cepa neutrofílica (*Erlichia equi*) e cepa plaquetária (*Erlichia platys*), e também existem duas cepas novas ainda sem denominação no cão. São bactérias Gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórias, em células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear^[3,4]. A única espécie descrita no Brasil é *E. canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina^[3].

As doenças provocadas por riquetsias são mais comuns nos cães^[9]. Nos últimos anos, a erliquiose tem sido identificada como causa crescente de morbidade e mortalidade de caninos e, em alguns países, esse aumento tem relação direta com a maior exposição aos carapatos transmissores da doença^[1]. Como essas doenças são agudas nas áreas endêmicas, ocorre uma prevalência maior durante (ou após) o tempo quente, quando os carapatos se tornam mais prevalentes. Nas áreas não endêmicas, a erliquiose canina é geralmente crônica^[1,3].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Sua ocorrência vem aumentando significativamente nos últimos anos em todas as regiões do Brasil e está veiculado ao vetor, o “carapato canino marrom comum” (*Rhipicephalus sanguineus*), que pode transmitir os microrganismos por pelo menos 5 meses após o ingurgitamento e se encontra disseminado por áreas urbanas do Brasil^[7]. A erliquiose também pode ser transmitida pela via iatrogênica e por transfusões com sangue contaminado. O ciclo da *E. canis* inicia com a inoculação do agente no cão pelo carapato *R. sanguineus* no momento do repasto sanguíneo. A *E. canis* penetra nas células mononucleares sob a forma de corpúsculos elementares. O período de incubação da erliquiose é de 8 a 20 dias. Os carapatos ingerem o microrganismo a partir do hospedeiro infectado, transmitindo-o para outros cães susceptíveis^[9].

³ Nota do revisor: Termo ainda não incorporado ao Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa.

b) Sinais clínicos

A fase aguda da erliquiose é variável quanto à duração clínica (de duas a quatro semanas), e quanto à severidade (branda a severa)^[8,10]. Durante esta fase ocorre trombocitopenia (devida à destruição periférica de plaquetas), com ou sem anemia e leucopenia (ou leucocitose), comum durante esta fase, e ocorrem 10 a 20 dias após a infecção. Há também um aumento no número de plaquetas imaturas circulantes, que persiste por toda a doença na maioria dos animais. A trombocitopenia deve-se à diminuição da meia-vida das plaquetas, resultante de sua destruição, decorrente da estimulação do sistema imunológico, da cascata de coagulação e, em parte, devido à resposta inflamatória^[11].

Quando o cão sobrevive à fase aguda, instala-se a fase subclínica, que dura aproximadamente de seis a nove semanas. Os cães podem eliminar o microrganismo durante esta fase ou a infecção pode progredir para a fase crônica. Os sinais clínicos e os achados do exame físico resultam principalmente da hiperplasia disseminada do sistema fagocítico mononuclear e das anormalidades hematológicas.

Os títulos de anticorpos podem ser negativos durante esta fase, pois são necessárias até três semanas para a apresentação de títulos significativos no soro. As anormalidades hematológicas e bioquímicas incluem trombocitopenia, anemia suave a severa, leucopenia ou leucocitose, citologia da medula óssea hipercelular, hiperglobulinemia suave e elevação suave nas atividades das enzimas hepáticas^[2]. Na fase subclínica os pacientes ficam assintomáticos e podem ser identificadas alterações hematológicas e bioquímicas suaves. A fase crônica instala-se por causa da ineficiência do sistema imune do hospedeiro. Nesta fase ocorre uma anemia normocítica normocrômica arregenerativa (Tabela 1) devido à supressão da medula óssea ou da anemia da doença crônica^[5]. A contagem de reticulócitos e o índice reticulocitário classificam a anemia quanto à resposta da medula^[6]. Na fase crônica os sinais clínicos podem ser suaves ou severos, e desenvolvem-se até quatro meses após a inoculação do microrganismo. Pode-se observar pirexia, perda de peso, sangramento espontâneo, palidez devido à anemia linfadenopática generalizada, hepatoesplenomegalia, uveíte anterior ou posterior, sinais neurológicos causados por meningoencefalite e edema de membros intermitentes^[1].

c) Patologia

Durante a fase aguda da doença, o microrganismo replica-se nas células mononucleares da circulação, principalmente no sistema fagocítico mononuclear nos linfonodos, e dissemina-se para órgãos como baço, fígado e medula óssea, resultando em hiperplasia dessa linhagem celular e organomegalia (linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia)^[10].

Na fase crônica pode-se observar linfadenopatia generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia, dispneia ou intolerância a exercícios por conta de pneumonite, sinais neurológicos causados por meningoencefalite e petéquias e equimoses, pela presença de trombocitopenia e disfunção da agregação das plaquetas^[8]. Já na forma subclínica, a principal característica é a hipoplásia de medula óssea, resultando em anemia anaplásica, assim como monocitose, linfocitose e leucopenia^[2,10].

d) Diagnóstico laboratorial

Esfregaços sanguíneos podem ser utilizados para a pesquisa de hematozoários, contagem de hemácias, reticulócitos, plaquetas, determinação da concentração de hemoglobina, fibrinogênio plasmático, bem como da contagem total e diferencial de leucócitos. As anormalidades hematológicas e bioquímicas incluem monocitopenia, bicitopenia ou pancitopenia por conta da hipoplásia de medula óssea. Linfocitose ocasionalmente composta de grandes linfócitos granulares, hiperglobulinemia causada por gamopatia policlonal, hipoalbuminemia e proteinúria também são

relatadas. A identificação do microorganismo em citologia por aspiração com agulha fina do báço, dos linfonodos e dos pulmões é possível, mas extremamente improvável^[8]. Frequentemente se encontra plasmocitose nessas amostras citológicas. O DNA bacteriano pode ser detectado em amostras pela técnica de PCR.

O teste de anticorpos imunofluorescentes indiretos para a *E. canis* é sensível. Embora seja possível uma reatividade cruzada suave com outros microrganismos da ordem das rickettsias, consideram-se positivos títulos maiores que 10. A presença de títulos elevados de anticorpos não confere proteção contra reinfecções, e eles podem persistir por nove a doze semanas^[5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exames laboratoriais deve-se remeter sangue para análise de hemograma, armazenado à temperatura de 4°C. O sangue colhido dos capilares marginais das orelhas para a realização de esfregaços sanguíneos deve ser encaminhado congelado a -4°C quando é enviado a longas distâncias. Para a realização de esfregaços, as amostras de sangue devem ser colhidas a vácuo, em um volume de 4ml de sangue em EDTA a 10%. Se o profissional optar por fazer os esfregaços e enviar as lâminas para leitura, a inserção da agulha para obter o sangue deve ser com uma lâmina extensora e deverá ser corada com corante comum panótico rápido. As lâminas deverão ser encaminhadas em temperatura ambiente. A amostra de medula óssea deve ter no mínimo 1ml de sangue e ser remetida à temperatura ambiente a pequenas distâncias e a -4°C se a longas distâncias. Para fazer imunofluorescência e detecção da *Erlichia canis* por PCR (reação em cadeia da polimerase) enviam-se 5ml de sangue sem anticoagulante. Pode-se, ainda, encaminhar 1ml de sangue da medula óssea, com anticoagulante, colhido da crista ilíaca ou de ossos longos para avaliar a presença de anemia normocítica normocrômica arregenerativa e supressão medular^[5,8] (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência dos tipos morfológicos de anemia em 85 cães domésticos infectados naturalmente por *Erlichia* spp.

Tipo de anemia	Número de animais	Frequência (%)
Normocítica normocrônica	57	67,05
Normocítica hipercrônica	18	21,18
Microcítica hipocrônica	1	1,18
Macrocítica normocrônica	2	2,35
Macrocítica hipocrônica	7	8,24
Total	85	100,00

Fonte: Adaptada de Mendonça, (2005)^[8].

Referências bibliográficas

1. AGUIAR, D.M. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro *Erlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
2. ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 18, p. 31-38, jan./fev. 1999.
3. BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, p. 141-146, 2004.

4. DUMLER, J.S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and HGE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
5. COHN, L.A. Ehrliquioses and related infections. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 863-884, 2003.
6. FIGHERA, R.A. Introdução à anemia. In: _____. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria: Pallotti, 2001.p. 17-21.
7. LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.
8. MENDONÇA, C.S. et al. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Biosc. J.**, v. 21, n. 1, p. 167-174, 2005.
9. SANTARÉM, V.A. **Achados epidemiológicos, clínicos, hematológicos e comparação técnica para Diagnóstico de Ehrlichia canis**. 2003. 127f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, 2003.
10. STILES, J. Canine rickettsial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, St. Louis, v. 30, n. 5, p. 1135-1150, 2000.
11. TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1990. cap. 37, p. 404417.

1.9 Clostridiose

Conceito

A diarreia é um problema clínico muito frequente para o médico veterinário de pequenos animais. A clostridiose é uma doença causada pelas espécies enteropatogênicas *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*, que invadem o epitélio ou permanecem aderidas à superfície da mucosa sem penetrá-la, liberando uma enterotoxina que produz diarreia^[4]. Essas espécies estão entre as bactérias mais incriminadas na diarreia canina^[2].

Etiologia e Patogênese

Clostridium perfringens e *Clostridium difficile* são bastonetes Gram-positivos, anaeróbicos e formadores de esporos. Esses microrganismos são agentes causadores de miosites necrotizantes e diarreias em animais domésticos, inclusive nos cães. Esses agentes causam também gangrena e gastroenterites, e produzem toxinas. Os esporos resistem a mudanças ambientais e aos desinfetantes que inativam outras bactérias mais vulneráveis. *Clostridium perfringens* é classificado em cinco tipos (A, B, C, D e E), dependendo da combinação de quatro exotoxinas: alfa, beta, épsilon e iota^[1].

A toxina épsilon é a principal responsável pelo quadro de enterotoxemia em animais domésticos e ruminantes. Produzida pelos tipos B e D, a toxina épsilon é secretada como prototoxina e sua ativação ocorre pela atividade enzimática da tripsina, resultando em um pequeno peptídeo responsável pelas alterações patológicas^[3]. Uma das principais envolvidas no quadro entérico é a *Clostridium perfringens* enterotoxin (Cpt), com intenso efeito enterotoxigênico. Ela provoca secreção fluida no intestino, levando à diarreia e sendo detectada em 34% dos cães com diarreia (e em 5% a 14% dos cães que não têm diarreia)^[4].

Diagnóstico da doença

a) Epidemiologia

A principal fonte da bactéria são as fezes de cães infectados e fômites contaminados. Já o contágio ocorre pela via oral por ingestão de alimentos, carcaças e fezes contaminadas^[4].

b) Sinais clínicos

O *Clostridium perfringens* faz parte da microflora intestinal anaeróbica normal dos cães. Essa bactéria produtora de toxinas é associada à gastroenterite hemorrágica, enterocolite necrosante aguda, diarreia hospitalar aguda e diarreia crônica, mas as evidências que implicam essa bactéria como patógena primária são apenas circunstanciais^[3,4].

c) Patologia

As lesões mais evidentes são gastroenterite hemorrágica e enterocolite necrosante aguda. Extensas áreas de necrose podem ser observadas na região do cólon. Em infecções massivas, pode-se observar grande quantidade de bastonetes aderidos à mucosa intestinal do segmento afetado.

d) Diagnóstico laboratorial

Não existe consenso universal entre os laboratórios sobre qual teste deve ser utilizado para o diagnóstico da infecção, principalmente pela ausência de testes de especificidade e sensibilidade de técnicas para detecção da toxina dessas bactérias em amostras de cães. Como o *C. perfringens* é um comensal da microflora intestinal, a cultura e o isolamento a partir das fezes de cães não têm valor diagnóstico. Contudo, a cultura em caldo de carne cozida (CMM) pode ser realizada para amplificação e posterior identificação de microorganismos possivelmente envolvidos na etiologia da diarreia, sendo submetidas as colônias à pesquisa de DNA bacteriano por PCR posteriormente. O diagnóstico é frequentemente realizado pela detecção de endósporos em esfregaços ou impressões de fezes, associado aos sinais clínicos, ou ainda pela imundetectação da proteína CPE (associada à esporulação do *Clostridium perfringens*) em amostras de fezes^[2].

O diagnóstico de enterotoxemia tem como base a detecção dessa toxina no conteúdo intestinal. O teste padrão utilizado é a soroneutralização *in vivo*, realizada em camundongos. Como alternativa, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é um método *in vitro* sensível, específico, ético e rápido, que necessita de apenas quatro horas para obtenção dos resultados^[5]. O teste de ELISA desenvolvido com anticorpos monoclonais (AcMo) diminui a possibilidade de reação cruzada, detectando a proteína CPE em amostras fecais^[4,5]. O diagnóstico também pode ser firmado por citologia fecal após a eliminação de fezes, ou por exame retal, podendo-se realizar esfregaços do muco superficial nas fezes ou na luva para um exame citológico. Esse exame pode revelar células inflamatórias, microrganismos infecciosos e esporos produtores de toxinas^[1].

e) Diagnóstico diferencial

Infecções entéricas produzidas por *Giardia lamblia*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiela* spp. ou ainda agentes virais como parvovírus, coronavírus e rotavírus.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exames laboratoriais, remeter no mínimo duas amostras dos tecidos acometidos, principalmente fragmentos intestinais, armazenados em formol 10% para análise histopatológica. Os tecidos ou as amostras de fezes, fluidos como líquidos articulares, medula óssea e liquor devem ser colhidos e encaminhados para o setor de bacteriologia, à temperatura de -4°C e em embala-

gem hermeticamente fechada, onde será semeado em caldo de carne cozida (CMM) e incubado a 37°C por 24 horas^[3].

Referências bibliográficas

1. FREITAS, T.D. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Clostridium perfringens* Type D epsilon toxin. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 269-271, 2009.
2. MARKS, S.L.; KATHER, E.J. Enteric bacterial infections. In: GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, p. 339-369, 2006.
3. MCCLAIN, M.S.; COVER, T.L. Functional analysis of neutralizing antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1785-1793, 2007.
4. PARREIRAS, P.M. et al. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 328-330, 2002.
5. UZAL, F.A. et al. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 2, p. 94-99, 2003.

1.10 Doença de Tyzzer

Conceito

A doença de Tyzzer tem como agente etiológico o *Clostridium piliforme* e se caracteriza por lesões necróticas no fígado, órgãos digestivos e coração. Várias espécies animais são sensíveis a esse organismo, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, primatas e cavalos.

Etiologia e Patogênese

O bastonete é uma bactéria Gram-positiva encontrada em focos necróticos em formas esporulantes, sendo um parasita intracelular obrigatório. A transmissão ocorre principalmente pela via fecal-oral. Tem sido cultivado em ovos embrionados e culturas de células. O nome proposto originalmente, *Bacillus piliformis*, nunca foi oficialmente aceito. A designação como uma espécie do gênero *Clostridium* baseia-se na sua sequência de subunidade ribossomal RNA.

O *Clostridium piliforme* se estabelece no intestino como uma infecção primária, em geral no íleo, ceco, ou em ambos. Ele se espalha através da circulação para o fígado, e a partir daí para outros órgãos, principalmente o coração. O principal local de replicação, e provavelmente o único em animais afetados, é o epitélio do íleo e do ceco.

Diagnóstico

Devido ao comportamento agudo e ao desenvolvimento rápido dos sintomas, nem sempre é possível diagnosticar a doença. Geralmente o diagnóstico é firmado *post mortem*^[2].

a) Epidemiologia

O *Clostridium piliforme* parece ser uma bactéria comensal do intestino de roedores de laboratório, sendo encontrado nas fezes de animais saudáveis e doentes. Originalmente descrita em roedores, a doença tem sido descrita em outras espécies animais, como caninos e felinos^[1]. A infecção pode ser endógena ou por ingestão. Em locais onde o saneamento básico e a higiene são precários, o contágio ocorre com maior frequência, pois a infecção de cães é relacionada ao con-

tato ou à ingestão de fezes de ratos contendo esporos^[1,3]. A doença tem ocorrência mundial e parece ser mais frequente em animais estressados por desmame, superlotação, falta de condições de higiene adequadas, privação alimentar, transporte, terapia com glicocorticoides e outras formas de imunossupressão^[1,3]. As possibilidades de transmissão incluem a vertical e a introdução de esporos por intermédio de vermes, alimentos ou água contaminados. A morbidade e mortalidade são muito variáveis.

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos são aparentes por um curto período de tempo e incluem febre, icterícia, depressão, dor abdominal, distensão abdominal e, algumas vezes, diarreia^[2]. A maioria dos animais é encontrada morta ou em coma, sem mostrar sinais premonitórios. Em alguns casos, antes da morte, pode-se observar aumento de alanina transaminase.

c) Patologia

Como a progressão da doença é rápida, evoluindo ao óbito, usualmente o diagnóstico é realizado pelo exame macroscópico, durante a necropsia. Achados característicos incluem focos necróticos branco-acinzentados de 1 a 2mm de diâmetro na cápsula e na superfície de corte hepática, ou então em outras vísceras. A mucosa intestinal pode estar congesta na região terminal do íleo e no cólon proximal. Fezes espumantes marrom-escuras presentes no lúmen intestinal e aumento dos linfonodos mesentéricos também são relatados. Na histologia, relata-se necrose periportal hepática, ileite e colite necrótica, além de necrose em outros tecidos, como o miocárdio. Ao redor dos focos necróticos pode haver infiltrado de células inflamatórias^[1].

Na histopatologia, pela coloração com hematoxilina e eosina, observam-se organismos filamentosos fracamente corados no interior dos hepatócitos, na margem das lesões necróticas e em células epiteliais do intestino. Colorações especiais como Giemsa, Warthin-Starry e prata Gomori, ou ainda impressões fixadas com azul de metileno, podem ser utilizadas para confirmar o diagnóstico, uma vez que o *Clostridium piliforme* não pode ser isolado em meios artificiais, sendo cultivado somente em ovos embrionados ou culturas de células, por se tratar de um parasita intracelular obrigatório^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

A sorologia tem sido utilizada para diagnosticar infecções latentes em colônias de roedores, detectando anticorpos direcionados contra antígenos flagelares. Essas técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da infecção em cães e gatos^[1].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico deve ser diferenciado de salmonelose aguda, septicemia e outras infecções microbianas agudas que estão entre as doenças que devem ser consideradas, como hepatite infecciosa, encefalomielite, listeriose, botulismo, tétano, intoxicações, distúrbios do metabolismo e traumatismos diversos^[2].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exames laboratoriais, devem-se remeter no mínimo duas amostras dos tecidos acometidos, principalmente fragmentos intestinais e hepáticos, armazenados em formol 10% para análise histopatológica. Os tecidos colhidos e fezes também devem ser encaminhados para o diagnóstico bacteriológico, à temperatura de -4°C e em embalagem hermeticamente fechada.

Fluidos como líquidos articulares, medula óssea e liquor devem ser encaminhados em frascos estéreis hermeticamente fechados à temperatura de -4°C^[2]. Fragmentos do fígado devem ser fixados e corados a fresco. A doença é normalmente diagnosticada ao se encontrar as lesões hepáticas típicas (necrose multifocal) e demonstrando a característica dos organismos em hepatócitos por esfregaços. Os cortes no fígado devem ser corados pelo método de impregnação de prata, que também são úteis para a demonstração do organismo.

Referências bibliográficas

1. JONES, B.; GREENE, C.E. Enteric bacterial infections. In: GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, p. 339-369, 2006.
2. MCCLAIRN, M.S.; COVER, T.L. Functional analysis of neutralizing antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1785-1793, 2007.
3. PARREIRAS, P.M. et al. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 328-330, 2002.

1.11 Tétano canino

Conceito

O tétano é uma doença que cursa com desordem neuromuscular e ocorre nos animais domésticos e no homem. Essa doença é produzida por uma neurotoxina específica, produzida pelo *Clostridium tetani* em tecidos infectados e em condições de redução da oxigenação local^[11].

Etiologia e Patogênese

Clostridium tetani é um bastonete Gram-positivo anaeróbico obrigatório, móvel, formador de esporos, pertencente à classe dos clostrídios neurotóxicos. Os esporos de todos os bacilos anaeróbios abundam no solo, motivo pelo qual as enfermidades produzidas por esse grupo de bactérias se chamam infecções telúricas, vindas da terra, a exemplo do tétano, do carbúnculo, do botulismo e da gangrena gasosa^[6]. Esses esporos são extremamente resistentes ao meio ambiente, especialmente à dessecção, não apresentando até o momento seu tempo de resistência no meio ambiente avaliado. A esterilização úmida consegue destruí-lo a 100°C em uma hora^[8]. Na água de fervura, a 105°C, são capazes de resistir por até 125 minutos, e na temperatura de autoclave, entre 130°C e 150°C resistem por 15 a 20 minutos. A desinfecção não é eficaz, resistindo, por exemplo, ao ácido fênico a 5% por 15 horas^[6].

A bactéria produz proteínas tóxicas conhecidas como tetanolisina, tetanospasmina e toxina não espasmogênica^[1]. A primeira amplia a necrose tecidual local, e a segunda toxina é a responsável pelas manifestações clínicas da doença, sendo produzida pela forma vegetativa do *C. tetani* no local de lesão em condições de baixa tensão de oxigênio, produzindo hipertonia e espasmos musculares. A terceira parece ser responsável por fenômenos autônomos resultantes da hiperestimulação do sistema nervoso simpático^[2].

Diagnóstico

Para o diagnóstico do tétano, a história de ferida recente ou procedimentos cirúrgicos realizados de maneira imprópria associados aos sinais clínicos são comuns. Pode-se isolar o agente, mas quando isso não é possível, o diagnóstico é baseado apenas no histórico e nos sinais clínicos característicos da doença^[13].

a) Epidemiologia

Cães e gatos são mais resistentes ao tétano do que equinos e bovinos. Por isso, a doença não é frequente em pequenos animais^[13]. A variação na incidência da doença nessas espécies ocorre por diferenças na suscetibilidade e porque a exposição ao agente ocorre com maior probabilidade em determinadas espécies. A infecção ocorre em feridas pouco desinfetadas e contaminadas por esporos, sendo a água oxigenada excelente combatente^[3]. O micrório penetra pelas feridas produzidas por objetos que o levam para tecidos profundos. Em muitos casos, entretanto, não se localiza a porta de entrada^[4]. As doenças periodontológicas demonstram ambiente perfeito para a instalação e multiplicação desse agente no ambiente contaminado e anaeróbio das lesões teciduais, e os esporos do *C. tetani* são incapazes de crescer em tecido muscular normal, já que o potencial de oxigenação do sangue circulante é elevado e não permite o desenvolvimento desses anaeróbios^[12]. O agente é encontrado em fômites, como peças enferrujadas, e em locais contaminados com fezes, como o curral.

b) Sinais clínicos

O tétano é chamado também de “a doença dos dez dias”, tendo em vista que o período de incubação varia de uma a duas semanas^[9]. A absorção da toxina provoca rigidez muscular localizada inicialmente próximo à região da ferida e nos músculos de maior atividade, como o masseter, no pescoço. A rigidez generalizada ocorre mais tarde, quando se fazem evidentes espasmos tónicos e hiperestesia. Os reflexos aumentam de intensidade, e o cão responde com espasmos mais violentos quando excitado por toque ou ruído. O espasmo dos músculos da cabeça e a dificuldade de apreensão e mastigação levam ao trismo mandibular^[5,10]. O espasmo dos músculos do dorso confere aos cães enfermos a “posição de cavalete”, além de gerar transtornos da respiração e ritmo cardíaco aumentado, respiração rápida e congestão das membranas mucosas. Geralmente a temperatura permanece acima da normalidade, mas pode elevar-se mais de 4°C antes dos espasmos finais. Em animais que se recuperam, o período de convalescença varia de duas a seis semanas e, frequentemente, produz uma imunidade protetora de novas infecções^[13].

Em quase um terço dos casos de tétano não podem ser determinadas as lesões que originam a doença, pois com certa frequência são ferimentos que passaram despercebidos e que, ao apresentarem-se os primeiros sintomas clínicos de tétano, já cicatrizaram^[11,12]. A maior frequência de tétano em cães é entre o segundo e o sexto mês de vida, pela maior exposição a lesões ou feridas. As pregas da pele da cabeça e a retração dorsal das orelhas são comumente observadas em cães, produzindo uma expressão facial característica chamada “riso sardônico”^[9]. A rigidez progride com espasmos no pescoço, tórax, abdômen e dorso, produzindo opistotônio e dificuldade respiratória^[6]. Tanto taquiarritmias como bradiarritmias podem estar presentes em cães com tétano. Ritmos rápidos podem estar associados à taquicardia sinusal, e os ritmos lentos têm sido caracterizados por bloqueio atrioventricular e complexos ventriculares prematuros^[4].

c) Patologia

Manifestações patológicas estão ausentes, devendo-se buscar a exclusão de afecções que ocasionem sinais clínicos semelhantes. No caso de suspeita, obrigatoriamente se deve buscar observar feridas que possam ter sido a fonte de infecção, como ferimentos profundos que fornecem a anaerobiose necessária para a multiplicação do agente, incluindo cortes, arranhões, escoriações e procedimentos cirúrgicos, como orquiectomia, extração dentária e caudectomia^[9,11].

d) Diagnóstico laboratorial

Achados citopatológicos a partir de material colhido na lesão, corados ao Gram, podem demonstrar bastonetes Gram-positivos com esporo terminal, sendo essa morfologia diferente da

maioria das outras bactérias anaeróbicas^[12]. Anormalidades hematológicas podem estar presentes, incluindo leucocitose por neutrofilia, decorrentes de processos infecciosos a partir da ferida. Na avaliação bioquímica sérica pode-se evidenciar elevação das enzimas musculares em decorrência da espasticidade. Nesse caso, é possível observar leucocitose por neutrofilia e aumento sérico da enzima creatina quinase^[8]. Dessa forma, o peróxido tende a acumular-se em concentrações tóxicas quando na presença de O₂.

Os clostrídios também carecem de superóxido desmutase, permitindo o acúmulo do ânion tóxico superóxido^[6]. Esses microrganismos só conseguem realizar seu metabolismo normal quando sujeitos a um potencial de redução negativo, podendo fermentar açúcares, digerir proteínas e ainda formar toxinas^[2]. Os esporos crescem somente em condições anaeróbicas de cultura, como placas de ágar ou tubo de cultura em ambientes hermeticamente fechados, onde o ar é substituído por nitrogênio com CO₂ a 10%. Os meios líquidos são colocados em tubos profundos contendo fragmentos de tecido animal ou ágar e um agente redutor, como o tioglicolato^[7]. Dessa forma, o crescimento bacteriano se dará de baixo para cima, já que a superfície está exposta ao ar^[4,6]. A detecção microscópica ou o isolamento do *Clostridium tetani* são úteis, mas frequentemente não têm êxito, pois uma porcentagem muito pequena dos infectados, apenas 30%, apresenta cultura positiva.

e) Diagnóstico diferencial

Esofagite, corpo estranho esofágico, raiva, trismo, afecções dentárias, amigdalite, intoxicação por estricnina e organosfosforados, meningite, hidrofobia, epilepsia, lesão intracraniana devem ser levados em consideração no diagnóstico diferencial^[10].

O tétano também pode ser confundido com afecções da boca que são acompanhadas de trismo, como abscessos dentários, periostite alvéolo-dentária, erupção viciosa dos molares, fratura ou osteomielite da mandíbula e abscesso faringiano^[2].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Fragmentos de tecidos do SNC (encéfalo), do sistema nervoso periférico, da musculatura estriada ou amostras de tecido necrótico da região afetada, além de lâminas de esfregaço contendo material colhido na lesão para exames citopatológicos, devem ser enviados em temperatura ambiente e devidamente lacrados para o laboratório. A morfologia de esporo terminal é um diferencial da maioria das outras bactérias anaeróbicas^[9,11].

Referências bibliográficas

1. BURNIE, A.G. et al. Gastroesophageal reflux and hiatus hernia associated with laryngeal paralysis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**. v. 30, n. 7, p. 414-416, 1989.
2. CANAL, I.H. et al. Tétano: também em animais de companhia. **Revista Nossa Clínico**, n. 53, 2006.
3. CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. Clostridioses In: **Enfermedades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. cap. 27, p. 291-315.
4. DIERINGER, T.M.; WOLF, A.M., Esophageal hiatal hernia and megaesophagus complicating tetanus in two dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 199, n. 1, p. 87-89, 1991.
5. DHIMAN, R.K. et al. Transient achalasia of esophagus in tetanus. **Indian Journal Gastroenterology**. v. 11, n. 3, p. 139-140, 1992.
6. GAIGA, L.H. et al. Megaesôfago e hérnia de hiato esofágico associados ao tétano em um cão: relato de caso, **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 13, n. 2, p. 145-152. 2006.

7. GAYNOR, A.R. et al. Risk factors for acquired megaesophagus in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 11, p. 1406-1412, 1997.
8. HARTNAGEL, O. Tétano em cão Border Collie. A Hora Veterinária, v. 20, p. 30-36. 2001.
9. JOHNSON, S.E., SHERDING, R.G. Doenças do esôfago e distúrbios da deglutição In: BIR-CHARD, S.J., SHERDING, R.G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998. Cap. 2, p. 708-726.
10. KOHLER, B.; BEER, J. Infecções e intoxicações por Clostrídios. In: BEER, J. **Doenças infeciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988 v. 2, cap. 48, p. 250-254.
11. MARTINS, V.M.V. et al. Tétano em Caninos - relato de casos. **Revista de Ciências Agro-veterinárias**. v. 1, n. 1, p. 24-26, 2002.
12. TRINDADE, R.R.R.; TRINDADE, W.M. Tétano Felino - relato de caso, **Revista Nossa Clínico**, n. 50, 2006.
13. VIANA, F.A.B. **Guia Terapêutico Veterinário**, Belo Horizonte, MG, 2003.

1.12 Botulismo canino

Conceito

Botulismo é uma intoxicação alimentar pouco frequente nos animais de companhia, que ocorre pelos efeitos da toxina do *Clostridium botulinum*. Ao contrário de outras toxinfecções alimentares, que cursam com sinais gastrintestinais, no botulismo figuram sinais clínicos neurológicos^[6].

Etiologia e Patogênese

O agente causador é um bacilo Gram-positivo anaeróbio, móvel, formador de esporos e negativo para a catalase^[7]. É um saprófita que habita o solo, na forma de esporos, e a região gastrointestinal dos animais e do homem^[6]. O microrganismo cresce melhor sob condições anaeróbicas e à temperatura de 30°C, embora algumas cepas possam crescer a temperaturas tão baixas quanto 6°C. O pH levemente alcalino estimula o crescimento de alguns tipos, mas o pH de 5,7 é ótimo para cepas do tipo C^[2].

O *Clostridium* se multiplica em produtos orgânicos em decomposição com teor proteico alto. Na área gastrointestinal, a toxina é ativada por ação da tripsina^[7]. Após a absorção intestinal, a toxina chega por via hematógena às regiões das sinapses neuromusculares do sistema autônomo periférico. Os tipos A, B e F estão associados, principalmente, com doenças em humanos. A maioria dos casos de botulismo em cães é causada pelos tipos C1 e D^[2]. A toxina botulínica é a substância mais tóxica conhecida atualmente, pois pequenas quantidades são capazes de causar sintomas clínicos^[1]. É uma proteína liberada principalmente pelas células vegetativas após sua lise, ou através da difusão pela parede celular. A quantidade da toxina dentro dos esporos é de apenas 1% daquela encontrada nas células vegetativas.

A toxina botulínica é destruída pelo calor a 80°C por 30 minutos ou a 100°C por 10 minutos. Os esporos do *C. botulinum* são muito resistentes quando permanecem em cadáveres, podendo ser encontrados viáveis por mais de seis meses^[6]. A solução de ácido clorídrico a 10% os destrói em até uma hora e em formalina a 20% em 24 horas^[4].

As toxinas são sintetizadas como cadeias polipeptídicas inativas, que são liberadas pela lise bacteriana^[1]. As proteases do tecido ou mesmo da bactéria quebram as cadeias polipeptídicas em uma molécula ativa^[2]. As toxinas são geralmente ingeridas pré-formadas em material putrefeito e carcaças e são absorvidas pelo trato gastrointestinal. Uma exceção é a toxina tipo E, que é ativada e tona-se mais potente pelas enzimas proteolíticas intestinais e gástricas^[7].

A toxina pode continuar a ser absorvida pelo intestino delgado e cólon, mas essa absorção ocorre mais lentamente. Depois de ser absorvida, a toxina cai na circulação sistêmica, onde finalmente atingirá as junções neuromusculares colinérgicas. A toxina botulínica liga-se inicialmente a um receptor, que se supõe ser o ácido siálico, na superfície externa da membrana celular do nervo. A ligação ocorre muito rapidamente, não é afetada pela temperatura e é independente da atividade neural. Durante esse estágio, a toxina é suscetível à inativação pela antitoxina e não resulta em paralisia^[6]. À medida que a acetilcolina é liberada do terminal nervoso, a toxina passa através da membrana celular. Uma vez dentro da célula, a toxina é resistente à inativação pela antitoxina^[7].

Intracelularmente, a toxina interage com outro receptor para bloquear a liberação de acetilcolina. O mecanismo de bloqueio da liberação de acetilcolina não é conhecido, porém uma teoria é que, com a presença da toxina, há necessidade de uma concentração mais alta de cálcio para a exocitose da acetilcolina ocorrer. Sob a microscopia óptica, nenhuma lesão é aparente na junção neuromuscular^[2,3]. Entretanto, as mudanças em axônios terminais, fendas sinápticas e fibras musculares adjacentes são notadas pela microscopia eletrônica de junções neuromusculares. O bloqueio da liberação de acetilcolina resulta em doença generalizada do neurônio motor inferior^[4].

Diagnóstico

O diagnóstico do botulismo é usualmente baseado na história e nos sinais clínicos do animal.

a) Epidemiologia

Os cães parecem ser relativamente resistentes à moléstia. A maioria dos casos em caninos é atribuída à ingestão de carne putrefata, carne crua ou comidas com a toxina pré-formada^[6]. A doença é mais importante em cães que vivem soltos ou naqueles de áreas rurais, por possuírem fácil acesso a cadáveres contaminados, ou mesmo pelo hábito de enterrar sua caça e ingerir dias depois^[1]. Não ocorre transmissão direta entre os animais, uma vez que a causa de doença é a intoxicação e não a infecção bacteriana. A toxina somente é produzida em condições de anaerobiose.

b) Sinais clínicos

O início dos sinais geralmente ocorre entre 24 e 48 horas após a ingestão, mas pode aparecer em até 6 dias^[6]. Os primeiros sinais são: fraqueza ascendente, simétrica e progressiva a partir dos membros posteriores para os anteriores, que pode resultar em quadriplegia, embora o balanço da cauda seja mantido^[4]. Um exame neurológico completo mostrará a hiporreflexia e hipotonía, indicando a doença generalizada de neurônio motor inferior^[7]. Os nervos cranianos são afetados frequentemente, ocorre midriase com respostas pupilares lentas, tônus maxilar e reflexo de mordedura diminuído com excesso de salivação, reflexos palpebrais diminuídos e vocalização fraca; esses sinais têm sido encontrados em cães afetados^[6]. A conjuntivite e a queratite ulcerativa podem evoluir para reflexo palpebral fraco^[4]. Em cães severamente afetados pode haver tônus muscular diminuído, principalmente dos músculos diafrágmáticos, envolvidos na respiração. A taxa cardíaca é variável, constipação e retenção urinária podem ocorrer, além de megaesôfago ser observado em 20% dos cães afetados^[2].

c) Patologia

De modo geral, considera-se a ausência de lesões características na necropsia e no exame histopatológico. Entretanto, nos casos de botulismo tipo D, os cães podem apresentar quadro de hemorragia generalizada.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico do botulismo é baseado na descoberta da toxina em soro, fezes, vômito ou amostras de comida que foram ingeridas^[2]. O soro ou um extrato de fezes, vômito ou comida é injetado em um grupo de ratos e em outro grupo é injetado soro em combinação com antitoxina tipo-específica na cavidade peritoneal. A sobrevivência de um grupo protegido com um tipo de antitoxina e morte de outros grupos com sinais consistentes quanto ao botulismo revela qual a toxina em questão^[3,4]. Os testes *in vitro* mais novos são desenvolvidos para identificar a toxina botulínica, e incluem técnicas de radioimunoensaio, hemoaglutinação passiva e ELISA. Esses testes não têm substituído o teste de ratos, porque eles medem a antigenicidade mais do que a toxicidade.

Os estudos com eletromiografia, inicialmente, são normais, mas podem mostrar potenciais de fibrilação nos casos graves, após 5 ou 7 dias^[5]. A velocidade de condução nervosa motora é normal, mas a amplitude de resposta obtida é diminuída pelo bloqueio neuromuscular. A eletromiografia é útil na diferenciação entre o botulismo e a polirradiculoneurite, paralisia dos carapatos e miastenia grave. Cães levemente acometidos geralmente se recuperam em três a quatro semanas^[4]. Os nervos cranianos, o pescoço e a função motora tendem a ser os primeiros a retornar em cães que se recuperam. Nos casos mais graves de intoxicação, o animal pode morrer em 24 horas devido à paralisia respiratória ou à aspiração de líquidos para os pulmões. Nos casos de botulismo tipo D, os cães morrem repentinamente, com sinais de hemorragia generalizada e sem *deficit neurológico*^[2].

e) Diagnóstico diferencial

Deve ser feito para todas aquelas enfermidades que apresentam sinais clínicos de origem nervosa ou neuromuscular, como raiva, hipocalcemia, encefalites, traumas, intoxicação por estricnina, polirradiculoneurite, paralisia dos carapatos e distúrbios miastênicos. Em função da falta de achados na necropsia, da ausência de comprovação laboratorial dos casos suspeitos e de um eficiente diagnóstico diferencial, muitos casos de botulismo são atribuídos a outras doenças ou síndromes, sendo o inverso também verdadeiro. O diagnóstico diferencial preciso entre o botulismo e a raiva só pode ser realizado laboratorialmente com a confirmação ou a exclusão da raiva, pois, diferentemente do botulismo, essa enfermidade apresenta alterações histológicas características e resultados laboratoriais conclusivos^[4,3].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem ser colhidos fragmentos de vários órgãos e fixados em formol a 10% para serem processados rotineiramente e submetidos a exames histopatológicos, além dos espécimes destinados à histopatologia, amostras de fígado, conteúdo intestinal e ruminal, juntamente com amostras de água de bebedouros e amostras de alimentos utilizados na composição da dieta para a realização de bioensaio e soroneutralização para identificação de toxinas, para a realização de imunofluorescência direta (IFA) e inoculação intracerebral em camundongos (ICC)^[4].

Referências bibliográficas

1. ALMEIDA, A.C. et al. Perfil sorológico das amostras de *Clostridium botulinum* tipos C e D utilizadas para produção de imunógenos no Brasil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 2, p. 1-07, 2000.
2. CERESER, N.D. et al. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 280-287, 2008.

3. GIMENEZ, D.F., GIMENEZ, J.A. Serological subtypes of botulinal neurotoxins. In: DAS GUPTA, B.R. *Bo* tetanus neurotoxins. **Neurotransmission and biomedical aspects**. New York: Plenum, 1993. p. 421- 423.
4. GIMENEZ, D.F., GIMENEZ, J.A. The typing of botulinal neurotoxins. **Institute Journal Food Microbiology**, v. 27, p. 1. 1995.
5. COSTA, G. et al. Botulismo em bovinos leiteiros no Sul de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**. 2008, vol.38, n. 7, p. 2068-2071.
6. KETCHAM, E.M.; GOMEZ, H.F. Infant botulism: a diagnostic and management challenge pediatric perspective. **Air Medical Journal**, Orlando, v. 22, n. 5, p. 6-11, 2003.
7. LARA, J.A.F. et al. Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meat. **Meat Science**, Barking, v. 65, p. 609–613, 2003.

2. PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS DOS CANINOS

2.1 Cinomose

Conceito

A cinomose é uma doença viral aguda, subaguda ou crônica contagiosa dos caninos, caracterizada por sinais sistêmicos. Essa enfermidade apresenta taxa de mortalidade entre 25% e 75% e possui distribuição mundial^[5]. A forma neurológica da doença produz altas taxas de mortalidade, porém a infecção pode ser inaparente ou apresentar morbidade moderada, com a apresentação de sinais respiratórios, digestivos, oculares e cutâneos^[8,7].

Etiologia e Patogênese

O vírus da cinomose (CDV) é um *Morbillivirus* pertencente à família Paramyxoviridae. Esse vírus possui uma fita simples de RNA com polaridade negativa como genoma, envolto por um nucleocapsídeo helical e um envelope lipoproteico onde estão inseridas as glicoproteínas hemaglutinina (H) e de fusão (F). O CDV é sensível a fatores ambientais, luz ultravioleta, temperatura superior a 50°C por mais de 30 minutos e variações de pH, permanecendo estável entre pH 4,5 e 9. É sensível ainda a solução de formalina (< 0,5%), fenol (0,75%), amônia quaternária (0,3%), éter e clorofórmio. No ambiente, sobrevive por aproximadamente 48 horas em tecidos a 25°C, podendo sobreviver por mais de duas semanas em temperaturas inferiores a 5°C^[7,5].

Estudos de análise de sequência do gene da H de isolados de diferentes regiões geográficas e estudos com soro policlonal têm demonstrado a existência de variabilidade dessa proteína de superfície entre as cepas circulantes. Essa variabilidade genética e antigênica pode influenciar na epidemiologia da infecção e também na eficácia das vacinas disponíveis comercialmente contra o CDV^[6]. Cepas do CDV também diferem quanto à capacidade de causar lesões no SNC^[5].

Diagnóstico

O diagnóstico clínico da cinomose é dificultado pela grande variedade de sinais clínicos que podem ou não estar presentes nos cães^[9]. Por esse motivo, é necessária a realização de exames laboratoriais, bem como a exclusão de outras enfermidades que cursam com sinais clínicos semelhantes.

a) Epidemiologia

A ocorrência da doença é mais frequente em filhotes caninos com 3 a 6 meses de idade, porém animais adultos também podem desenvolver sinais clínicos após a infecção, sendo necessária

a imunização ativa ou passiva para prevenir a doença^[6]. Apesar do uso constante de vacinas vivas attenuadas contra essa doença desde a década de 60, a cinomose ainda é uma doença frequente em vários países^[1].

A transmissão do CDV ocorre principalmente pela secreção nasal, por aerossóis provenientes de animais infectados, e cães doentes podem excretar o vírus na urina, fezes e secreção oral, além da nasal. A transmissão transplacentária em fêmeas prenhas virêmicas também tem sido relatada. A excreção de vírus por animais infectados geralmente inicia 7 dias após a infecção, período em que os únicos sinais que podem eventualmente estar presentes são febre e apatia. Nos últimos anos, o espectro de hospedeiros do CDV tem aumentado, e a infecção de felídeos selvagens produziu surtos com elevadas taxas de morbidade e mortalidade em zoológicos e parques dos EUA e da África. Focas também são suscetíveis a cepas virulentas do CDV e, embora exista o vírus da cinomose das focas (PDV), a transmissão do CDV entre cães e focas tem sido relatada^[5].

O período de incubação da doença aguda geralmente é de 3 a 6 dias^[5,7]. Após 24 horas da infecção, o vírus se multiplica em macrófagos teciduais e se dissemina via linfáticos locais para as tonsilas, linfonodos bronquiais e retrofaríngeos. Desses, ocorre disseminação para os folículos linfoideos, baço, lâmina própria do estômago e intestino, linfonodos mesentéricos e células de Ku-pffer no fígado. Essa disseminação inicial pelo sistema linfático produz a primeira viremia, entre 3 e 6 dias após a infecção. A leucopenia observada nos cães resulta da replicação viral em linfócitos T e B. Em seguida, ocorre a disseminação para tecidos epiteliais e para o SNC, por via hematogena e associada a células. Cães apresentam resposta imune humorale e celular 14 dias após a infecção. As imunoglobulinas G (IgG) são eficazes na neutralização de vírions extracelulares, porém a resposta celular citotóxica é necessária para a eliminação do vírus dos tecidos^[5].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos de cinomose variam dependendo da virulência da cepa do vírus, das condições ambientais, da idade e do status imune do animal. Acredita-se que 50% das infecções pelo CDV sejam inaparentes, e que formas leves da doença também sejam comuns, com a apresentação de febre, anorexia, apatia e sinais respiratórios, como descarga oculonasal bilateral serosa a mucopurulenta acompanhada de tosse e dispneia.

A forma mais conhecida e relatada da doença é a forma generalizada e severa, que pode ser observada em cães de todas as idades, porém de ocorrência mais frequente em cães não vacinados, entre 12 e 16 semanas de idade. Geralmente o primeiro sinal da infecção a ser observado é a conjuntivite serosa a mucopurulenta, pois febre e apatia podem passar despercebidas. Além dos sinais respiratórios, sinais digestivos como vômito, diarreia, que varia de consistência fluida a sanguinolenta, e mucosa podem ser observados. Tenesmo e intussuscepções, desidratação severa e emaciação são consequências relatadas. A terapia de suporte pode reduzir consideravelmente a mortalidade nesses casos.

Cães infectados podem ainda desenvolver dermatite vesicular e pustulada, que é considerada sinal de prognóstico favorável por raramente estar associada a complicações neurológicas. Porém, sinais neurológicos são observados com frequência em cães que apresentam hiperqueratose nasal ou digital. Não há como predizer se um cão infectado desenvolverá a forma neurológica da doença, que usualmente inicia uma a três semanas após a doença sistêmica. Sinais neurológicos podem iniciar durante a doença generalizada ou mesmo sem a manifestação prévia de qualquer sinal extraneural.

As manifestações neurológicas agudas e crônicas são geralmente progressivas e variam de acordo com a região do SNC infectada. A inflamação das meninges pode resultar em hiperestesia, rigidez cervical ou paraespinhal. Convulsões, sinais vestibulares e cerebelares, paraparesia e te-

traparesia com ataxia sensorial e mioclonias são os sinais mais frequentes. Convulsões do tipo cão mascador de chiclete são classicamente associadas à poliencefalomalacia nos lobos temporais. A encefalite do cão velho (ODE) é caracterizada pelo surgimento agudo e progressivo de disfunção neurológica em cães velhos, que quando jovens apresentaram uma recuperação intermitente da doença neurológica. Esses animais apresentam deterioração crônica neurológica, que leva à ocorrência tardia de encefalite.

Filhotes caninos infectados pelo CDV antes da erupção da dentição permanente podem desenvolver hipoplasia do esmalte, que é considerada patognomônica de cinomose. Erupção parcial, oligodentia⁴ ou impactação⁵ dos dentes, também são relatados. Filhotes infectados via placenta podem desenvolver sinais de cinomose nas primeiras quatro a seis semanas de vida, e a infecção da fêmea durante a gestação pode resultar em aborto ou nascimento de filhotes fracos^[7,8,5].

c) Patologia

Os corpúsculos de Lenz podem ser relatados em células dos tecidos onde houve replicação viral, como células reticulares, epiteliais, conjuntivais e gliais, leucócitos e neurônios^[8,5]. A formação de células gigantes no tecido reticuloendotelial e em linfonodos, pneumonia intersticial, encefalite não supurativa, necrose e desmielinização no SNC constituem-se nos achados mais frequentes da histologia^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

A maioria dos cães infectados apresenta sinais distintivos o suficiente para a suspeita de cinomose, principalmente quando possuem entre 3 e 6 meses de idade e não há histórico prévio de vacinação. A detecção de抗ígenos por imunofluorescência direta (IFD) se constitui em uma técnica de rotina para o diagnóstico da infecção. Ela apresenta como vantagens a praticidade e a rapidez para a realização, sendo frequentemente empregada em esfregaço de conjuntiva, capa flogística, sedimento de liquor e em impressões de sistema nervoso central (SNC)^[8,5]. A detecção de抗ígenos do CDV no epitélio da conjuntiva usualmente ocorre nas primeiras três semanas da infecção, podendo ser detectado por períodos maiores em macrófagos e em células epiteliais do trato respiratório inferior, pele, epitélio digital e SNC^[5].

A técnica de RT-PCR (transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia) tem sido utilizada com vantagens no diagnóstico da infecção a partir de leucócitos, liquor, urina e secreção nasal, apresentando maior sensibilidade que outras técnicas^[4,9]. O isolamento viral também pode ser empregado, pela inoculação do tecido suspeito macerado ou de um raspado do epitélio luminal da bexiga em células de linhagem como MDCK e VERO, ou células primárias reticuloendoteliais de cães e ferrets, ou ainda de embrião de galinha. Porém, por alguns fatores, como a sensibilidade do vírus a variações de temperatura e a necessidade de adaptação do CDV em cultivo (geralmente por cinco passagens), o isolamento viral não é frequentemente empregado para o diagnóstico da infecção^[8].

Durante a fase de viremia, podem-se encontrar corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e, ocasionalmente, intranucleares eosinofílicos (corpúsculos de Lenz) nos leucócitos, que são considerados patognomônicos da infecção. Trombocitopenia e linfopenia com aumento no número de monócitos podem ser observadas na hematologia. A análise do liquor pode revelar um aumento na concentração de proteínas e células mononucleares^[1].

Quando o animal apresenta sinais neurológicos, a avaliação do fluido cerebroespinal (CSF) pode auxiliar o diagnóstico da infecção pelo CDV^[5]. Em um grande número de casos de ci-

⁴ Oligodentia: Problema caracterizado pela ausência de seis ou mais dentes, excluindo os terceiros molares.

⁵ Impactação:

nomose, a avaliação do CSF pode apresentar valores normais^[2]. Geralmente não são encontradas alterações físico-químicas, como coloração, aspecto, densidade, pH e glicose. Porém a proteína total e o número de células nucleadas podem estar aumentados, observando-se pleocitose mononuclear, características de uma inflamação não supurativa^[2,3]. Ainda no CSF, é possível realizar a detecção de antígenos do CDV por IFD ou de anticorpos específicos contra esse agente. Esses dois testes podem ser utilizados para confirmar a suspeita de infecção pelo vírus da cinomose^[7]. A detecção de anticorpos contra o CDV no CSF pode ser utilizada para confirmar a etiologia da encefalite, pois cães vacinados contra o CDV que possuem barreira hematoencefálica intacta não apresentam anticorpos no CSF^[8,1,10].

Anticorpos específicos para o vírus da cinomose podem ser detectados por soroneutralização (SN), imunofluorescência indireta (IFI), imunoperoxidase indireta (IPX) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Técnicas convencionais aplicadas com uma única amostra de soro indicam exposição prévia do animal ao agente em algum momento da vida, não diferenciando animais infectados de animais vacinados. Apenas a realização de sorologia pareada com a demonstração de soroconversão, sorologia a partir do liquor ou ainda um teste de ELISA para detecção de IgM podem indicar infecção recente^[8,7,10]. Títulos de IgM podem ser detectados em cães a partir do segundo dia pós-infecção ou vacinação, e persistem por cinco semanas a três meses, dependendo da cepa vacinal e da resposta do animal^[1]. O *Immunocomb test* é um ELISA comercial que detecta tanto anticorpos contra o CDV como o parvovírus canino^[10].

De todas as técnicas citadas, somente algumas delas podem conferir um diagnóstico mais acurado e rápido da infecção enquanto o animal ainda está vivo, como a IFD a partir de esfregaço conjuntival e a RT-PCR a partir de amostras de urina. Kits de ELISA que detectam IgM no soro ou ainda a detecção de anticorpos no liquor também podem ser utilizados para confirmar a infecção. Secreções, lâminas contendo esfregaço conjuntival e amostras de soro ou liquor devem ser enviadas refrigeradas para o diagnóstico, porém tecidos para isolamento viral ou RT-PCR devem preferencialmente ser coletados com antisepsia e mantidos a 4°C, até que sejam processados pelo laboratório de virologia.

e) Diagnóstico diferencial

A maioria dos casos de cinomose é caracterizada por febre, apatia, dispneia, tosse e descharge oculonasal, sinais respiratórios que podem ser confundidos com aqueles apresentados por cães com traqueobronquite infecciosa canina e outras infecções do trator respiratório, como pneumonias bacterianas. Em adição, a cinomose pode ser confundida com hepatite infecciosa canina, neoplasias, infecção por helmintos como *Toxocara canis* e *Toxascaris leonina*, intoxicações, toxoplasmose, neosporose, entre outras enfermidades que envolvem o trato respiratório, digestório e o SNC.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O diagnóstico laboratorial da infecção pode ser realizado a partir de amostras de esfregaço conjuntival, capa flogística, urina, CSF e em tecidos como intestino, bexiga, SNC, linfonodos, pele digital e pulmão, colhidos após a morte do animal^[8,4,5]. A colheita de células descamativas da conjuntiva pode ser realizada com o auxílio de suabes, acondicionados em meio essencial mínimo, solução salina 0,9% estéril ou outro meio de transporte. Amostras de sangue com anticoagulante são colhidas para a obtenção de capa flogística. Para a realização de sorologia, é necessária a separação do soro após a retração do coágulo. Essas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório. O tempo decorrido entre a colheita e o envio influí diretamente na qualidade da amostra e, consequentemente, na detecção do CDV.

Para a colheita do CSF é necessário que o animal seja anestesiado, preferencialmente com anestésico inalatório. Essa colheita é realizada após tricotomia e antisepsia da região de punção, coletando-se aproximadamente 1ml de CSF para cada 5kg de peso corporal, com o auxílio de agulha espinhal e tubo estéril. A análise do CSF deve ser realizada em 30 a 60 minutos após a colheita, pois após esse período pode ocorrer a lise das células^[2].

Referências bibliográficas

1. APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine Distemper: current status. In: CHARMICHAEL, L.E. **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**, Ithaca, 1999. Disponível em: <http://www.vet.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/toc.as>. Acesso em: 20 fev. 2009.
2. FREEMAN, K.P.; RASKIN, R.E. Citologia do sistema nervoso central. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas de Citologia de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2003. p. 275-308.
3. GAMA, F.G.V. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 596-601, 2005.
4. GEBARA, C.M.S. et al. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 480-487, 2004.
5. GREENE, C.E., APPEL, M.J. Canine Distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006, p. 25-41.
6. MARTELLA, V. et al. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 32-42, 2007
7. MURPHY, F.A. et al. Paramyxoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic Press, 1999, p. 411-428.
8. POSTON, R.P.; ENGLAND, J.J. Canine distemper. In: CASTRO, A.C.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic Virology - a practitioner's guide**. St. Louis: Mosby year book, 1992. p. 135-138.
9. SAITO, T.B. et al. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 1, p. 116-119, 2005.
10. WANER, T. et al. Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. **The Veterinary Record**, n. 152, p. 588-591, 2003.

2.2 Parvovirose

Conceito

A parvovirose⁶ canina foi descrita inicialmente em 1978 em vários países como uma doença entérica aguda que se disseminou rapidamente pelo mundo, causando pandemia com altos índices de morbidade e mortalidade. Hoje em dia é considerada uma das infecções mais comuns de cães, e a prevalência de anticorpos contra o vírus pode ser maior que 90% em populações caninas^[8,6].

⁶ Nota do revisor: Termo ainda não incorporado ao Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa.

Etiologia e Patogênese

Essa doença é causada pelo parvovírus canino tipo 2 (CaPV-2), distinto geneticamente do parvovírus canino tipo 1 (CaPV-1), que foi descrito pela primeira vez em 1967^[1]. Ambos pertencem à família Parvoviridae e possuem uma fita simples de DNA como genoma. Seus vírions não são envelopados e são considerados resistentes a condições ambientais adversas de temperatura e umidade, e a alguns desinfetantes, sendo sensíveis ao hipoclorito de sódio^[2,8]. A maioria dos desinfetantes comuns não inativam o CaPV, porém a exposição ao hipoclorito de sódio (1 parte em 30 de água) por 10 minutos é considerada eficaz^[6].

O CaPV-2 original foi substituído na população canina por dois subtipos, o CPV-2a e o CPV-2b, que possuem semelhança genética de 98% com o vírus da panleucopenia felina, podendo infectar e produzir doença indistinguível da panleucopenia felina em gatos^[9]. A partir de 2000 a variante genética CaPV-2c tem sido descrita em países como Itália, Espanha, Vietnã e EUA^[5].

Após a infecção, o CaPV se replica inicialmente no tecido linfoide da orofaringe, nos linfonodos mesentéricos e no timo, produz viremia e se dissemina nas criptas do intestino, podendo atingir ainda na medula óssea e em órgãos como pulmão, coração, baço, fígado e rins. Tanto o coronavírus quanto o rotavírus canino não produzem viremia e infectam as células do epitélio das vilosidades intestinais, produzindo atrofia, enquanto o parvovírus canino infecta as células responsáveis pela renovação desse epitélio e as células das criptas intestinais, produzindo destruição e colapso das vilosidades^[6].

Diagnóstico

Clinicamente, suspeita-se de infecção pelo CaPV-2 quando há a apresentação súbita de vômito, depressão e diarreia sanguinolenta em cães sem histórico de vacinação ou insuficientemente protegidos contra o vírus.

a) Epidemiologia

O CaPV-2 é transmitido pela rota fecal-oral, sendo excretado nas fezes de cães por 3 a 10 dias após a convalescência, porém alguns cães podem excretar o vírus nas fezes por um período maior^[2]. Cães de todas as idades podem ser infectados, porém animais jovens desenvolvem sinais clínicos com maior frequência. Como a prevalência de anticorpos na população canina é alta, acredita-se que a maioria das infecções seja assintomática. Além dos cães, lobos, coiotes, raposas e outros canídeos são susceptíveis à infecção pelo CaPV.

b) Sinais clínicos

A parvovirose canina é caracterizada clinicamente por depressão, anorexia, vômito e diarreia sanguinolenta, acompanhada de desidratação e emagrecimento rápido em filhotes com seis a doze semanas de idade. Doença generalizada neonatal e miocardite em filhotes são menos frequentes, pois o uso comum de vacinas e a transferência de imunidade passiva protegem os filhotes na fase de ocorrência dessas síndromes. Os sinais clínicos geralmente são observados três a sete dias após a infecção, quando o vírus se replica e promove a lise de células com atividade mitótica (medula óssea, tecidos linfoideos, epitélio intestinal e miocárdio)^[8,9]. A morte pode ocorrer entre 48 e 72 horas após o início dos sinais clínicos^[3]. A infecção geralmente é mais severa em filhotes caninos, principalmente em animais com infecções concomitantes por helmintos, protozoários, bactérias entéricas como *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. Ademais, cães de algumas raças, como Rottweiler, Doberman, Pinscher, labrador, American Staffordshire terrier, pastor-alemão e cães de trenó do Alaska parecem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença^[6].

O CaPV-1 somente foi associado à doença em 1992. Até então era detectado nas fezes de cães sem sinais clínicos^[9]. Embora seja considerado um vírus prevalente na população canina, são escassos os relatos de doença produzida por esse vírus^[7]. Clinicamente, a infecção é caracterizada por pneumonia, miocardite e enterite em filhotes com até três semanas de idade, além de infecção transplacentária em fêmeas prenhas, produzindo reabsorção embrionária e morte fetal^[7,9].

c) Patologia

Achados de necropsia, como congestão intestinal, superfície serosa granular e intestinos inelásticos e hemorrágicos, são sugestivos de parvovirose. Na histologia, pode-se encontrar atrofia do timo, rarefação dos folículos linfoides no baço e em linfonodos, necrose do epitélio intestinal com destruição das criptas de Lieberkühn e achatamento das vilosidades pela não reposição do epitélio. Edema pulmonar, necrose do miocárdio com inclusões basofílicas intranucleares nas fibras musculares e extensiva infiltração de linfócitos também podem ser relatados quando ocorre miocardite por parvovírus^[8].

d) Diagnóstico laboratorial

A suspeita clínica de parvovirose canina geralmente é confirmada com a detecção de vírus ou抗ígenos virais nas fezes dos animais, pela realização de técnicas como hemaglutinação (HA), microscopia eletrônica (ME), isolamento viral ou ainda por reação da polimerase em cadeia (PCR). Para o isolamento, podem-se utilizar células de linhagem de caninos e felinos, como a CRFK e a MDCK^[9]. Por ME pode-se detectar um grande número de partículas virais nas fezes, porém o método mais empregado para a detecção do CaPV-2 nas fezes é a HA (com hemácias de suínos ou de macacos rhesus), seguida pela confirmação por inibição da hemaglutinação (HI) com um antissoro específico^[8,9].

A técnica LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) é considerada mais sensível e rápida que a PCR para a detecção do DNA viral. O produto final dessa técnica é um precipitado branco, que contém pirofosfato de magnésio, visível a olho nu, sem a necessidade de gel de eletroforese, possuindo uso potencial para o diagnóstico da infecção pelo CaPV-2^[4]. Na hematologia, pode-se encontrar linfopenia e leucocitose^[2].

A detecção de抗ígenos virais nas fezes ou em *crio-secções* de intestino por imunofluorescência (IFD) também se constitui em um método de diagnóstico rápido da infecção^[3]. Um teste de imunocromatografia (FASTest PARVO Strip) baseado na detecção de抗ígenos virais nas fezes com anticorpos monoclonais também tem sido utilizado em alguns países para o diagnóstico da infecção pelo CaPV-2 (MegaCor, Horbranz, Áustria).

Testes de ELISA estão disponíveis comercialmente para a detecção de抗ígenos nas fezes, sendo considerados rápidos e relativamente baratos. Porém alguns desses kits possuem uma alta ocorrência de falso-positivos, e por esse motivo os resultados desse teste devem ser interpretados com cautela^[9]. Testes de ELISA para a detecção de IgM e IgG no soro de cães têm sido desenvolvidos, podendo indicar infecção recente em cães não vacinados ou, ainda, avaliar a resposta vacinal de cães. Esses testes já estão disponíveis comercialmente e são conhecidos como *ImmunoComb test*, pois detectam anticorpos contra o vírus da cinomose e o parvovírus canino^[10]. Soro-logicamente pareada por HI também pode ser empregada em amostras de soro de cães não vacinados e com suspeita clínica de infecção por CaPV. Esse teste pode também ser utilizado para estimar a indução de resposta após a aplicação de imunógenos^[8].

e) Diagnóstico diferencial

Infecções por outros vírus que produzem diarreia, como o vírus da cinomose, o coronavírus canino, o adenovírus canino tipo 1 ou o rotavírus canino devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial da parvovirose. O coronavírus canino e o rotavírus canino não produzem viremia, infectando somente as células epiteliais das vilosidades intestinais. Na ausência de patógenos entéricos concomitantes, as infecções produzidas por esses dois agentes são mais brandas que a parvovirose e raramente se observa sangue nas fezes.

Infecções bacterianas entéricas, parasitas como *Ancylostoma* spp. e *Trichuris vulpis* e protozoários como toxoplasmose, giardíase, isosporose e neosporose, que produzem diarreia, também devem ser diferenciados da infecção pelo CaPV-2^[6].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Fezes devem ser colhidas e acondicionadas sob refrigeração e enviadas para o laboratório. Tonsilas, linfonodos retrofaríngeos, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, timo, baço, medula óssea e intestino também podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção após a morte do animal^[8,9].

Referências bibliográficas

1. BINN, L.N. et al. Recovery and characterization of a minute virus of canines. **Infectious Immunology**, n. 1, p. 503-508, 1970.
2. CARMAN, P.S.; POVEY, R.C. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. **Research in Veterinary Science**, v. 38, p. 134-140, 1985.
3. CARTER, G.R.; WISE, D.J. Parvoviridae. A Concise Review of Veterinary Virology. In: Carter G.R.; Wise D.J.; Flores E.F. **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, 2005. Disponível em: <www.ivis.org>, Acesso em: 10 mar. 2009.
4. CHO, H.S. et al. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 1, p. 81-84, 2006).
5. HONG, C. et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 5, p. 535-539, 2007.
6. McCAW, D.L.; HOSKINS, J.D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St Louis: Saunders Elsevier, 2006, Cap. 8, p. 63-73.
7. MOCHIZUKI, M. et al. Virologic and serologic identification of minute virus of canines (Canine Parvovirus Type 1) from dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3993-3998, 2002.
8. MURPHY, F.A. et al. Parvoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic, 1999, p. 343-356.
9. TRUYEN, U. Canine Parvovirus. In: CHARMICHAEL, L.E. Recent Advances In **Canine Infectious Diseases**, Munchen, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/toc.asp>. Acesso em: 14 jan. 2009.
10. WANER, T. et al. Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. **The Veterinary Record**, n. 152, p. 588-591, 2003.

2.3 Coronavirose⁷

Conceito

O coronavírus canino (CCoV) foi descrito inicialmente em 1971 na Alemanha, em cães militares com diarreia^[1], e produz gastrorenterite branda em cães^[7]. Surtos mais graves de gastroenterite por isolados virulentos de coronavírus têm sido relatados em cães^[6], além de infecções concomitantes fatais com o parvovírus, o adenovírus ou ainda o vírus da cinomose^[2,10,11].

Etiologia e Patogênese

O coronavírus canino (CCoV) pertence à família Coronaviridae, tem uma fita simples de RNA com polaridade positiva como genoma e possui envelope lipídico^[9]. Um coronavírus tem sido detectado no trato respiratório de cães com doença respiratória. Análises filogenéticas desses isolados revelaram homologia com os coronavírus respiratórios de bovinos (BCoV, 98,8%) e humanos (HCoV-OC43, 98,4%), e pouca semelhança com o CCoV entérico (68,53%)^[7]. O CCoV perde a infectividade após 40 horas nas fezes à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), e 60 horas a 4°C, sendo inativado pela maioria dos desinfetantes comerciais. Após a ingestão, esse vírus se localiza no epitélio das vilosidades intestinais, sendo transportado às placas de Peyer e tecidos linfoides regionais após a passagem pelas células M^[8].

Diagnóstico

Como existem várias causas de diarreia em cães, a suspeita clínica de infecção por coronavírus canino somente pode ser confirmada por testes laboratoriais.

a) Epidemiologia

A principal fonte do vírus são as fezes de cães infectados e fômites contaminados, e o contágio ocorre pela via oral^[9]. A excreção de vírus nas fezes ocorre por 6 a 9 dias, ou até duas semanas, porém alguns estudos demonstraram a excreção por períodos maiores, entre 37 e 180 dias^[4]. A infecção por coronavírus em cães é contagiosa, apresenta um período de incubação curto, e esse vírus se dissemina rapidamente em populações suscetíveis, como em feiras e canis, onde ocorre aglomeração de animais^[5].

b) Sinais clínicos

Cães de todas as idades e raças são suscetíveis à infecção, porém os filhotes são mais sensíveis e desenvolvem sinais clínicos, como apatia, vômitos, letargia, perda de apetite, fezes amolecidas de coloração alaranjada a diarreia fluída que pode apresentar sangue, produzindo desidratação entre 1 e 4 dias após a infecção^[8,7].

A maioria dos cães se recupera entre 8 e 10 dias após o início dos sinais clínicos, que são mais brandos do que aqueles relatados em cães com parvovirose. No entanto, infecções concomitantes com o parvovírus canino, adenovírus canino, vírus da cinomose ou ainda com parasitas, bactérias como *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Helicobacter* spp. e *Salmonella* spp. podem ser mais severas, produzindo mortalidade^[8].

c) Patologia

Como a mortalidade associada a essa infecção é baixa, as necropsias são pouco frequentes, e as lesões encontradas são aumento de volume do intestino delgado, com conteúdo líquido

⁷ Nota do revisor: Termo ainda não incorporado ao Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa.

e de coloração amarela ou verde, e a mucosa intestinal encontra-se hiperêmica e, em alguns casos, hemorrágica. Os linfonodos mesentéricos podem estar com o volume aumentado, edematosos. Microscopicamente, ocorre atrofia e fusão das vilosidades intestinais, depressão das criptas, achatamento das células epiteliais, aumento no número de celulas da lâmina própria e aumento de células globosas^[5,7].

d) Diagnóstico laboratorial

O CCoV pode ser visualizado por microscopia eletrônica nas fezes, sendo necessários 10^6 vírions para a detecção, ou ainda isolado em culturas primárias ou células de linhagem canina A-72 e felina CRFK^[9,7]. Em amostras não concentradas de fezes, a ME pode produzir resultados falso-negativos. No entanto, o isolamento do coronavírus canino dificilmente é realizado^[12]. Nesse sentido, outras técnicas, como a RT-PCR e a TaqMan® RT-PCR (PCR em tempo real), têm auxiliado na detecção do agente, além de permitir estudos de distribuição e variabilidade genética desse vírus^[7,12]. Em testes de vacinas experimentais, essa técnica detectou quantidades menores de vírus em amostras de fezes que resultaram negativas no isolamento viral. Consequentemente, a excreção de vírus nas fezes foi detectada por períodos maiores por RT-PCR, indicando a maior sensibilidade desse teste^[4,12].

Alguns laboratórios obtiveram sucesso no isolamento do vírus em células primárias de rim, timo e sinóvia canina, células de linhagem de rim canino A-72, que são particularmente suscetíveis ao CCoV, além de células de embrião e de linhagem de rim felino CRFK^[7,5]. O vírus produz efeito citopático caracterizado pela formação de sincícios, e a confirmação do isolamento pode ser realizada com a detecção de antígenos por imunofluorescência. Essa técnica também pode ser realizada em *crio-secções* de intestino para detecção de antígenos virais diretamente no tecido infectado^[5].

A detecção de anticorpos no soro possui valor diagnóstico limitado, pela influência de anticorpos derivados de imunidade materna, vacinação ou ainda pelo fato de o vírus estar amplamente distribuído na população canina mundial e a infecção geralmente ser subclínica. Além disso, esse agente frequentemente não produz viremia, isto é, a infecção é localizada no trato gastrointestinal, ocorrendo pouca ou nenhuma estimulação da imunidade sistêmica. Nesses casos, testes de detecção de IgA nas fezes, como kits de ELISA, podem auxiliar o diagnóstico da infecção por coronavírus em cães não vacinados^[9,3]. A sorologia pareada, com a coleta de uma amostra de soro no início da infecção e de uma segunda amostra de soro 14 a 21 dias após a primeira, poderia ser útil, demonstrando soroconversão. Testes sorológicos podem ainda ser utilizados para verificação de títulos pós-vacinais. Para isso, técnicas como soroneutralização viral (SN), imunoperoxidase (IPX) e ELISA podem ser empregadas^[7].

e) Diagnóstico diferencial

A detecção do vírus nas fezes ou no intestino constitui-se na melhor forma de diagnóstico, diferenciando a enterite por coronavírus de outros agentes entéricos, como o parvovírus, rotavírus, picornavírus, vírus da cinomose e adenovírus canino tipo 1^[7]. Deve-se levar ainda em consideração no diagnóstico diferencial a presença de helmintos, como *Toxocara canis*, *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum*, *Trichuris vulpis* e *Toxascaris leonina*, ou ainda infecções por protozoários, como a giardíase, toxoplasmose, neosporose, isosporose, e por bactérias, como *Salmonella* spp., *E. coli* e *Clostridium perfringens*, que produzem diarreia em cães. Ingestão de alimentos deteriorados ou de lixo, mudança súbita de dieta, dieta com alto teor de gordura, intolerância à lactose, administração de medicamentos, como aspirina, doenças endócrinas, como hipertireoidismo e neoplasias, também são causas comuns de diarreia em cães.

Diferenças entre a infecção produzida pelo CCoV e pelo CaPV-2 incluem a localização no intestino: enquanto o CaPV-2 infecta e promove a lise de células das criptas, o coronavírus canino replica-se no epitélio das vilosidades, desde o duodeno até o íleo. Quanto à severidade clínica, pode-se dizer que o CaPV-2 geralmente produz sinais mais graves, e a ocorrência de viremia é observada somente na parvovirose e incomum na coronavirose^[5,2].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de fezes ou porções de intestino podem ser submetidas refrigeradas para o diagnóstico da infecção. Soro separado do coágulo pode ser utilizado para a sorologia.

Referências bibliográficas

1. BINN, L.N. et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. **Proceedings of Annual Meeting US Animal Health Association**, v. 78, p. 359-366, 1974.
2. DECARO, N. et al. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. **New Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 177-181, 2004a.
3. DECARO, N. et al. Fecal Immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 102-105, 2004b.
4. DECARO, N. et al. Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. **Journal of Virological Methods**, n. 130, p. 72-78, 2005.
5. EUGSTER, A. Canine Coronavirus. In: CASTRO, A.E., HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**. A practitioner's guide. 1. ed., St Louis: Mosby Year Book, 1992, p. 138-141.
6. EVERMANN, J.F., ABBOTT, J.R., HAN, S. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 610-614, 2005.
7. LOVATO, L.T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007, cap. 24, p. 613-638.
8. McCAW, D.L.; HOSKINS, J.D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, Cap. 8, p. 63-73.
9. MURPHY, F.A. et al. Coronaviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999, p. 495-508.
10. PRATELLI, A. et al. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 11, p. 550-553, 1999.
11. PRATELLI, A. et al. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. **Journal of Veterinary Medicine**, n. 48, p. 385-392, 2001.
12. PRATELLI, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis, **Veterinary Research**, v. 37, p. 191-200, 2006.

2.4 Hepatite infecciosa

Conceito

A maioria das infecções pelo adenovírus canino tipo 1 em cães é subclínica ou inaparente. Cães de todas as idades são suscetíveis, podendo desenvolver sinais de infecção sistêmica, que pode evoluir para doença hiperaguda ou aguda, principalmente em cães com menos de 6 meses de idade^[6,5].

Etiologia e Patogênese

A hepatite infecciosa canina é causada pelo adenovírus canino tipo 1 (CAdV-1), que é antigenicamente relacionado ao adenovírus canino tipo 2 (CAdV-2). Esses vírus são classificados na família Adenoviridae, gênero *Mastadenovirus*, possuem uma fita dupla linear de DNA como genoma, seus vírions não são envelopados e no ambiente são considerados resistentes, podendo sobreviver por dias em temperatura ambiente e em fômites contaminados com secreções de cães infectados^[5]. Ademais, os adenovírus sobrevivem à exposição a vários químicos, como éter, clorofórmio, formalina, além de certas frequências de radiação ultravioleta. Todavia, são inativados por soluções de iodo, fenol e hidróxido de sódio, e não sobrevivem mais que cinco minutos a 50 ou 60°C.

O CAdV-2 é associado a doenças respiratórias, no entanto já foi isolado de cães com diarreia hemorrágica. Após a exposição oronasal, o CAdV-1 se replica nas tonsilas, se dissemina via linfáticos a outros linfonodos regionais e atinge a circulação sanguínea via ducto torácico. A viremia é observada entre 4 e 8 dias após a infecção, resultando na disseminação do vírus para os parênquimas hepáticos e renais e para as células endoteliais, e na excreção de vírus nas secreções e excreções^[2].

Diagnóstico

O conjunto de sinais sistêmicos pode direcionar o diagnóstico da hepatite infecciosa canina, porém somente a realização de testes laboratoriais pode confirmar o diagnóstico.

a) Epidemiologia

Além de infectar cães, o vírus pode infectar raposas, lobos, coiotes, ursos e gambás^[6]. O CAdV-1 é excretado nas secreções e excreções dos cães infectados, como saliva, fezes e urina. A excreção pela urina pode persistir por mais de 6 meses após a recuperação clínica do animal, constituindo-se na principal fonte de vírus para a transmissão a cães suscetíveis. Os animais suscetíveis adquirem a infecção pelo contato direto, pelas vias oronasal e conjuntival, ou indiretamente a partir de fômites contaminados^[8,6,5].

b) Sinais clínicos

O período de incubação da doença aguda é de 4 a 9 dias. Filhotes com infecção hiperaguda podem apresentar morte súbita, sem o desenvolvimento de sinais clínicos ou após três ou quatro horas de apresentação de sinais da doença^[6]. Essa forma clínica de morte súbita é frequentemente confundida com intoxicações.

Clinicamente, a hepatite infecciosa aguda é caracterizada por apatia, anorexia, hipertermia, dor abdominal, vômito e diarreia, petéquias na mucosa oral, linfadenopatia, sinais respiratórios, conjuntivite e fotofobia, que persistem por 5 a 7 dias^[7]. Outros sinais incluem distúrbios circulatórios, como tempo de coagulação prolongado, hemorragias e coagulação intravascular disseminada (CID), podendo-se observar ainda taquicardia, leucopenia, ascite serossanguinolenta e glome-

rulonefrite intersticial mediada pelo sistema imune^[6,3,8]. Entre 20% e 25% dos cães infectados naturalmente e 1% dos cães vacinados com cepas atenuadas do CAdV-1 apresentam lesões oculares, como opacidade de córnea. Por esse motivo, desde a década de 80 o CAdV-1 foi substituído nas vacinas comerciais por cepas atenuadas do CAdV-2^[6,5]. A icterícia não é comum na fase inicial da infecção, porém pode ser pronunciada em cães que sobrevivem à hepatite aguda. A infecção pelo CAdV-1 pode produzir encefalopatia hepática ou encefalite não supurativa. A encefalopatia hepática é causada por toxinas de origem gastrointestinal que não são metabolizadas adequadamente pelo fígado^[5]. A infecção do SNC pelo CAdV-1 não é comum, porém quando a encefalite não supurativa ocorre, são observados sinais de estupor, ataxia, convulsões e coma^[1].

c) Patologia

Na necropsia, pode-se observar icterícia das membranas mucosas e do tecido subcutâneo, fígado aumentado de tamanho, congeso, com pequenas manchas amareladas ou acinzentadas na superfície, o baço, os linfonodos e os rins podem estar congestos e a vesícula biliar edematosas^[5]. Os linfonodos podem estar ainda edemaciados e hemorrágicos. No abdômen, pode-se encontrar líquido de coloração clara ou avermelhada, as serosas dos órgãos com petéquias ou equimoses^[3,6,5]. Na histologia, observa-se necrose de coagulação multifocal ou necrose lobular generalizada no fígado em casos mais graves, pela destruição massiva de hepatócitos, além da presença de exsudato fibrinoso interlobular^[6,8]. Nos rins, pode-se encontrar hiperemia e expansão focal da matriz mesangial. Inclusões intranucleares podem ser observadas em células dos tecidos onde o vírus se replica, como os hepatócitos e as células dos glomérulos^[5].

d) Diagnóstico laboratorial

O CAdV-1 se replica em células endoteliais e reticuloendoteliais de órgãos como fígado, rins, baço e pulmões^[5]. O isolamento viral pode ser realizado a partir de sangue, urina (coletada por cistocentese), fezes (suabe retal no período febril) e secreção nasofaríngea dos animais vivos, em células de linhagem MDCK. Após a morte do animal, tecidos como linfonodos, pulmões, rins, baço e encéfalo também podem ser submetidos ao isolamento, com exceção do fígado, que não se constitui em uma boa amostra para isolamento por possuir elevados níveis de arginase, enzima que inibe a amplificação viral *in vitro*^[8].

Impressões de fígado e secções de tecido renal podem ser utilizadas para a detecção de antígenos do CAdV-1 por imunofluorescência^[8]. A imuno-histoquímica é utilizada em pesquisas para localizar抗ígenos virais em diferentes tecidos, determinando-se os tipos de células infectadas^[1]. A detecção do DNA do vírus em tecidos pode ser realizada pela técnica de PCR^[1]. Um PCR diferencial com um par de *primers* que amplifica uma região do gene da E3 dos adenovírus caninos, produzindo produtos de 508 pares de bases (bp) para o CAdV-1 e 1.030bp para o CAdV-2 foi desenvolvido^[4]. Essa técnica pode ser aplicada tanto em amostras de fígado colhidas na necropsia como em espécimes clínicos (secreção nasal, urina), constituindo uma alternativa para o diagnóstico das infecções produzidas pelos adenovírus caninos.

Os achados hematológicos nas infecções pelo CAdV-1 incluem leucopenia, neutropenia e linfopenia, observados no início da infecção. Distúrbios de coagulação são mais pronunciados durante a viremia, observando-se trombocitopenia, com ou sem alterações de função plaquetária. O tempo de protrombina (PT), o tempo de protrombina parcial ativada (aPTT) e o tempo de trombina (TT) podem estar variavelmente prolongados. Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (ALP) podem estar aumentados, dependendo principalmente da magnitude da necrose hepática. Bilirrubinúria moderada a marcada frequentemente é relacionada ao baixo limiar renal de bilirrubina conjugada. Proteinúria é um reflexo de lesão renal, podendo ser

detectada na urinanálise em concentrações superiores a 50mg/dl. A avaliação do fluido abdominal colhido por paracentese revela a presença de exsudato, com conteúdo proteico de 5,2 a 9,3g/dl^[8,2,5]. O liquor apresenta-se normal em cães com encefalopatia hepática, porém apresenta-se alterado em cães com encefalite não supurativa, verificando-se pleocitose mononuclear (mais de 10 células por mm³) e concentração de proteína aumentada (mais de 30mg/dl)^[2].

A sorologia pareada demonstrando soroconversão pode confirmar uma infecção recente pelo CAdV, porém por técnicas sorológicas convencionais não se consegue distinguir anticorpos produzidos contra o CAdV-1 e o CAdV-2, já que esses vírus possuem reação sorológica cruzada. Soma-se a isso que não há como distinguir animais vacinados de animais infectados. As técnicas empregadas para detecção de anticorpos são a soroneutralização, a inibição da hemaglutinação (com hemácias de aves) e a fixação do complemento. Alguns laboratórios disponibilizam testes de ELISA e imunofluorescência indireta para a detecção de IgG e IgM. Títulos superiores a 10 para IgM em cães não vacinados podem indicar infecção recente por adenovírus canino^[6,8].

e) Diagnóstico diferencial

Dependendo dos sinais clínicos apresentados pelos cães infectados, a hepatite infecciosa canina pode ser confundida com cinomose, parvovirose, traqueobronquite infecciosa, intoxicações, doenças hepáticas, pancreatite e outras causas de CID, outras causas de encefalopatia hepática, de uveíte, como lesões traumáticas, infecções bacterianas, como leptospirose, infecções por protozoários, como erliquiose, infecções por helmintos, como *Toxocara canis*, anomalias no metabolismo do cobre, observadas em cães Bedlington Terriers e Dobermann Pinschers e causas idiopáticas de hepatite crônica ativa (HCA), além de hepatite crônica induzida por drogas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Sangue, urina colhida por cistocentese, fezes (suave retal no período febril) e secreção nasofaríngea podem ser colhidos e submetidos para o diagnóstico laboratorial. Tecidos como fígado, rins, baço, encéfalo e pulmão podem ser enviados ao laboratório, refrigerados ou congelados, para a realização das técnicas de diagnóstico virológico^[8]. Para histologia e imuno-histoquímica, os tecidos não devem ser congelados, podendo ser enviados sob refrigeração ou ainda fixados em formol tamponado.

Referências bibliográficas

1. CAUDELL, D. et al. Diagnosis of infectious canine hepatitis virus (CAV-1) infection in puppies with encephalopathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 17, p. 58-61, 2005.
2. GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: _____. **Infectious Diseases of the dog and cat**, St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, Cap. 4, p. 41-47.
3. HERVÁS, J. et al. Focal mesangial-sclerosing glomerulonephritis and acute-spontaneous infectious canine hepatitis: structural, immunohistochemical and subcellular studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, p. 25-32, 1997.
4. HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v. 25, p. 77-84, 2001.
5. MORAES, M.P.; COSTA, P.R. Adenoviridae. In: **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, Cap. 16, p. 413-432.
6. MURPHY, F.A. et al. Adenoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic, 1999, p. 327-334.

7. PRATELLI, A. et al. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 385-392, 2001.
8. SWANGO, L.J. Infectious canine hepatitis and viral tracheobronchitis. In: CASTRO, A.C.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic Virology - a practitioner's guide**. St Louis: Mosby year book, 1992. p. 143-148.

2.5 Traqueobronquite infecciosa

Conceito

A traqueobronquite infecciosa canina (TIC), ou tosse dos canis, é uma doença produzida por diferentes vírus e bactérias, como o parainfluenzavírus canino tipo 2 (CPIV-2), adenovírus canino tipos 1 e 2 (CAdV-1 e CAdV-2), pela *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma Spp.* e *Ureaplasma Spp.* Contudo, os principais agentes envolvidos na TIC são o CPIV-2, o CAdV-2 e a *Bordetella bronchiseptica*^[7]. O herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) e os reovírus 1, 2 e 3 também têm sido isolados de cães com tosse ou sinais respiratórios, porém esses vírus não são considerados causa primária da síndrome descrita como traqueobronquite infecciosa canina.

Etiologia e Patogênese

O CPIV-2 pertence à família Paramyxoviridae, subfamília Paramyxovirinae, classificado no gênero *Rubulavirus*, e foi isolado pela primeira vez em 1967 em cães com sinais respiratórios nos Estados Unidos. Esse vírus possui como genoma uma fita simples de RNA com sentido negativo, é envelopado e pleomórfico. O CAdV-2 pertence à família Adenoviridae, gênero *Mastadenovirus*, e possui relação antigenica com o CAdV-1; possui uma fita dupla linear de DNA como genoma e não é envelopado^[4,5]. Esses agentes colonizam o epitélio da cavidade nasal, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e interstício pulmonar, e a infecção com somente um dos agentes geralmente é clinicamente leve e autolimitante. No entanto, infecções mistas podem ser mais severas.

Diagnóstico

O diagnóstico dessa doença aguda e altamente contagiosa do trato respiratório de cães é frequentemente realizado pelos sinais clínicos característicos, acompanhados de histórico de contato recente com outros cães. Uma radiografia de tórax demonstrando a inflamação na traqueia ou o aumento da densidade pulmonar, associado ao leucograma de estresse caracterizado por neutrofilia, linfopenia e eosinopenia, ou ainda um leucograma inflamatório com leucocitose e desvio à esquerda em cães com infecção bacteriana concomitante, podem auxiliar no diagnóstico da TIC^[6]. Contudo, como a TIC é uma doença multicausal, a etiologia da doença somente pode ser elucidada com a identificação do(s) vírus e bactéria(s) envolvido(s).

a) Epidemiologia

Tanto o CPIV-2 quanto o CAdV-2 produzem doença respiratória em seus hospedeiros, são disseminados por contato direto, pela secreção nasal (aerossóis), ou ainda indiretamente por fômites contaminados. A TIC possui um período de incubação de 3 a 10 dias, e cães infectados podem excretar o vírus em secreções por até duas semanas. Acredita-se que 70% dos cães urbanos possuam anticorpos contra o CPIV-2, que é considerado o vírus mais frequentemente isolado no trato respiratório de cães com traqueobronquite. A doença foi inicialmente denominada tosse dos canis por ser mais frequente em canis, feiras, abrigos de cães e outros locais onde ocorre aglomeração.

ração desses animais. Alguns fatores, como falta de higiene, estresse, aglomeração de animais e infecções concomitantes, agravam a doença^[4,5].

b) Sinais clínicos

A TIC possui distribuição mundial, sendo caracterizada pelo surgimento agudo de descarga nasal serosa, tosse seca, conjuntivite, tonsilite e febre, que permanecem por 3 a 14 dias. Quando ocorre infecção secundária por bactérias, os sinais podem ser mais severos, incluindo tosse produtiva, anorexia, prostração e pneumonia, que podem ser observados por até 30 dias^[7,4,5]. Reinfecções com ou sem sinais clínicos podem ocorrer com frequência, principalmente no inverno. A maioria das infecções é inaparente ou branda, com recuperação espontânea. Contudo, casos mais graves, com infecções concomitantes, podem ser fatais.

c) Patologia

Na análise microscópica, pode-se observar um infiltrado de células inflamatórias peribronquiolar e pneumonia intersticial em infecções pelo CPIV-2, e bronquiolite proliferativa necrotizante em casos de doença respiratória produzida pelo CAdV-2^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

Para identificar o CPIV-2 ou o CAdV-2 pode-se colher secreção nasal, nasofaríngea ou conjuntival, e após a morte do animal, tecidos como linfonodos, epitélio da traqueia e pulmão. O isolamento é realizado em células MDCK, A-72 e fibroblastos de pulmão para os dois vírus^[8,9,2]. Ademais, o CPIV-2 pode ser amplificado em ovo embrionado e em células renais de cães, humanos e macacos^[9]. Um PCR diferencial foi desenvolvido para CAdV-1 e CAdV-2, podendo ser aplicado em DNA extraído a partir de suabes nasais ou nasofaríngeos ou, ainda, nas mesmas amostras de tecidos coletados na necropsia^[3,7]. O CPIV-2 também pode ser detectado por RT-PCR em suabes e tecidos^[2].

A citologia do trato respiratório superior, avaliada por meio de lavado transtraqueal ou de broncoscopia, pode revelar muco, exsudato mucopurulento e bactérias^[6]. O lavado transtraqueal é realizado pela introdução e recuperação de solução salina morna no trato respiratório superior^[1].

A sorologia pareada demonstrando soroconversão também pode confirmar a etiologia da TIC. Para isso, pode-se utilizar soroneutralização, fixação do complemento, inibição da hemaglutinação e ELISA para o CAdV-2, e os testes de inibição da hemaglutinação e ELISA para o CPIV-2^[7,2]. A determinação de IgG ou IgM para ambos os vírus pode ser realizada por imunofluorescência indireta ou ainda por ELISA, indicando se ocorreu infecção recente em cães que não receberam vacina recentemente. A vantagem da detecção de IgG e IgM é a possibilidade de ser realizada em somente uma amostra de soro^[7].

e) Diagnóstico diferencial

Devem-se diferenciar as infecções pelo CPIV-2 e CAdV-2 das infecções bacterianas do trato respiratório e da infecção pelo vírus da cinomose, adenovírus canino tipo 1, herpesvírus canino tipo 1 e reovírus 1, 2 e 3. Outras enfermidades, como bronquite crônica, problemas cardiovasculares que induzem a tosse e dificuldade respiratória, também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da TIC.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico dessas infecções podem-se colher suabes nasais, nasofaríngeos ou conjuntivais, que são acondicionados em meio essencial mínimo (MEM), ou ainda tecidos como epi-

télio da traqueia, linfonodos e pulmão, enviando-os sob refrigeração ou congelados ao laboratório de virologia. Amostras de soro, separadas do coágulo, podem ser submetidas a sorologia.

Referências bibliográficas

1. BERKWITT, L.; PRUETER, J. Métodos diagnósticos para distúrbios respiratórios. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p. 592-597, 1998.
2. ERLES, K. et al. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4524-4529, 2004.
3. HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v. 25, p. 77-84, 2001.
4. MURPHY, F.A. et al. Adenoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic, 1999a, p. 327-334.
5. MURPHY, F.A. et al. Paramyxoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999b, p. 411-428.
6. SHERDING, R.G. Traqueobronquite Infecciosa Canina (Complexo da Tosse dos Canis). In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p. 117-119, 1998.
7. SWANGO, L.J. Infectious canine hepatitis and viral tracheobronchitis. In: CASTRO, A.C.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic Virology - a practitioner's guide**. St. Louis: Mosby year book, 1992. p. 143-148.
8. ZEE, Y.C. Adenoviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. Massachusetts: Blacwell Science, 1999a. Cap. 62, p. 346-349.
9. ZEE, Y.C. Paramyxoviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. Massachusetts: Blacwell Science, 1999b. Cap. 69, p. 403-411.

2.6 Herpesvírose

Conceito

O herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) apresenta distribuição mundial e produz infecção aguda, hemorrágica e fatal em neonatos. Em cães adultos, a infecção geralmente é leve, podendo ser caracterizada por sinais respiratórios ou lesões vesiculares na vulva e no prepúcio^[2,4,5,6].

Etiologia e Patogênese

O CaHV-1 é um alpha-herpesvírus da família Herpesviridae que possui uma fita dupla de DNA como genoma e vírions envelopados. Uma característica importante dos alpha-herpesvírus é a capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes^[1,2,5,6]. O CaHV-1 pode ser inativado por solventes lipídicos e temperaturas acima de 40°C, sobrevivendo até aproximadamente 22 horas a 37°C^[2]. O CaHV-1 é um vírus sensível a certas temperaturas, que se replica com maior eficiência em temperaturas abaixo de 37°C, e geralmente produz infecções localizadas no trato respiratório e no reprodutivo. Infecção generalizada é relatada em fetos e neonatos, ocorrendo viremia associada a leucócitos, hiperplasia linfoide, vasculite necrotizante e necrose hemorrágica multifocal em vários órgãos^[6].

Diagnóstico

O herpesvírus canino pode produzir sinais respiratórios em filhotes e adultos, e sinais reprodutivos em fêmeas prenhas, persistindo nos tratos reprodutivo e respiratório. Em condições de estresse e imunossupressão, pode ocorrer reativação da infecção latente, com ou sem a apresentação de sinais clínicos. Porém, o vírus é eliminado nas secreções e excreções, permitindo a transmissão a cães soronegativos e susceptíveis. A determinação da infecção neonatal em filhotes depende da informação obtida com a história clínica, o exame físico e as alterações observadas na necropsia. As alterações hematológicas e bioquímicas não são específicas, podendo observar-se trombocitopenia e aumento da alanina aminotransferase (ALT)^[6].

a) Epidemiologia

Estudos epidemiológicos indicam que 30% a 100% dos cães domésticos apresentam anticorpos contra o CaHV-1, que possui distribuição mundial^[6,5]. Animais que possuem infecção latente podem reativar a infecção com ou sem recrudescência clínica, porém esses animais excretam o vírus, favorecendo a disseminação do CaHV-1 entre os cães e a sua manutenção na natureza, uma vez que esse vírus não é estável no ambiente^[6,5]. A infecção se dissemina rapidamente entre os filhotes de uma ninhada. A mãe pode ser portadora do vírus, que permanece em estado de latência e pode reativar-se em condições de estresse, durante a gestação ou o parto.

Por PCR foi demonstrado que o vírus permanece em latência no gânglio trigêmico, no gânglio lombossacral, nas tonsilas e na glândula parótida^[1,2,6]. Outros cães que entram em contato com a mãe ou a com ninhada também podem servir como fonte de vírus, que é excretado por no mínimo uma semana em secreções^[2,5]. A transmissão do vírus da mãe para os fetos pode ocorrer pela placenta, produzindo aborto e infertilidade quando ocorre a partir de 30 dias de gestação, ou o nascimento de filhotes fracos que morrem logo após o parto quando a infecção ocorre no final da gestação. Além disso, os filhotes podem ser infectados durante o parto, pelo contato com a secreção vaginal^[2]. Filhotes e cães adultos podem ainda adquirir a infecção por contato direto com secreção oral, nasal e genital de animais infectados, ou por fômites contaminados^[2,6,7].

b) Sinais clínicos

A infecção de fêmeas prenhas pode resultar em infertilidade, aborto, nascimento de filhotes fracos que morrem logo após o nascimento, ou ainda são aparentemente saudáveis, porém desenvolvem infecção generalizada aproximadamente 9 dias após o nascimento. Esses filhotes podem sobreviver, com sinais neurológicos residuais. Filhotes infectados antes de completar quatro semanas de idade apresentam sinais sistêmicos, ocorrendo óbito entre 24 e 48 horas após a manifestação da doença. São relatados sinais como anorexia, dispneia, depressão, hipotermia, choro incessante, fezes amolecidas amareladas ou esverdeadas, sinais neurológicos como cegueira e incoordenação, dor abdominal, hemorragia nas narinas, mucosas ou pele^[7,2]. A infecção generalizada é associada a vários fatores, como o status imune do animal e a incapacidade de regulação da temperatura corporal até essa idade, pois o centro termorregulador no hipotálamo ainda não está completamente desenvolvido^[7,2,6]. A mortalidade da ninhada pode chegar a 100%^[5].

Filhotes com mais de quatro semanas de idade e cães adultos podem desenvolver sinais respiratórios, ou ainda lesões vesiculares genitais^[7]. Os sinais respiratórios podem ser leves ou inaparentes, e as lesões genitais são papulovesiculares, caracterizadas por hiperemia, petéquias, equimoses e hemorragia da submucosa do trato reprodutivo^[6].

c) Patologia

Na necropsia, podem ser observadas congestão pulmonar, lesões hemorrágicas multifocais e necrose nos rins, fígado, pulmões, encéfalo e intestino, além da placenta de fêmeas que abortaram^[2,3,5]. Equimoses também podem ser observadas no trato gastrointestinal, nos rins e nas adrenais. Outras lesões, como edema pulmonar, baço e linfonodos aumentados, meningoencefalite e corpúsculos de inclusão em células do fígado e outros tecidos com necrose, também podem ser observados em cães infectados pelo CaHV-1^[2,3,6]. As infecções genitais são caracterizadas por lesões nodulares focais na vagina, base do pênis e ou prepúcio, hiperemia e equimoses na mucosa e descarga vaginal^[2,6].

d) Diagnóstico laboratorial

O CaHV-1 é amplificado em células renais caninas, primárias ou da linhagem MDCK, além de células primárias de testículo, sendo amplificado em temperaturas entre 33 e 37°C^[4,10]. Crioseções dos diferentes tecidos podem ser submetidas à imunofluorescência para detecção de抗ígenos virais^[3]. Por PCR é possível detectar o CaHV-1 em várias amostras de tecidos e em secreções de animais infectados^[1].

A sorologia pareada, com a demonstração de soroconversão, pode ser utilizada para diagnosticar uma infecção recente pelo CaHV-1, entretanto raramente se observam títulos de anticorpos maiores que 32^[4]. Para isso, são utilizados testes como soroneutralização ou ELISA^[4,9]. A detecção de IgM e IgG por ELISA em uma única amostra de soro também pode indicar infecção recente^[8].

e) Diagnóstico diferencial

A morte neonatal de cães pode possuir duas causas virais: o CaHV-1 ou os parvovírus caninos tipos 1 e 2. O CadV-1 também pode produzir sinais sistêmicos e morte súbita em filhotes caninos. Sinais do trato reprodutivo devem ser diferenciados da infecção por *Brucella canis*, que produz aborto entre 45 e 55 dias de gestação em 75% das fêmeas prenhas infectadas. Os sinais respiratórios da infecção pelo CaHV-1 devem ser diferenciados de traqueobronquite infecciosa canina, cinomose, parasitose e infecções bacterianas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para diagnóstico virológico da infecção pelo CaHV-1 podem ser utilizadas amostras de pulmão, fígado, baço, rins, linfonodos, glândula ad-renal e sistema nervoso central (SNC) dos neonatos que morreram com infecção generalizada, e placenta ou feto inteiro quando ocorre aborto, colhidos com antisepsia e enviados congelados ou refrigerados para a virologia, ou fixados em formol 10% para a histologia^[4,5]. Suaves nasais, orais, conjuntivais e vaginais podem ser colhidos de filhotes e cães adultos com suspeita de traqueobronquite ou infecção genital, lembrando que amostras para isolamento viral sempre devem ser enviadas resfriadas rapidamente ao laboratório^[2,4,5,7].

Referências bibliográficas

1. BURR, P.D. et al. Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 3-4, p. 227-237, 1996.
2. CARMICHAEL, L. In: _____. Recent Advances in Canine Infectious Diseases, **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY (www.ivis.org), 2004.
3. CARTER, G.R.; WISE, D.G.; FLORES, E.F. Herpesviridae. In: _____. A concise review of veterinary virology, **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY (www.ivis.org), 2006.

4. EVERMANN, J.F. Canine herpesvirus. In: CASTRO, A.C.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic Virology - a practitioner's guide**. St. Louis: Mosby year book, 1992. p. 141-143.
5. FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 435-485. Cap. 17.
6. GREENE, C.E.; CARMICHAEL, L.E. Canine herpesvirus infection. In: **Infectious Diseases of the dog and cat**. St Louis: Saunders Elsevier, Cap. 5, 2006, p. 47-53.
7. MURPHY, F.A. et al. Herpesviridae. _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999, p. 301-326.
8. READING, M.J.; FIELD, D.J. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. **Archives of Virology**, v. 143, n. 8, p. 1477-1488, 1998.
9. RIJSEWIJK, F.A.M. et al. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998. **Veterinary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1-7, 1999.
10. STRANDBERG, J.D.; AURELIAN, L. Replication of canine herpesvirus. II. Virus development and release in infected dog kidney cells. **Journal of Virology**, v. 4, n. 4, p. 480-489, 1969.

2.7 Raiva

Conceito

A raiva é uma doença neurológica geralmente fatal que atinge os mamíferos, apresentando distribuição mundial^[2].

Etiologia e Patogênese

A raiva é produzida por um Lyssavirus neurotrópico classificado na família Rhabdoviridae^[6]. As partículas virais são envelopadas, com um formato característico de bala, e possuem uma fita simples de RNA com polaridade negativa como genoma^[5,6]. A doença apresenta distribuição mundial, porém algumas regiões ao redor do mundo têm limitado a ocorrência da infecção em cães com a imunização maciça, diminuindo, assim, o risco de transmissão para o homem^[1,4]. Nesses países, a raiva silvestre tem ganhado importância pela possibilidade de transmissão do vírus a animais domésticos e, principalmente, para humanos^[1,5].

Diagnóstico

Como a raiva é uma zoonose, o diagnóstico de cães infectados pelo vírus da raiva representa um risco para a saúde pública.

a) Epidemiologia

A transmissão do vírus da raiva ocorre principalmente pela saliva do cão infectado e depende de uma porta de entrada, como a mordedura^[3,5]. O período de incubação da raiva varia de 5 dias a semanas ou meses, sendo considerado longo e dependente do local e da profundidade da mordida, do título viral presente na saliva, bem como da disseminação do vírus da musculatura e tecidos adjacentes para as terminações nervosas^[1,5]. Períodos de incubação de 14 a 90 dias são mais frequentes^[5].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença pode ser dividida em três fases: prodrômica, furiosa e um estágio final de paralisia. Inicialmente, o animal apresenta sinais inespecíficos, como letargia e fadiga. Na

forma furiosa, os cães apresentam salivação intensa, hiperestesia, hidrofobia, resposta exagerada à luz e som; ficam agressivos, nervosos, mordendo pessoas e outros animais, facilitando assim a transmissão do agente. A fase paralítica é o estágio final da doença, caracterizada por convulsões, coma e dificuldade respiratória. A doença em cães apresenta curso clínico de 2 a 14 dias^[3,5].

c) Patologia

No exame histopatológico, a detecção dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em neurônios, denominados corpúsculos de Negri, é considerada patognomônica^[3]. Pode, também, existir evidência moderada de disfunção, morte neuronal e infiltrado de células inflamatórias^[5,4].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento e a amplificação do vírus podem ser realizados a partir de saliva, de tecidos ou do encéfalo inoculados em células BHK ou linhagem de neuroblastoma. No entanto, essa técnica não é muito utilizada pelo risco de contaminação dos técnicos de laboratório^[3,1,6]. Na microscopia eletrônica, detectam-se as partículas víricas no SNC. Por imunofluorescência direta (IFD), podem-se detectar抗ígenos do vírus em impressões do SNC. Antígenos podem ser evidenciados também por imuno-histoquímica, porém pela rapidez a técnica de IFD é considerada de eleição para o diagnóstico de raiva^[3].

A inoculação intracerebral de camundongos lactentes com uma suspensão de cérebro a 10% em meio essencial mínimo é utilizada como prova biológica da raiva. Esses animais são observados por 30 dias para confirmação do resultado, pois os sinais clínicos de raiva nos camundongos lactentes ocorrem entre 4 e 21 dias após a inoculação^[3,5]. A técnica de RT-PCR também tem sido descrita para o diagnóstico da raiva, apresentando maior sensibilidade quando comparada com os métodos comumente empregados para o diagnóstico^[5].

Técnicas sorológicas não são comumente empregadas para o diagnóstico da infecção em cães. No entanto, a detecção de anticorpos contra o vírus no liquor poderia ser utilizada para confirmar a infecção. A sorologia pode ser empregada para o teste de eficácia ou cobertura vacinal. Para isso, são empregadas técnicas como soroneutralização, teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT: *rapid fluorescent focus inhibition test*), contraimunoelétroforese, inibição da imunoperoxidase e ELISA^[6].

e) Diagnóstico diferencial

Cinomose, hepatite infecciosa canina e outras causas de encefalite, como a doença de Aujeszky, neoplasias, tétano, pasteurelose, botulismo, intoxicação por estricnina, atropina, eclâmpisia e traumas cranianos devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial da raiva.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O cérebro de cães suspeitos de raiva deve ser colhido preferencialmente inteiro, com cuidados no manuseio para não ocorrer contaminação, utilizando equipamentos de proteção individual, evitando contato com o SNC ou ainda com a mucosa oral e a saliva do animal. Metade do encéfalo pode ser submetida refrigerada e acondicionada em caixa isotérmica. Se for necessária a dissecação, preferencialmente a amostra deve incluir a medula espinhal, o cerebelo e hipocampo^[3]. Técnicas de diagnóstico em amostras de pacientes vivos são aplicadas somente em suspeitas de casos em humanos, a partir de saliva, impressão de córnea e amostra de tecido do local da mordida^[5]. Parte do encéfalo pode ser fixada em formol para a patologia e, alternativamente, a cabeça inteira do animal também pode ser enviada. Quando não é possível refrigerar a amostra de encéfalo, recomenda-se a imersão em líquido de Vallée (glicerina 50% tamponada com tampão

fosfato, glicerina neutra, 50%; em água destilada, pH 7,4 a 7,8), que mantém a viabilidade do vírus por algumas horas ou dias^[6].

Referências bibliográficas

1. BINGHAM, J. Canine rabies ecology in southern Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1337-1342, 2005.
2. BELOTTO, A. et al. Review of rabies in the Americas. **Virus Research**, v. 111, p. 5-12, 2005.
3. DEBBIE, J.G.; TRIMARCHI, C.V. Rabies. In: CASTRO, A.C.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic Virology - a practitioner's guide**. St Louis: Mosby year book, 1992. p. 116-120.
4. JACKSON, A.C. Rabies pathogenesis. **Journal of Neurovirology**, v. 8, p. 267-269, 2002.
5. MURPHY, F.A. et al. Rhabdoviridae. _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999, p. 429-444.
6. RODRIGUEZ, L.L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007, p. 689-720. Cap27.

2.8 Papilomatose

Conceito

A papilomatose canina é uma doença proliferante, localizada na pele, que apresenta resolução espontânea. Essas neoplasias mucocutâneas de origem epitelial geralmente são benignas e representam 12,5% das neoplasias de pele dos cães^[8].

Etiologia e Patogênese

A papilomatose canina é produzida pelo papilomavírus canino, que é classificado no grupo 2 da família Papilomaviridae. Esses vírus possuem uma fita dupla de DNA circular como genoma e não são envelopados, sendo resistentes ao éter e ao clorofórmio e relativamente estáveis no ambiente^[4,8,1]. São considerados espécie-específicos, oncogênicos e, apesar da ausência de reatividade cruzada, os papilomavírus de humanos, bovinos, equinos, caninos e felinos compartilham ao menos um determinante grupo-específico^[8]. Estudos com papilomavírus são escassos devido à dificuldade de amplificação e manutenção de isolados *in vitro*, uma vez que esses agentes não são amplificados com células de linhagens^[4,1].

Diagnóstico da doença

O diagnóstico da papilomatose canina é realizado com base na epidemiologia e nas características macroscópicas das lesões. Portanto, raramente se realiza a confirmação laboratorial da infecção^[8].

a) Epidemiologia

A transmissão ocorre principalmente pelo contato direto com as lesões em cães infectados, sendo necessária uma porta de entrada na pele dos animais para que ocorra a infecção. O período de incubação pode ser de 1 a 2 meses^[8].

b) Sinais clínicos

Várias síndromes clínicas têm sido associadas ao papilomavírus canino: papilomatose oral, papilomatose cutânea, papilomatose venérea, papilomas cutâneos invertidos e as placas pigmentadas caninas associadas ao papilomavírus. No entanto, duas formas da infecção pelo papilomavírus canino são relatadas com maior frequência: a oral e a cutânea. A forma mais comum é a oral, produzida pelo COPV e caracterizada pelo desenvolvimento de papilomas pequenos (1 a 2cm) e pedunculados na cavidade oral, na gengiva e na palato, e em casos mais graves também na língua, faringe e ao redor da boca e dos olhos. Papilomas oculares podem ocorrer nas margens das pálpebras, da córnea e da conjuntiva.

A forma cutânea, produzida pelo CPV-1, é menos frequente, observada em animais mais velhos, machos, podendo ocorrer tanto na forma de lesões únicas como multifocais^[7,4,8,1]. Os papilomas cutâneos invertidos ocorrem no ventre e na região inguinal de cães, são pequenos, firmes, com um formato de copo, possuindo um núcleo de queratina e uma pequena abertura para a superfície da pele. Essa forma possui superfície semelhante à de epitelomas intracutâneos, e o que os diferencia é a projeção papilar na epiderme, presente nos papilomas^[8].

O papiloma canino produz hiperplasia do epitélio escamoso normal estratificado ou ainda do epitélio escamoso estratificado metaplástico^[2]. As lesões regredem espontaneamente, em quatro a oito semanas, porém a papilomatose oral pode persistir por mais de 2 anos. A papilomatose cutânea pode persistir por 6 a 12 meses. No entanto, quando as lesões orais são extensas, dificultam a apreensão de alimento, podendo promover o emagrecimento do animal, sendo comum a ocorrência de traumatismos^[8]. Animais com imunidade deprimida, devido a doenças concomitantes, são mais suscetíveis^[2,6]. Nesses casos, pode ser indicada a criocirurgia, a eletrocirurgia ou ainda a excisão cirúrgica das lesões^[6,4].

Para estimular a resposta imune e, com isso, a regressão mais rápida das lesões, podem ser desenvolvidas vacinas autógenas. Para isso, algumas lesões são removidas, maceradas e processadas para a síntese de uma vacina inativada, que é aplicada pela via intramuscular, geralmente com três aplicações, em intervalos mínimos de duas semanas. Clinicamente, a infecção inicia com uma região pequena da pele esbranquiçada e com aumento de volume. Essas regiões aumentam e formam lesões com aspecto de couve-flor, características da hiperplasia do epitélio. Com menor frequência, as lesões podem ser observadas na pálpebra^[2].

c) Patologia

A análise histológica de tecidos e lesões coletados por biópsia revela tumores benignos de pele ou mucosa, caracterizados pela presença de inclusões intranucleares eosinofílicas, grânulos kerato-hialinos basófilos e escuros em queratinócitos, organelas degeneradas em regiões com proliferação epitelial, com um caule fibrovascular e infiltrado de neutrófilos e linfócitos. Papilomas endofíticos ou invertidos são considerados como de ocorrência rara em cães; são massas firmes no epitélio com projeções papilares que possuem um poro central, podendo estender-se até a derme^[7].

d) Diagnóstico laboratorial

As técnicas de PCR e hibridização *in situ* têm sido utilizadas em pesquisas para a detecção de DNA de papilomavírus^[3,8]. A microscopia eletrônica também pode ser empregada para a detecção de partículas virais em lesões^[5,7]. A imuno-histoquímica em secções de tecidos embebidos em parafina pode ser realizada com um anticorpo policlonal produzido em coelhos^[7]. Testes sorológicos ainda não foram desenvolvidos especificamente para o papilomavírus canino, porém para o papilomavírus humano existem testes de radioimunodifusão (RIA), ensaio imunoenzimático

(ELISA) e inibição da hemaglutinação (HI). Técnicas moleculares como *Southern blot*, *dot* e *slot blot* também podem ser usadas para a detecção do genoma viral^[7].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da papilomatose canina deve incluir outras causas de neoplasias cutâneas, como tumor venéreo transmissível, epitelomas intracutâneos, carcinoma de células escamosas, principalmente quando há ulceração, e epílides fibromatosas^[7].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras dos tecidos contendo lesões colhidas por biópsia devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório, ou fixadas em soluções de formalina.

Referências bibliográficas

1. ALFIERI, A. et al. Papilomaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 399-411.
2. CARTER, G.R.; WISE, D.J. Papillomaviridae. In: CARTER, G.R.; WISE, D.J.; FLORES, E.F. **A Concise Review of Veterinary Virology**. International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2005. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 10 maç. 2009.
3. DELIUS, H. et al. Naturally Occurring, Nonregressing Canine Oral Papillomavirus Infection: Host Immunity, Virus Characterization, and Experimental Infection. **Virology**, v. 204, n. 1, p. 447-452. 1994.
4. MURPHY, F.A. et al. Papovaviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Academic Press, 1999, p. 335-342.
5. NARAMA, I. et al. Pigmented cutaneous papillomatosis (pigmented epidermal nevus) in three pug dogs; histopathology, electron microscopy and analysis of viral DNA by the polymerase chain reaction. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2-3, p. 132-138, 2005.
6. SHERDING, R. Doenças virais diversas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. Manual Sanders Clínica de Pequenos Animais. São Paulo: Roca, p. 135-138, 1998.
7. SUNDBERG, J.P. Papillomaviruses. In: CASTRO, A.C.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary diagnostic Virology - a practitioner's guide**. St. Louis: Mosby year book, 1992. p. 148-150.
8. WALL, M; CALVERT, C.A. Canine Viral Papillomatosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St. Louis: Saunders Elsevier. 2006, Cap. 9, p. 73-78.

2.9 Influenza em cães

Conceito

Os vírus da influenza se encontram em constante evolução, produzindo mutações, deleções e “ressortimento”, por *antigenic drift* ou *antigenic shift*, e essa característica favorece a possibilidade de esse agente ultrapassar a barreira entre espécies e infectar novos hospedeiros^[4].

Etiologia e Patogênese

Os vírus da influenza são classificados na família Orthomyxoviridae, possuem oito segmentos de RNA fita simples, são envelopados e apresentam 15 subtipos de hemagglutinina e nove de neuraminidase. Essas duas glicoproteínas de superfície determinam o subtipo, a cepa do vírus.

Esses vírus são inativados a 56°C por 30min, por fenol, solventes lipídicos, detergentes, formalina e agentes oxidantes, como o ozônio^[4].

Diagnóstico

O diagnóstico da infecção é principalmente epidemiológico, baseado na ocorrência de casos em outras espécies, como aves (H5N1), equinos (H3N8) e até humanos (H3N2), sendo necessária a confirmação laboratorial.

a) Epidemiologia

Todos os anos, surtos de doença febril autolimitante e aguda produzida pelos vírus da influenza tipos A e B ocorrem em humanos no mundo todo. Cães e gatos infectados podem atuar como disseminadores da infecção pelo contato próximo com humanos. Em cães, a infecção com o H3N2 foi inicialmente descrita em 1975-1976, porém esse vírus não produziu doença grave. Em 2005, nos EUA, um estudo relatou a ocorrência da infecção pelo H3N8, que originalmente infecta equinos e cães de corrida da raça *greyhound* na Flórida. No mesmo trabalho, foi realizado um estudo retrospectivo com casos de doença respiratória fatal em cães sem diagnóstico estabelecido, sendo demonstrada a infecção em datas anteriores. Títulos de anticorpos foram detectados em amostras de soro de cães colhidas entre 2000 e 2003 em diferentes cidades, indicando que a infecção de cães com o H3N8 já ocorria havia algum tempo^[2].

Até pouco tempo atrás se acreditava que cães e gatos não eram suscetíveis aos vírus da influenza^[4]. Sorologia positiva para o H5N1 foi demonstrada em amostras de soro de 160 cães de uma vila de Bangkok, Tailândia^[1]. O H5N1 produz altas taxas de morbidade e mortalidade quando se dissemina de aves para animais domésticos e humanos. E ainda em 2006 foi relatado um caso fatal da infecção em um cão que ingeriu a carcaça de um pato infectado no mesmo país^[7].

A transmissão dos vírus que causam a influenza para cães ocorre por contato direto, por aerossóis ou, ainda no caso do H5N1, pela ingestão de carcaças de animais infectados e fômites contaminados com fezes de aves. O período de incubação da doença geralmente é curto, entre 2 e 5 dias^[4]. Estudos epidemiológicos sobre a infecção com o H3N2 e o H3N8 são escassos e não se sabe exatamente a situação da infecção em outros países além daqueles onde houve relatos. A infecção pelo H5N1 não foi relatada no Brasil, e casos da doença em cães somente foram observados nas regiões da Ásia onde a infecção foi diagnosticada em aves. Vacinas estão sendo desenvolvidas ou adaptadas para uso em cães, como a vacina contendo o H3N8, de equinos, nos EUA. Uma vacina recombinante para o H5N1 foi testada na China^[5,6].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos incluem hipertermia, depressão, protrusão da terceira pálpebra, conjuntivite, dificuldade respiratória e descarga nasal. A infecção com o H5N1 é mais grave, sendo caracterizada ainda por hemorragias, icterícia e sinais neurológicos como convulsões e ataxia^[7]. A infecção produzida pelo H3N8 é caracterizada por sinais clínicos graves, como hemorragia em adição aos sinais respiratórios, produzindo casos fatais com maior frequência.

c) Patologia

Os cães infectados pelo H3N8 apresentam traqueíte, bronquite e bronquiolite, com infiltração de células inflamatórias. Alguns apresentam broncopneumonia supurativa, pela contaminação bacteriana secundária. A necropsia de um cão infectado pelo H5N1 revelou congestão e edema pulmonar, congestão no baço, fígado e rins, pneumonia intersticial, infiltrado de células inflamatórias, necrose hepática, nefrite e degeneração tubular^[4].

d) Diagnóstico laboratorial

A infecção pelo H5N1 somente deve ser suspeitada em regiões com ocorrência de surtos da doença. Para detecção dos vírus da influenza pode-se colher secreções e tecidos para isolamento viral, realizado em células da linhagem MDCK ou no saco alantoide de ovos embrionados com 10 dias^[4].

Técnicas como imuno-histoquímica (IHQ), hemaglutinação (HA) com confirmação por inibição da hemaglutinação (HI) e RT-PCR em tempo real são ferramentas diagnósticas aplicadas para investigar os surtos relatados de infecção pelo H3N8^[2] e pelo H5N1^[7]. A microneutralização (MN) e a HI podem ainda ser utilizadas no diagnóstico sorológico.

e) Diagnóstico diferencial

A doença respiratória produzida pelos vírus da influenza pode ser confundida com a traqueobronquite infecciosa canina e outras enfermidades que cursam com sinais respiratórios, como cínomose, hepatite infecciosa canina e broncopneumonias bacterianas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O diagnóstico da infecção pode ser realizado pelo envio de secreção nasal (suabes nasais), secreção orofaríngea, fezes ou tecidos como pulmões e linfonodos, dependendo da cepa envolvida, refrigerados ou congelados para o laboratório de virologia^[2,3].

Referências bibliográficas

1. BUTLER, D. Thai dogs carry bird-flu virus, but will they spread it? **Nature**, v. 439, n. 773, 2006.
2. CRAWFORD, P.C. et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. **Science express**, v. 310, p. 482-485, 2005.
3. ENSERINK, M.; KAISER, J. Avian flu finds new mammal hosts. **Science express**, v. 305, p. 1305, 2004.
4. FLORES, E.F. et al. Orthomyxoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, cap. 28, 722-753.
5. GAO, Y.W. Construction and experimental immunity of recombinant replication-competent canine adenovirus type 2 expressing hemagglutinin gene of H5N1 subtype tiger influenza virus. **Wei sheng Wu Xue Bao**, v. 46, p. 297-300, 2006.
6. KARACA, K. et al. Evaluation of the ability of canarypox-vectored equine influenza virus vaccines to induce humoral immune responses against canine influenza viruses in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 2, p. 208-212, 2007.
7. SONGSERM, T. et al. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 4, p. 1744-1747, 2006.

2.10 Outras infecções virais que acometem os cães

2.10.1 Rotavírus canino

Os rotavírus são importantes patógenos entéricos de várias espécies animais, incluindo os humanos. O rotavírus canino (CRV) possui 10 segmentos de RNA de cadeia dupla como genoma, não apresenta envelope e é classificado no gênero *Rotavirus* da família Reoviridae. Esse vírus é relativamente resistente a condições ambientais. A transmissão ocorre pela rota fecal-oral, infectando as células epiteliais das vilosidades intestinais e promovendo necrose das células infecta-

das, principalmente entre 18 e 48 horas após a infecção. Em consequência, cães infectados apresentam diarreia osmótica, aquosa e mucosa, leve a moderada, dificuldade de digestão e absorção dos alimentos geralmente por 8 a 10 dias. Essa infecção é localizada no intestino, não resulta em febre e é considerada mais leve do que aquela produzida pelo parvovírus, coronavírus e adenovírus canino. Métodos de diagnóstico incluem um teste de ELISA comercial, aglutinação em látex, imunofluorescência e microscopia eletrônica realizados em amostras de fezes^[1].

2.10.2 Doença de Aujeszky

Cães e gatos podem ser infectados com o vírus da pseudorraiva accidentalmente. Esse vírus é classificado na subfamília Alphaherpesvirinae, da família Herpesviridae, possui uma fita dupla de DNA como genoma, é envelopado e considerado relativamente resistente a condições ambientais, sobrevivendo 10 dias a 37°C e 40 dias a 25°C, porém é inativado por luz ultravioleta, dessecamento e solventes lipídicos.

Esse animais adquirem a infecção pela via oral, geralmente pela ingestão de leitegadas e restos de aborto de suínos infectados com o vírus. Os sinais clínicos hiperagudos, caracterizados por letargia, indiferença ou agressividade, dispneia produzida por edema pulmonar severo, hiper-salivação, vômito, diarreia, prurido intenso e autoflagelação, principalmente na região da cabeça e pescoço, progredindo para a apresentação de convulsões são evidenciados entre 3 e 6 dias após a ingestão. A automutilação resulta em eritema, escoriações e arranhões.

Outros sinais neurológicos incluem anisocoria, midriase, ausência de reflexo pupilar, trismo, paresia, paralisia dos músculos faciais, dificuldade de deglutição e hiperestesia. Sinais gastrointestinais têm sido predominantes em cães, havendo relatos de cães que não desenvolveram prurido. Esse vírus se replica na mucosa oral e atinge o SNC, produzindo mortalidade em 24 a 48 horas.

O diagnóstico da infecção é realizado pela inoculação de tecido (encéfalo) de cães suspeitos na pele de coelhos ou por inoculação intracraniana de camundongos. Imunofluorescência em *crio-secções* de encéfalo e tonsilas, além de PCR, tem sido utilizada para o diagnóstico. O isolamento viral pode ser realizado a partir de amostras de pulmão, baço, encéfalo e tonsilas, ou em suaves tonsilares e orais, além de lavado faríngeo de cães em linhagens de células renais de suíno, evidenciando-se a formação de sincícios. Soroneutralização, imunodifusão e ELISA são utilizados para detecção de anticorpos em suínos^[2].

Referências bibliográficas

1. McCAW, D.L.; HOSKINS, J.D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, cap. 8, p. 63-73.
2. VANDEVELDE, M. Pseudorabies. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Cap. 23, p. 183-187, 2006.

3. PRINCIPAIS DOENÇAS MICÓTICAS DOS CÃES

3.1 Criptocose

Conceito

A criptocose, também denominada blastomicose europeia ou torulose, ocorre em várias regiões geográficas, principalmente em locais de clima tropical ou subtropical ou em áreas com

solo infectado por excrementos de pombos. É uma infecção micótica sistêmica causada pela levedura denominada *Cryptococcus neoformans*, e acomete o homem e outros mamíferos domésticos e silvestres^[4].

Etiologia e Patogênese

Embora haja distintas espécies no gênero, somente a espécie *C. neoformans* tem sido isolada de casos clínicos de criptococose nos cães. A principal porta de entrada para o agente é o trato respiratório^[5]. Esse agente encontra os alvéolos pulmonares e dissemina-se para outras regiões do organismo, principalmente para o sistema nervoso central (SNC)^[10]. Os locais preferidos para a disseminação são o SNC, os olhos e a pele.

Diagnóstico

Diferentes métodos de diagnóstico podem ser utilizados para o diagnóstico de criptococose, como cultura e isolamento fúngico em meios apropriados, exame citológico, histopatológico, sorológico e a biologia molecular^[7].

a) Epidemiologia

A criptococose canina afeta principalmente animais entre as faixas etárias de 1 a 7 anos, independentemente do sexo, porém algumas raças podem ser mais frequentemente acometidas, apresentando maior predisposição à doença. São raças predispostas o Dogue alemão, Pinscher, Cocker spaniel e Doberman^[4].

b) Sinais clínicos

Cães acometidos desenvolvem principalmente alterações no SNC, sendo bastante variáveis dependendo da localização da lesão. Os principais sinais clínicos observados são ataxia, depressão, andar em círculos, paresia, paralisia, mudança de comportamento, convulsões, perda de olfato e cegueira^[5]. As lesões oculares são observadas em grande parte dos animais acometidos e podem ser decorrentes de infecção direta do SNC^[10]. Os sintomas de disfunção do sistema vestibular são evidentes, como inclinação da cabeça e nistagmo. O *C. neoformans* causa linfadenopatia nos cães, e ainda perda de peso, letargia e febre^[9].

c) Patologia

Lesões cutâneas clássicas caracterizadas por fistulas, erosões e úlceras podem ser encontradas no focinho, na língua, na gengiva, no palato e nos lábios^[2]. Na histologia se observa resposta celular granulomatosa intensa com predomínio de macrófagos^[8].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo requer a identificação do microrganismo na citologia (exsudato nasal, fluido cerebroespinal, exsudato ou impressões cutâneas, aspirados linfonodais, urina e material colhido por oculocentese) utilizando os corantes Gram, PAS, novo azul de metileno ou tinta da Índia, ou em biópsias que utilizam corantes mucicarpina, HE e argênteos^[4].

As leveduras do gênero *Cryptococcus* podem ser isoladas em ágar Sabouraud dextrose sem adição de ciclo-hexamida e ágar sangue, incubados entre 25°C e 37°C. Após 48 a 72 horas, ocasionalmente em seis semanas, obtém-se o isolamento do agente^[1]. A identificação é baseada nas características macroscópicas da colônia, na visualização da cápsula, na atividade de hidrólise de ureia e na resposta a diversos testes de assimilação com açúcares e nitratos.

As principais vantagens do exame citológico são a rapidez e a facilidade de execução. Esse exame pode ser realizado com liquor cefalorraquidiano, aspiração de tecidos e exsudato de secreção nasal ou das lesões de pele^[6]. O agente causador *C. neoformans* é encontrado nas amostras citológicas na forma de levedura oval a arredondada, medindo 4 a 10µm de diâmetro. A amostra é submetida à impressão em lâmina para posterior coloração. Pode ser utilizada a técnica de coloração Wright ou o azul de metileno^[10]. A inflamação encontrada é mínima em pacientes comprometidos imunologicamente e quando os microrganismos refêm sua cápsula^[4]. As amostras de tecidos lesados colhidos por biópsia podem ser coradas pelos corantes histológicos de rotina, como hematoxilina e eosina, ácido periódico Schiff, prata metanamina e corante Mansson-Fontana^[3].

Os testes sorológicos são utilizados para detecção rápida de anticorpos no soro, na urina e no liquor. Geralmente esses testes são realizados com *kits* comerciais, como o teste da aglutinação pelo látex^[9]. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é empregada com bons resultados para o diagnóstico^[10].

e) Diagnóstico diferencial

Lesões proliferativas na região nasal, outras doenças granulomatosas micóticas, infecções micobacterianas atípicas e esporotricose devem ser levadas em consideração para o diagnóstico diferencial da criptococose^[4].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem ser enviados ao laboratório de patologia animal fragmentos de tecidos armazenados em frascos identificados com formalina a 10% e hermeticamente fechados. Esses tecidos incluem linfonodos periféricos, tecidos com a lesão cutânea, osso nasal, pulmão, faringe, cavidade oral, rins, SNC, globo ocular completo, fígado, baço, coração e musculatura esquelética^[4]. O liquor cerebroespinal deve ser encaminhado em frasco estéril contendo heparina em temperatura refrigerada a -4°C. O exsudato nasal deve ser colocado em frasco estéril e fechado à temperatura de -4°C^[8].

Referências bibliográficas

1. ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine - diseases of the dog and cat.** 5. ed. Philadelphia: Saunders, p. 468-471; p. 984-986, 2000.
2. GROSS, T.E., IHRKE, P.J. Infectious modular and diffuse granulomatous and pyogranulomatous diseases of the dermis. In: GROSS, T.E., IHRKE, P.J., WALDER, E.J. (Ed.). **Veterinary Dermatopathology.** St. Louis: Mosby, p. 177-178, 1992.
3. JACOBS, G.J.; MEDLEAU, L. Cryptococcosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat.** 2. ed. Philadelphia: Saunders, p. 383-390, 1998.
4. JULIANO, R.S. et al Criptococose felina. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 65-70, 2006.
5. LARSSON, C.E. et al. Canine ocular cryptococcosis: a case report, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, 2003
6. MALIK, R. et al. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. **Journal of Medicine Veterinary Mycology**, v. 33, p. 291-297, 1995.
7. MEDLEAU, L.; BARSANTI, J.A. Cryptococcosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia: Saunders, p. 687-695, 1990.
8. RIPPON, J.W. **Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.** 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1988. p. 589-609.

9. SCOTT, D. W. et al. Subcutaneous mycoses-cryptococcosis. In: _____. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 373-378.
10. SCOTT, D.W. et al. **Muller and Kirk's Small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 395-400.

3.2 Aspergilose

Conceito

Aspergilose é a doença fúngica mais comum em cães. É causada pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, que se aloja nas fossas nasais. Existe frequentemente no meio exterior e torna-se patogênico para animais com imunidade deprimida ou com irritação/patogenia concomitante nasal. Clinicamente, produz alterações localizadas na cavidade nasal e nos seios frontais, além de doença disseminada, com acometimento pulmonar^[1].

Etiologia e Patogênese

Aspergillus fumigatus é a espécie mais comumente encontrada em animais com envolvimento primário do trato respiratório, embora outras espécies do gênero *Aspergillus* já tenham sido isoladas, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. deflectus* e *A. terreus*^[5].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A aspergilose é adquirida de fontes ambientais, geralmente por inalação ou ingestão. O contágio ocorre essencialmente por via aérea (inalação das formas juvenis – conídio – em suspensão no ar). A prevenção é realizada pela ventilação dos locais e evitando-se o contacto com camas úmidas e bolorentas^[3,4]. A maioria das mastites causadas por *Aspergillus* advém da inoculação intramamária. Embora tenham sido demonstradas deficiências do sistema imune em alguns cães com a aspergilose localizada ou nasal, não há associação consistente com doenças que curram com imunodeficiência.

b) Sinais clínicos

Os cães com aspergilose apresentam rinossinusite, inicialmente unilateral e depois bilateral, corrimento nasal abundante e purulento, por vezes com presença de estrias de sangue, sanguramento nasal, espirros, secura ocular^[3,4]. Existem relatos de desenvolvimento de osteomielite fúngica 6 meses após o tratamento contra aspergilose nasal em cães. Cães das raças doliccefálicas imunodeficientes são os mais predispostos a contrair aspergilose^[1]. Os sintomas mais evidentes estão relacionados à cavidade nasal: descarga mucopurulenta ou mucossanguinolenta, espirros, dor à palpação e despigmentação ou ulceração, com envolvimento unilateral ou bilateral. A aspergilose pulmonar é rara, sendo mais comum a disseminação da doença aos rins, ao baço e aos ossos.

A aspergilose nasal canina é caracterizada por atingir uma ampla faixa etária (entre 5 meses e 13 anos) e ser uma moléstia erosiva que causa corrimento nasal crônico. Pastores-alemães são predispostos ao desenvolvimento da aspergilose. Os sinais clínicos mais comuns são: perda de peso, anorexia, depressão ou letargia, astenia, febre, dor nas costas e paresia devida a uma discospondilite fúngica. Também se observa um quadro neurológico com danos na medula espinhal.

Em seres humanos a aspergilose é apenas uma infecção oportunista associada a pacientes comprometidos imunologicamente^[5].

c) Patologia

Os animais afetados frequentemente apresentam granulomas de diversos tamanhos, de coloração pálida, disseminados por diversos órgãos^[3,4]. Na histopatologia se observa infiltrado celular predominantemente polimorfonuclear com presença de macrófagos e células gigantes. Também é possível visualizar hifas e estruturas reprodutivas do fungo quando realizada a coloração pela prata.

d) Diagnóstico laboratorial

O *Aspergillus* spp. pode ser detectado na maioria dos meios de cultivo para fungos, porém, por serem agentes cosmopolitas, diversas espécies de *Aspergillus* estão frequentemente presentes na biota anemófila e, portanto, estão também presentes no trato respiratório de cães sadios^[2]. Por esse motivo, resultados positivos no exame de cultivo não são suficientes para firmar um diagnóstico de aspergilose nasal. Já o exame sorológico serve de apoio ao clínico para o diagnóstico de aspergilose nasal canina, principalmente com emprego da técnica de eletrocinerese, a qual apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo o teste da contraimunoelétroforese (CIE) o mais indicado. Amostras de tecidos nasais colhidas por rinoscopia submetidas à citologia podem não revelar a presença do fungo em 50% das análises realizadas^[4].

e) Diagnóstico diferencial

Devem-se incluir no diagnóstico diferencial outras doenças que cursam com sinais respiratórios, principalmente do trato respiratório superior.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a realização dos exames laboratoriais, deve-se colher sangue em tubo sem adição de anticoagulante (mínimo de 3,5ml) para aquisição de soro. Armazenar o material em geladeira a 4°C e submeter ao laboratório ainda resfriado, em até 24 horas. Amostras de tecido devem ser enviadas em formalina a 10% para histologia. Podem ser enviadas amostras colhidas às cegas através de suave nasal e enviadas em frascos estéreis, em temperatura ambiente, imediatamente para análise após colheita. Ao enviar as amostras, encaminhar, se possível, as seguintes informações: nome do proprietário, nome do animal, raça, idade, sexo, exame solicitado e dados clínicos^[1].

Referências bibliográficas

1. BENITAH, N. Canine nasal aspergillosis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, p. 82-88, 2006.
2. DENNING, D.W. Invasive aspergillosis, **Chicago Journals Online**, v. 26, p. 781-803, 1998.
3. GARCIA, M.E.; BLANCO, J.L. Micosis sistémicas en animales de compañía: recientes avances en su diagnóstico. **Laboratorio Veterinario**, v. 2, p. 2-8, 1995.
4. GARCIA, M.E.; BLANCO, J.L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p.S2-S7, 2000.
5. KURUP, V.P.; KUMAR, A. Immunodiagnosis of aspergillosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 4, p. 439-456, 1991.

3.3 Candidíase

Conceito

A candidíase é uma doença oportunista causada por *Candida albicans*. O habitat da cândida é bastante amplo, e essa levedura habita a mucosa digestiva e, por contiguidade, a mucosa vaginal de diferentes espécies animais. A infecção pode atingir mucosas, tecido cutâneo e, em alguns casos, pode ser sistêmica^[3].

Etiologia e Patogênese

O gênero *Candida* é constituído por leveduras que, em cultura e tecidos, têm reprodução assexuada, através da formação de blastoconídeos, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. Apesar de fazer parte da microbiota normal do trato intestinal, pode constituir-se em patógeno oportunista das regiões mucocutâneas, dos tratos digestivo e genital de mamíferos, além de envolver pele, unhas e trato respiratório com riscos de desencadear fungemias^[2].

Diagnóstico

O diagnóstico deve ser baseado no exame clínico do animal, principalmente do tegumento, da anamnese e do raspado tegumentar^[3].

a) Epidemiologia

Candida albicans constitui uma causa rara de lesões ulcerativas na pele e na mucosa oral em animais comprometidos imunologicamente ou que foram tratados com antibioticoterapia de largo espectro e longa duração. As cándidas se aproveitam de debilidade ou deficiência imunitária para se multiplicar e disseminar além dos níveis normais^[1].

b) Sinais clínicos

A candidíase apresenta grande diversidade de manifestações clínicas, que podem ser divididas em três grupos: candidíase cutâneo-mucosa, candidíase sistêmica e candidíase alérgica. Essa doença tem ocorrência rara em animais domésticos, podendo afetar membranas mucosas e junções mucocutâneas ou locais com umidade persistente, causando quadros de dermatite e otite externa^[2].

A candidíase como doença primária é extremamente rara, e está associada a neoplasias, a doenças mediadas por imunidade e ao uso prolongado de corticosteroides, antimicrobianos ou citoestáticos. Nos cães, a candidíase pode apresentar-se também na forma septicêmica, com lesões nos músculos, nos ossos e na pele^[1,3].

c) Patologia

As lesões tendem a se localizar nas membranas mucosas e junções mucocutâneas, ou em locais com umidade persistente, causando dermatite papular, pustulada ou ulcerativa e exsudativa, e também otite externa^[2].

No exame histopatológico, a candidíase caracteriza-se por dermatite perivasicular (espongiforme ou hiperplásica), dermatite intradérmica pustulada (especialmente subcorneal), ou foliculite (supurativa). Geralmente as hifas são visualizadas nos cortes corados com hematoxilina eosina (HE), mas podem ser mais bem observadas quando coradas pelo ácido periódico de Schiff^[3].

d) Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico da candidíase, devem ser colhidas amostras de exsudato e crostas da pele por raspado cutâneo. No exame direto das lesões produzidas por *Candida albicans*, utilizando hidróxido de potássio (KOH) ou pelo método de Gram são observadas células leveduriformes, ovais, com gemulação de base fina, dividindo em duas células e presença de pseudo-hifas^[1]. As hifas podem ser cultivadas em ágar sangue e em ágar Sabouraud, e após 24 a 48 horas, a uma temperatura de 25°C, apresenta colônias cremosas a pastosas de coloração creme com odor característico^[3].

e) Diagnóstico diferencial

Doenças cutâneas fúngicas superficiais (*Malassezia spp*) e sistêmicas (criptocose), eritema e formação de crostas com prurido ocasionadas por outros agentes devem ser diferenciadas da candidíase^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para diagnóstico da candidíase, removem-se biópsias de pele de duas ou mais áreas próximas às bordas da lesão, que devem ser encaminhadas para os laboratórios de bacteriologia ou micologia em frasco estéril e identificado, em temperatura ambiente. O fragmento deve ser colocado durante 10 minutos em solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina), e então cultivado, sendo mantido a 37°C durante 24 horas. Amostras de fragmentos de pele podem ser enviadas para exame histopatológico^[3]. O material deve ser mantido em formol tamponado a 10% durante 24 horas para posteriormente ser processado.

As amostras do pelame podem ser obtidas pela técnica do carpete estéril, na qual se fricciona um carpete por todo o corpo do animal, que não apresenta lesões de pele aparentes. Nos animais com problemas de pele, o carpete deve ser utilizado somente nas áreas das lesões. Podem ser enviadas ao laboratório de microbiologia ou micologia amostras da secreção oral, colhidas com o auxílio de suabes estéreis cultivados em ágar Sabouraud dextrose, acrescido de 0,5g/L de cloranfenicol a 37°C durante 5 dias. Para a técnica da imunofluorescência indireta (IFI), deve ser colhido e identificado aproximadamente 1ml de sangue sem anticoagulante à temperatura ambiente^[1].

Referências bibliográficas

1. LEF, M.B. et al. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 164-168, 2007.
2. RAPOSO, J.B. et al. Cutaneous candidiasis in a dog. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 2/3, n. 1, p. 11-17, 1996.
3. FERREIRO, L. et al. Study of the associations between the isolation of *Candida albicans* and infection by the feline leukemia virus (feline), treatment with corticosteroids or antimicrobials in cats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 3, p. 179-183, 2002.

3.4 Coccidioidomicose

Conceito

Coccidioidomicose é uma doença fúngica sistêmica que tem como agente o *Coccidioides immitis*, um fungo dimórfico atípico^[1].

Etiologia e Patogênese

Coccidioides immitis é um fungo originário do solo, distribuído geograficamente nas regiões secas e semelhantes aos desertos do sudoeste dos EUA. No solo, o *C. immitis* cresce como micélios que formam artrósporos. A infecção ocorre pela inalação desses artrósporos originários do solo e soprados pelo vento, podendo ocorrer a inoculação cutânea. Nos tecidos corporais, o coccidiode forma esférulas grandes que liberam centenas de endósporos^[2,3].

Diagnóstico

Atualmente esta micose é considerada endêmica na Região Nordeste brasileira. A observação direta do microrganismo é o principal método de diagnóstico, realizada pela citologia ou biopsia. Cultivo fúngico e testes sorológicos (imunodifusão em ágar gel) também podem ser realizados^[1].

a) Epidemiologia

Em cães, principalmente antes dos 4 anos de idade, a infecção pode ficar limitada a uma área focal do pulmão (coccidioidomicose pulmonar primária), em que o sistema imune pode combater o agente. Nesses casos, os sinais clínicos serão brandos ou estarão ausentes ou, se a quantidade de artroconídias inalada é muito grande ou ainda se o animal se encontra “imunossuprimido”, o microrganismo poderá disseminar-se localmente por toda a árvore pulmonar ou até órgãos distantes (coccidioidomicose disseminada)^[1]. A inoculação cutânea direta de artroconídias (coccidioidomicose cutânea primária) é rara. Classicamente, a coccidioidomicose é conhecida como endêmica de áreas semiáridas do Continente Americano. Concomitantemente, a doença passou a ser mais diagnosticada em cães. Atualmente, esta micose é considerada endêmica na Região Bordeste^[2].

Esse fungo produz uma saprozoonose, e necessita de locais como o solo e a água para se desenvolver/sobreviver. No entanto, são as infecções dentro da mesma espécie que apresentam efeito negativo mais intenso na produtividade e na saúde dos animais de companhia^[2]. Para esta doença, embora exista um agente como causa, fatores como alimentação, alojamento e manejo são importantes na ocorrência de casos. Na natureza e em cultura, esse fungo assume a forma de micélios típicos com hifas, mas no homem, em vez de adaptar-se como levedura, assume formas atípicas esféricas, as esférulas, cheias de dezenas de endósporos (até 100)^[2].

b) Sinais clínicos

Após inalação dos esporos, as esférulas multiplicam-se nos pulmões. Na maioria dos casos (60%) a infecção é assintomática e o sistema imune destrói o invasor e limita sua disseminação pela formação de granulomas. Porém, em uma minoria, observam-se sinais de pneumonia, com febre, sudoretação, tosse, expectoração e dificuldade respiratória. Em 5% dos casos poderá surgir pneumonia crônica, ao passo que menos de 1%, principalmente os com imunidade deprimida e cães idosos, pode desenvolver manifestações sistêmicas após disseminação pela corrente sanguínea do fungo, que resultam em ulcerações da pele e dores nas articulações, provocando claudicação^[2]. O prognóstico é reservado a desfavorável, visto que é considerada a doença pulmonar fungica mais grave.

Não há risco conhecido de transmissão direta de *C. immitis* de animais de companhia para o ser humano. O ambiente quente e seco oferece condições propícias ao desenvolvimento de *C. immitis*, um habitante do solo. Pessoas e animais do local contaminado devem adquirir a infecção ao revolver a terra, ato que os expõe à poeira contendo os propágulos do fungo^[3].

c) Patologia

Na forma disseminada, extrapulmonar, geralmente crônica, podem ser observadas lesões osteoprolifertiva incluindo articulações, além de formações granulomatosas nas vísceras abdominais (baço, fígado, linfonodos, omento e rins), coração, pericárdio, olhos, SNC, genitália e pele.

d) Diagnóstico laboratorial

O cultivo pode ser feito a partir de amostras de pele, suabes estéreis e esfregaços de tiras adesivas pressionadas diretamente sobre as lesões ou da aplicação direta de meios de cultura.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para análise histopatológica, os linfonodos devem ser colhidos, assim como fragmentos do pulmão, tecido, baço, rins, omento, fígado, coração, pericárdio e medula e enviados em formalina 10%^[3]. Para cultura fúngica, colher secreções pulmonares e sangue, devendo essas ser mantidas sob refrigeração de 2 a 4°C até o processamento laboratorial. O tempo entre a coleta da amostra clínica e o processamento laboratorial constitui um evento crítico, devendo ser realizado em um período máximo de 24 horas.

Referências bibliográficas

1. JONES, T.C. et al. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo, 2000.
2. MORAES, M. A. P. Coccidioidomicose: novo caso brasileiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 559-562, 1998.
3. THERIOT, J. A. The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 213–239, 1995.

3.5 Dermatofitose

Conceito

As dermatofitoses são exemplos de enfermidades infecciosas com elevada prevalência na América Latina que atingem tanto o homem como os animais domésticos^[6].

Etiologia e Patogênese

As dermatofitoses são causadas por um grupo de fungos denominados dermatófitos, pertencentes aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, os quais acometem o tecido queratinizado da pele, pelos e unhas^[2]. O *Microsporum canis* é o mais diagnosticado na espécie canina, porém também foi observado o *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophyte* e *T. verrucosum*, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pelos e extrato córneo de homens e animais^[1].

Diagnóstico

Na prática médica veterinária, a grande maioria dos diagnósticos das dermatofitoses cutâneas é firmada única e exclusivamente com base na observação clínica, de modo que os procedimentos laboratoriais que deveriam ser realizados não são habitualmente solicitados pelos veterinários que estão prestando assistência aos animais. O diagnóstico de dermatofitose deve ser realizado pelo exame direto e cultivo de amostras de lesões cutâneas como crostas e pelos, colhidas por raspado cutâneo, técnica do carpete e biópsia^[1].

a) Epidemiologia

Essas micoses são altamente contagiosas e zoonóticas sendo transmitidas por contato direto de lesões e fômites contaminados. Em relação ao seu *habitat*, podem ser divididos em geofílicos, que vivem em solos, zoofílicos, que vivem em animais, e antropofílicos, aqueles que vivem no homem. No que tange à saúde humana, os relatos fragmentados e dados epidemiológicos indicam que essas micoses estão entre as zoonoses mais comuns do mundo, sendo consideradas o terceiro distúrbio de pele mais comum em crianças menores de 12 anos e o segundo da população adulta^[1,4]. Embora os dados epidemiológicos referentes à ocorrência da doença entre os animais sejam escassos, a literatura relata a ocorrência comum da enfermidade entre cães e gatos no meio urbano^[4].

b) Sinais clínicos

Os aspectos clínicos das lesões dermatofíticas são variados e resultam da combinação de destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória, que pode ser intensa, na dependência do binômio parasito-hospedeiro^[5]. De modo geral, os animais apresentam áreas alopécicas multifocais com a formação de escamas e crostas, características marcantes da doença.

c) Patologia

Os animais apresentam lesões alopécicas, eritematosas, circunscritas, arredondadas com hiperceratose e descamação furfurácea^[3]. De modo geral, as lesões se tornam mais evidentes devido ao ato de coçar e tendem a agravar-se com infecções secundárias, como é o caso de estafilococos.

Na histopatologia os achados mais frequentes são dermatite perivasicular, vesicular ou pustulada, foliculite com intenso infiltrado polimorfonuclear, predominantemente com neutrófilos, e destruição da queratina.

d) Diagnóstico laboratorial

O exame microscópico direto das amostras pode ser realizado com uma gota de hidróxido de potássio entre 10% e 40%, além do cultivo das alíquotas do material colhido poder ser semeado primariamente em meios de Sabouraud sem antibiótico, Sabouraud com cloranfenicol e em ágar Mycosel. A incubação é realizada em temperatura ambiente (25 a 28°C) em um prazo máximo de 20 dias, com observação diária. Após esse período, as colônias são analisadas quanto às características macro e micromorfológicas^[3,4].

e) Diagnóstico diferencial

Demodicose, piódermite superficial, pênfigo foliáceo, piódermite nasal, foliculite, escabiose e doenças de pele em geral que cursam com alopecia e eritema devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da dermatofitose.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Todo material clínico colhido, como pelos e raspados, deve ser acondicionado em placa de Petri estéril à temperatura ambiente para processamento laboratorial no prazo máximo de 24 horas. Amostras de fragmentos teciduais das lesões suspeitas, medindo cerca de 2 x 2cm, devem ser armazenadas e enviadas para o Laboratório de Patologia Animal ou ao laboratório de micologia^[5,6].

Referências bibliográficas

1. BALDA, A.C. et al. Ensaio clínico da griseofulvina e da terbinafina na terapia de dermatofitoses de cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 750-754, 2007.
2. PINHEIRO, A.Q., et al. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 287-294, 1997.
3. SPARKES A.H. et al. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. **Veterinary Record**, v. 133, n. 3, p. 57-61, 1993.
4. BRUM, L.C. et al. Principais dermatoses zoonóticas de cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n. 69, p. 29-46, 2007.
5. FIGUEIREDO, F.B. et al. Sporotrichosis – The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, 2007.
6. MADRID, I.M. et al. Esporotricose óssea e cutânea em canino. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 441-443, 2007.

3.6 Histoplasmose

Conceito

Histoplasmose é uma infecção fúngica sistêmica, considerada uma zoonose, que tem como agente o *Histoplasma capsulatum*^[3].

Etiologia e Patogênese

Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico que prefere as condições de solos úmidos e molhados enriquecidos de compostos nitrogenados, derivados de matéria orgânica em decomposição, ou de excremento de aves e morcegos, podendo sobreviver em ampla gama de temperaturas ambientais (de -18 a 37°C). O estágio miceliano no solo (fase saprofítica) produz microaleuriósporos e macroaleuriósporos, que são a fonte de infecção para os mamíferos^[2].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

A contaminação quase sempre é produzida pela inalação, durante a fase filamentosa do fungo, dos microaleuriósporos. Eles penetram até o alvéolo pulmonar, onde se convertem à fase de levedura, invadindo posteriormente os linfonodos hilomediastinais e, finalmente, disseminando-se pela corrente sanguínea.

b) Sinais clínicos

A doença caracteriza-se por determinar manifestações variadas no hospedeiro, desde infecção assintomática até disseminada, com êxito letal. A fungemia, decorrente da infecção pulmonar e acesso do fungo aos linfonodos e à circulação sanguínea, é assintomática e permite que o agente parasite todos os tecidos do sistema monocítico, tais como pulmões, fígado, baço, linfonodos e estruturas linfáticas do tubo digestivo^[3]. A partir daí, a resposta tissular do hospedeiro contra a infecção vai determinar a extensão da doença.

A ativação do sistema imune celular permite o controle da infecção. Porém, se o sistema imune estiver comprometido, poderá ocorrer grave moléstia clínica. A gravidade da lesão depende da quantidade de esporos inalados. A doença é mais frequente em cães com menos de 4 anos de idade, embora possa ocorrer em qualquer idade. Na maioria dos animais ocorre infecção sub-clínica. Nos cães, a forma gastrointestinal é a mais comum, mas as alterações pulmonares também são frequentes, podendo haver dispneia, tosse e sibilos. Porém, a perda de peso e a diarreia são os achados mais frequentes^[1]. A diarreia geralmente apresenta muco, tenesmo e sangue fresco. Algumas vezes, essas fezes podem estar aquosas e profusas. No envolvimento pulmonar, encontra-se dispneia, tosse e sons pulmonares anormais.

c) Patologia

Os achados de necropsia incluem esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, que variam de acordo com o nível de infecção, e ascite^[2]. Na histologia, frequentemente são observadas reações granulomatosas com a presença de células gigantes e blastoconídeos intracelulares compatíveis com *Histoplasma capsulatum* nos diferentes órgãos.

d) Diagnóstico laboratorial

O cultivo fúngico e métodos sorológicos (podendo haver muitos falso-positivos e negativos) podem ser utilizados para a detecção da infecção; a visualização do microrganismo pela citologia ou histopatologia é dos métodos diagnósticos mais confiáveis^[3].

e) Diagnóstico diferencial

Patógenos intestinais de origem bacteriana, parasitários, virais, protozoários, algas e outros fungos, como *Candida albicans* e *Aspergillus* spp.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico da histoplasmose, diversos materiais biológicos podem ser utilizados, como: fezes de morcego ou de pombos, secreção pulmonar do paciente, urina, raspados ou exsudatos da lesão, aspirado de medula óssea (5ml) com EDTA ou leucócitos para cultura, biópsias de medula óssea, da pele ou de linfonodos para estudo histológico, e sangue sem EDTA para provas sorológicas (5ml). Todo material deve ser refrigerado ou enviado em solução salina a 0,9% a 4°C^[1].

Referências bibliográficas

1. NEGRONI, R. et al. Interrupción de la Profilaxis Secundaria Antifúngica en la Histoplasmosis Asociada al Sida. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 21, p. 75-78, 2004.
2. ROSSINI, T.F.; GOULART, L.S. Histoplasmose clássica; revisão. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.
3. UNIS, G. et al. Histoplasmose Disseminada no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p. 463-468, 2004.

3.7 Malasseziose

Conceito

Esta doença é causada por um fungo não micelial lipofílico chamado *Malassezia pachydermatis*. Esse fungo tem a forma oval alongada e exibe brotamento unipolar. *M. pachydermatis* é considerado um habitante normal e patógeno oportunista do conduto auditivo externo, também

podendo ser encontrado no reto, nos sacos anais e na vagina. Em pequenas quantidades, pode ser encontrado na pele inflamada, associada às diversas condições, por exemplo, atopia ou defeitos da queratinização. Um aumento na prevalência também está associado a uma antibioticoterapia prévia e a combinações de antibioticoterapia e terapia por glicocorticoides^[4].

Etiologia e Patogênese

As leveduras do gênero *Malassezia* são lipofílicas, patógenos oportunistas do meato acústico externo de cães e gatos, podendo também ser encontradas na pele, no reto, nos sacos anais e na vagina. Nos animais, sua presença está relacionada principalmente às otites externas nos carnívoros domésticos, além de relatos em animais selvagens. A colonização da pele é comumente encontrada em filhotes carnívoros, que constituem uma fonte de *Malassezia pachydermatis* para os humanos^[3,4].

Malassezia pachydermatis é a espécie mais adaptada a animais, sendo frequentemente isolada como microbiota do meato acústico externo e pelame de cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e selvagens. Em cães tem sido comumente associada a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa relacionada a processos de desequilíbrio local, como inflamações do meato acústico externo ou sistêmico como foliculites ou piodermitites^[3]. As leveduras do gênero *Malassezia* sp. são saprófitas, porém *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. sloofiae* são espécies patógenas dos animais domésticos.

É muito comum que o diagnóstico seja realizado pelos clínicos veterinários somente pelo exame clínico no cão, deixando de utilizar um diagnóstico micológico. Assim, é provável que o exame direto possa ter resultado negativo e, caso o clínico não venha a utilizar-se do cultivo para *Malassezia*, pode provocar em alguns cães a progressão da otite para a cronicidade^[1].

Diagnóstico

a) Epidemiologia

Os membros do gênero *Malassezia* são comensais e desenvolvem patogenia em animais predispostos. Mudanças no status imune e no microclima da pele, como quebra da fisiologia epidérmica, podem estar envolvidas na troca de comensalismo para parasitismo, embora os fatores predisponentes sejam pouco conhecidos. A presença de desordens intercorrentes, como alergias, endocrinopatias, atopia, defeitos de queratinização e dobras de pele favorecem o desenvolvimento da infecção. Algumas raças apresentam predisposição e incluem os Cocker Spaniels, Basset Hounds, Poodle miniatura, West Highland White Terriers, Boxers, Daschunds, Shih Tzus, pastor-alemão, entre outras, geralmente raças que possuem orelhas ou pelos longos, favorecendo umidade e calor de algumas regiões e permitindo a instalação da infecção. Existe um aumento sazonal no número de casos em regiões de clima quente e úmido^[4].

b) Sinais clínicos

A infecção por malassézia em caninos é comumente observada em regiões de pregas cutâneas ou que favorecem a umidade e o calor, como o ouvido. Essas lesões podem ser localizadas ou generalizadas, e com maior frequência observadas no espaço interdigital, pescoço ventral, região labial, axila, orelha e regiões de pregas cutâneas, como em volta da vagina. Clinicamente, a infecção é caracterizada por eritema e exsudato acinzentado a amarronzado, com odor característico, favorecendo, ainda, infecções bacterianas secundárias. Prurido leve a severo é observado, além de alopecia traumática, liquenificação, hiperpigmentação e inflamação da prega da unha, acompanhada de descoloração e exsudação^[4].

c) Patologia

Na macroscopia se observam áreas alopecicas, de liquenificação e hiperpigmentação predominantemente no conduto auditivo externo, na face, nas axilas, no ventre e na região interdigital. Os achados na histopatologia incluem dermatite perivasicular superficial ou intersticial linfo-histocítica, com predominância de macrófagos e presença de formas leveduriformes compatíveis com malassézia.

d) Diagnóstico laboratorial

A citologia é uma técnica aceitável para o diagnóstico de rotina das dermatites e otites causadas por malassézia em cães, embora seja reconhecida como menos sensível que a cultura fúngica. Por essa razão, exames diretos e culturas fúngicas são indispensáveis para comprovação e diagnóstico para malasseziose. O sítio anatômico, a raça e a técnica de colheita devem ser considerados na interpretação dos resultados^[1]. A colheita pode ser realizada com um suave da região auricular ou cutânea, por raspagem cutânea, impressão cutânea da lesão em lâmina de vidro desengordurada, ou pela utilização de tiras adesivas (scotch test), que se tem mostrado mais eficaz. A coloração é indispensável e as mais utilizadas são o Gram ou kits de coloração rápida. No cão somente a *Malassezia pachydermatis* foi isolada com certeza, mas ainda assim a cultura é interessante para a identificação e tipagem intraespecífica de cada isolado. Devido às exigências nutritivas das leveduras, os meios enriquecidos com lipídios são os mais apropriados. Pode-se usar, também, Sabouraud adicionado de 1% de óleo de oliva ou meio modificado de Dixon^[2].

e) Diagnóstico diferencial

A infecção por *Malassezia* deve ser diferenciada de outras afecções, como alergia e infecções cutâneas fúngicas e bacterianas, otite bacteriana e parasitária. Infestações por pulgas, piolhos e carapatos também devem ser levadas em consideração, pela presença de prurido.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O cultivo pode ser realizado a partir de amostras de pelos, de suabes estéreis, lavado de superfície cutânea, tiras adesivas pressionadas diretamente sobre as lesões ou da aplicação direta de meios de cultura sobre as lesões ou pelos. A secreção do ouvido externo (direito e esquerdo) deve ser obtida pela utilização de suabes estéreis, após prévia limpeza da cavidade auricular com solução de éter etílico. Após a colheita, as amostras devem ser encaminhadas em temperatura ambiente ao laboratório de micologia^[2,5].

Referências bibliográficas

1. AIZAWA, T. et al. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 329-334, 2001.
2. AQUINO, J.O. et al. Videotoscopia: um novo método de diagnóstico e auxílio terapêutico para desordens auriculares de cães – revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, n. 53, p. 58-62. 2004.
3. BERNARDO, F.M. et al. A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 163-165, 1998.
4. BOND, R. Malassezia dermatitis. In: GREENE, C.E. Infectious disease of the dog and cat. St. Louis: Elsevier, p. 565-569, 2006.
5. NOBRE, M.O. et al. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 245-249, 2001.

3.8 Pitiose em cães

Conceito

A pitiose é uma doença granulomatosa causada por um fungo do gênero *Phytium*. Ela se caracteriza por grandes lesões ulcerativas com seios drenantes, particularmente nos membros, na base da cauda e no períneo, provocando quadro infeccioso na pele e no tecido subcutâneo. Nos equinos tem apresentação gastrointestinal e cutânea, nos bovinos produz doença cutânea, nos felinos e nos humanos apresenta quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital. Essa doença ocorre principalmente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas^[2]. A resposta à terapia em cães é ruim, e a excisão cirúrgica é frequentemente paliativa^[4].

Etiologia e Patogênese

A pitiose é causada pelo oomiceto pertencente ao reino *Straminipila*, *Pythium insidiosum*, sendo o organismo comum em todas as espécies citadas. Não há predisposição por sexo, idade ou raça, e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem. Os caninos são a segunda espécie mais atingida pela pitiose^[3].

Diagnóstico

O diagnóstico da pitiose baseia-se nas características clínicas, histopatológicas e no isolamento e identificação do agente por suas características morfológicas, reprodutivas e de cultura^[4].

a) Epidemiologia

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido descrita nas Américas, em alguns países europeus e no sudeste asiático. Não há predisposição por sexo, idade ou raça, e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais ou entre animais e o homem. As condições ambientais são fundamentais para o desenvolvimento do organismo no meio ambiente. Para a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas. A grande maioria dos casos de pitiose é observada durante ou após a estação chuvosa^[2].

b) Sinais clínicos

A forma gastrointestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos, como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sanguinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos à palpação abdominal^[3]. Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados. A pitiose em gatos é rara, havendo poucos relatos na literatura.

c) Patologia

As lesões gastrointestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino, que são compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas. O trato digestivo superior também pode ser atingido, manifestando esofagite crônica e massa na orofaringe, envolvendo a laringe e o esôfago cranial. As lesões cutâneas apresentam-se como dermatite piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos, além de granulomas eosinofílicos^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

Atualmente, métodos como imuno-histoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e apoiam um diagnóstico precoce e correto. A utilização de técnicas sorológicas como imunodifusão em gel de ágar (IDGA), fixação do complemento (FC) e hipersensibilidade intradérmica (TI) também existe. Teste de ELISA para o sorodiagnóstico de pitiose em humanos e animais utilizando antígeno solúvel de hifas é o método mais indicado por possuir especificidade semelhante à ID, porém com maior sensibilidade^[1].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser realizado de neoplasias, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos ou bacterianos^[4].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de fragmentos teciduais das lesões suspeitas, medindo cerca de 2 x 2cm, devem ser armazenadas em frascos com âmbar e formol a 10% e enviados para o Laboratório de Patologia Animal. Para exames laboratoriais para testes de anticorpos deve-se enviar no mínimo 7ml de sangue para aquisição de soro. Enviar em frasco estéril e armazenar a 4°C^[2].

Referências bibliográficas

1. LEAL, A.T., et al. Pitiose. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001.
2. MENDOZA, L., MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* and its synonym *Pythium destruens* Shipton. **Mycoses**, v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.
3. SANTURIO, J.M., et al. Pitiose: uma doença emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.
4. SANTURIO, J.M., et al. Teste de Elisa indireto para o diagnóstico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, 2006.

4. PRINCIPAIS DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS CÃES

4.1 Leishmaniose

Conceito

As leishmanioses cutânea e visceral são doenças endêmicas registradas mundialmente e consideradas importantes pelo impacto que produzem na saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e implicações econômicas, constituindo-se em um problema sanitário^[2]. A doença tem como agentes etiológicos protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*^[5].

Etiologia e epidemiologia

Muitas espécies de mamíferos, como cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores, são naturalmente infectados por *Leishmania* sp. Entretanto, em áreas endêmicas, os cães são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, constituindo o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral.

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingerre macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* sp^[9]. Estas sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas, que colonizam o esôfago e a faringe

do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. O ciclo biológico completa-se com a picada do flebótomo infectado e subsequente inoculação de formas promastigotas do parasito na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado^[4]. No interior de macrófagos, essas formas se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Ocorre então a disseminação hematógena e linfática para outros tecidos, ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A infecção dissemina-se para os linfonodos, o baço e a medula nas primeiras horas. As principais células responsáveis pela resposta imune à infecção são as células *natura killer*^[7]. A infecção usualmente causa doença sistêmica crônica.

A leishmaniose apresenta-se no Brasil como importante doença parasitária em cães em função de seu espectro clínico, transmissibilidade e potencial zoonótico. A transmissão da *Leishmania chagasi*, é o agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil^[10,12]. O vetor é representado por insetos dípteros conhecidos como flebotomídeos, tendo como principal representante no Brasil a *Lutzomyia longipalpis*, embora recentemente a *Lutzomyia cruzi* também tenha sido incriminada como vetor no estado do Mato Grosso do Sul. Outros possíveis vetores para a *L. chagasi* no Brasil são a *L. intermedia* e a *L. whitmani*. Os parasitos são transmitidos pela picada de insetos flebotomíneos que veiculam as formas promastigotas do parasito de animais infectados para animais susceptíveis ou para o homem^[11].

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

Classicamente, a leishmaniose em cães manifesta-se por febre intermitente, perda de peso, icterícia, anorexia, vômito, emaciação, linfadenopatia, esplenomegalia e hematúria, lesões dermatológicas, diarreia, falência renal, lesões oftálmicas, epistaxe, anemia e onicogriose. Geralmente, são observadas alterações locomotoras, hepáticas, respiratórias, cardíacas e neurológicas^[8].

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é difícil de ser realizado por conta da variedade de sinais da doença. Os achados clínicos são comuns a outras enfermidades, tornando o diagnóstico laboratorial ou parasitológico necessário para a confirmação da suspeita^[8]. Os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sinais após períodos que variam de 3 meses a alguns anos^[7].

b) Diagnóstico laboratorial

As alterações laboratoriais encontradas no hemograma e nos exames de função renal e hepática são inespecíficas^[7]. As alterações histopatológicas também são inespecíficas e as lesões são semelhantes àquelas observadas em outras doenças infecciosas e mediadas pelo sistema imunes. A confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral pode basear-se em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Apesar de discordâncias de pesquisadores, o exame parasitológico ainda é considerado o teste “padrão ouro” para o diagnóstico da doença^[3]. Podem ser observadas formas amastigotas do parasito em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos corados com corantes de rotina, tais como o Giemsa, Wright e Panótico.

Alguns pesquisadores têm sugerido o aspirado esplênico em vez do aspirado de linfonodo como de escolha para o diagnóstico parasitológico. A citologia aspirativa é um método de fácil execução e baixa agressão tecidual. Ocassionalmente, também se observam parasitos em impressões citológicas abaixo das crostas e escamas cutâneas, ou em aspirados de nódulos cutâneos^[6]. Também é possível realizar biópsias de pele colhida de áreas macroscopicamente normais. O lo-

cal mais recomendado é a região superior do focinho (narinas), sendo essa a área preferencial dos vetores. Técnicas como a imuno-histoquímica são sensíveis e específicas para a detecção de抗ígenos da *Leishmania* em tecidos. Nessas técnicas, imunoglobulinas conjugadas a enzimas são utilizadas para identificar抗ígenos em cortes histológicos parafinados ou congelados, exames citológicos e esfregaços sanguíneos^[8]. As vantagens da imuno-histoquímica incluem a sensibilidade, a especificidade e a simplicidade de execução. Na sorologia detectam-se anticorpos anti-leishmânia circulantes.

As técnicas sorodiagnósticas se constituem em instrumento importante no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Animais adoecidos desenvolvem resposta humoral imune e produzem altos títulos de IgG antileishmânia. A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção, e os títulos permanecem elevados por pelo menos 2 anos^[6,9].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico sorológico colhe-se soro sanguíneo ou obtém-se sangue eluível, método no qual amostras de sangue são colhidas por punção da veia marginal auricular do cão com auxílio de microlancetas descartáveis e transferidas por capilaridade para papel filtro padronizado^[8]. O sangue obtido da eluição deve ser analisado com cautela, pois quando comparados com técnicas realizadas no soro, os resultados apresentam sensibilidade inferior.

O teste de ELISA apresenta sensibilidade que varia entre 71% e 100%, e uma especificidade entre 85% e 100%. Dentre os métodos moleculares para diagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito^[6]. A detecção do DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos e tecidos parafinados. Nas amostras de sangue a sensibilidade é baixa, provavelmente devido ao número de parasitos presentes no sangue periférico^[9]. Amostras obtidas de medula óssea têm apresentado menor sensibilidade do que as de pele para a detecção do DNA do parasito.

No diagnóstico imunológico, a intradermorreação, teste de leishmânia ou teste intradérmino de Montenegro, é um teste cutâneo que avalia a resposta imune celular mediante reação de hipersensibilidade do tipo tardia, e tem-se mostrado método auxiliar no diagnóstico da leishmaniose tegumentar nas suas formas clínica cutânea e cutâneo-mucosa^[4]. O diagnóstico também pode ser estabelecido visando à detecção do parasito por cultivo em meios específicos.

Formas amastigotas do parasito inoculadas em meio de cultura especiais contendo ágar e sangue de coelho transformam-se em formas promastigotas. Porém, seu crescimento leva pelo menos de 3 a 5 dias^[3]. Histologicamente, as lesões mais frequentemente observadas são: gastrite hemorrágica aguda, pneumonia intersticial, miocardite não supurativa aguda, às vezes acompanhada de pericardite, nefrite intersticial linfoplasmocitária, e pielonefrite e cistite crônicas. Observa-se hiperplasia linforreticular dos órgãos linfoides, que também demonstram áreas de hemorragia de extensão variável^[1].

Referências bibliográficas

1. AMPUERO J. et al. Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 353-355, 2005.
2. CASTRO E.A. et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná state, Brazil. **Acta Tropica**, n. 93, p. 141-149, 2005.

3. DUJARDIN, J.C. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 1771-1773, 2006.
4. MARTINS, M.L. et al. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 735-743, 2004.
5. MATTOS, J.R.D.G. et al. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. Arquivo Brasileiro de Medicina **Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.
6. OLIVEIRA, L.C.P. **Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no município de Dias D'Ávila, Bahia**. 2003.79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.
7. OLIVEIRA, L.S. et al. Utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 41-47, 2005.
8. PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.
9. RAZEIRA, F. et al. Leishmaniose tegumentar americana: primeiros casos autóctones notificados no Rio Grande do Sul desde 2001 e revisão da literatura. **Revista AMRIGS**, v. 4, n. 3, p. 165-170, 2005.
10. SILVA, A.V.M. et al. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.
11. TEODORO, U. et al. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no Município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1801-1813, 2003.
12. ZANZARINI, P.D. et al. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 957-1961, 2005.

4.2 Babesiose

Conceito

A babesiose canina é uma hemoparasitose causada por protozoários (hematozoário) das espécies *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*. Eles se multiplicam preferencialmente em eritrócitos jovens, levando os cães a anemia hemolítica severa, febre, letargia, esplenomegalia e, em alguns casos, à morte, representando um problema clínico importante na medicina veterinária^[5]. Juntaamente com a erliquiose, é conhecida como “doença do carapato”, sendo transmitida aos cães por espécies de carapatos.

Etiologia e epidemiologia

A babesiose é produzida por protozoários do gênero *Babesia*. Nele são classificadas diversas espécies com características antigênicas distintas que infectam diferentes espécies animais. Existem pelo menos três diferentes espécies que infectam caninos: *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* e *Babesia conradae*^[7]. A *B. gibsoni* é um protozoário pequeno, com tamanho de 1 a 3,2µm, normalmente encontrado em formas isoladas no interior das hemárias. A *B. canis* é um protozoário das grandes babésias, medindo entre 2,4 e 5µm, apresentando-se aos pares no interior das hemárias^[10].

A doença pode estar presente na forma aguda, hiperaguda, crônica e subclínica. A forma aguda é prevalente e atinge principalmente cães jovens, entre 1 e 6 meses de idade. Entre os cães acometidos, a infecção parece não diferir quanto ao sexo^[8]. *Babesia canis* no Brasil é transmitida pela picada do *Rhipicephalus sanguineus*, também chamado de carapato marrom do cão. Casos de *Babesia canis* foram descritos nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais^[9].

Apesar dos estudos realizados, pouco se sabe sobre a epidemiologia da doença em cães residentes no país. Além disso, a alta morbidade da babesiose tem gerado grande preocupação para os criadores de cães, tanto pelo aspecto afetivo quanto pelo impacto negativo na comercialização dos animais^[11]. As elevadas taxas de infecção por *Babesia* spp. em áreas urbanas de regiões tropicais se devem às condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento e a manutenção de populações do vetor *Rhipicephalus sanguineus*^[9,11].

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

Os sinais clínicos dependem da espécie, da imunidade do hospedeiro, da idade e das doenças concomitantes^[6]. A anemia hemolítica autoimune é a principal alteração observada, sendo acompanhada de complicações como insuficiência renal aguda, sinais neurológicos, coagulopatias, hepatopatia, hemoconcentração, hipotensão e síndrome da angústia respiratória^[8]. A glomerulonefrite pode ser explicada pela anemia hemolítica severa que resulta em lesão tubular, nefrite intersticial e glomerulopatia. O mecanismo autoimune resulta da deposição de imunocomplexos nos glomérulos, levando à glomerulonefrite e podendo causar os sinais neurológicos^[11]. As manifestações neurológicas, como convulsão e ataxia locomotora, sintomas vestibulares ou cerebelares podem ocorrer também em filhotes devido à grande concentração de hemácias parasitadas nos capilares do sistema nervoso central, causando hipóxia cerebral^[4]. Filhotes ou cães adultos infectados por *B. gibsoni* que apresentam sinais clínicos agudos podem vir a óbito.

A forma hiperaguda é incomum, sendo observada em filhotes e geralmente associada a intensa parasitemia e alta infestação por carapatos. A apresentação aguda e hiperaguda é comum na África do Sul, sendo produzida pela *B. canis Rossi*. Esse parasita raramente é relatado no Brasil, e quando acontecem casos, geralmente são observados em filhotes. No Brasil, a forma subclínica da babesiose canina é provavelmente a apresentação predominante nos cães infectados. A imunidade celular é a mais importante no combate às infecções por *Babesia* spp.^[5]. A fagocitose de hemácias danificadas, parasitas livres e intraeritrocitários ocorre no baço e no fígado. A atividade fagocítica dos macrófagos aumenta por ação direta do parasita.

Os anticorpos detectados por imunofluorescência indireta aparecem cinco a doze dias após a infecção experimental e alcançam um valor máximo em média 21 dias após a infecção. A duração da imunidade protetora é de 4 a 5 meses após a infecção por *Babesia canis*. Não ocorre proteção cruzada contra cepas heterólogas de *Babesia canis*^[4].

b) Diagnóstico laboratorial

Dentre os achados laboratoriais mais frequentes podem ser citadas a anemia de característica regenerativa, a bilirrubinúria, a hemoglobinúria, a trombocitopenia e a leucocitose por neutrofilia, decorrentes da resposta medular à crise hemolítica^[3]. Os métodos para diagnóstico da babesiose canina baseiam-se na observação direta do agente, de seus componentes ou na detecção de anticorpos^[2]. O agente pode ser visualizado diretamente nos eritrócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa ou pela coloração de Romanowsky. Essas técnicas são altamente específicas.

cas, porém apresentam baixa sensibilidade, pois a parasitemia é variável, dificultando a visualização de eritrócitos parasitados.

A não detecção do parasita em esfregaço sanguíneo não significa a ausência de infecção. Todavia, a análise citológica do esfregaço sanguíneo é imprescindível, pois permite a diferenciação morfológica entre *Babesia canis* (maior, com cerca de 2 a 5 μ m) e *Babesia gibsoni* (1 a 3 μ m)^[1]. Essa diferenciação é necessária porque há reação sorológica cruzada entre as duas espécies. Os testes sorológicos são de grande utilidade na doença crônica, uma vez que a baixa parasitemia dificulta a emissão de diagnóstico apenas com base na análise das hemácias e no esfregaço sanguíneo^[5].

Dos testes sorológicos empregados, a reação de imunofluorescência indireta é considerada um método sensível e específico, pois detecta anticorpos séricos em animais portadores ou com infecções crônicas que mantêm parasitemia baixa ou não detectável. Títulos de anticorpos superiores a 40, ou soroconversão após intervalo de 15 dias, permitem diferenciar animais doentes daqueles nos quais há anticorpos remanescentes de uma infecção precedente, o que não significa doença ativa. Desse modo, testes sorológicos qualitativos ou semiqualitativos, como os do tipo ELISA, devem ser avaliados. É uma técnica simples e sensível, porém pouco específica, pois há reação cruzada entre *B. canis* e *B. gibsoni*^[4].

Técnicas de ELISA e dot-ELISA são mais frequentemente utilizadas para estudos epidemiológicos do que para diagnóstico clínico. O emprego de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser útil para detectar regiões do DNA de *Babesia* spp.^[2]. Essa técnica é sensível, específica, rápida e simples para o diagnóstico de infecção para várias espécies do gênero *Babesia*. A PCR proporciona o diagnóstico em infecções agudas, subclínicas ou crônicas mesmo nos casos de baixa parasitemia. A PCR também pode ser utilizada para monitoramento de terapia, detecção de animais portadores de *Babesia* spp. e em estudos epidemiológicos sobre a distribuição geográfica desse patógeno emergente^[11].

A infecção pela babésia constitui-se em uma das doenças do carrapato, juntamente com a erliquiose canina. Outro parasita transmitido por carrapatos infectados aos cães é o *Hepatozoon* spp. O diagnóstico é baseado na presença do vetor, na distribuição do parasita, bem como na detecção dele em amostras clínicas, uma vez que os sinais clínicos da erliquiose e da babesiose são semelhantes^[10]. A babesiose clínica pode ser confundida com outras afecções que causam febre, anemia, hemólise, icterícia ou urina vermelha, tornando o diagnóstico com esfregaço essencial.

Ainda que o diagnóstico específico dependa da detecção dos parasitas nos eritrócitos, a parasitemia é frequentemente inferior a 5% e também pode ser complicada pela presença simultânea de inclusões nos monócitos da riquetsia *Ehrlichia canis*, igualmente transmitida pelo carrapato *R. sanguineus*. Da mesma forma, a presença de outros hemocitozoários, como *Haemobartonella* e *Hepatozoon* spp. dificulta o diagnóstico^[12].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exames laboratoriais, deve-se remeter sangue para o hemograma armazenado à temperatura de 4°C. O sangue colhido dos capilares marginais das orelhas para a realização de esfregaços sanguíneos deve ser encaminhado congelado a -4°C quando enviado de longas distâncias. Para esfregaços, as amostras de sangue devem ser colhidas a vácuo, sendo 4ml de sangue em EDTA a 10% para pesquisa de hematozoários, contagem de hemácias, reticulócitos e plaquetas; determinação da concentração de hemoglobina, fibrionogênio plasmático bem como da contagem total e diferencial de leucócitos. Se o profissional optar por fazer os esfregaços e enviar as lâminas para leitura, a inserção da agulha para obter o sangue deve ser com uma lâmina extensora e deverá ser corada com corante comum panótico rápido. As lâminas deverão ser encaminhadas em tem-

peratura ambiente^[3]. A amostra de medula óssea deve ter no mínimo 1ml de sangue e ser remetida em temperatura ambiente a pequenas distâncias e a -4°C para longas distâncias. Para detecção por imunofluorescência ou identificação por PCR de *Babesia canis*, enviam-se 5ml de sangue sem anticoagulante. Pode-se, ainda, encaminhar 1ml de sangue da medula óssea, com anticoagulante, colhido da crista ilíaca ou de ossos longos para avaliar a presença de anemia normocítica normocrômica arregenerativa e supressão medular. Fragmentos múltiplos de rim, fígado, SNC e medula espinhal devem ser encaminhados em formalina 10% em temperatura ambiente para histologia^[9].

Referências bibliográficas

1. ABDULLAHI, S.U. et al. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 3, p. 145-147, 1990.
2. BASTOS, C.V. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Annals New York Academy of Sciences**, n. 1026, p. 158-160, 2004.
3. BRACCINI, G.L. et al. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos 1986-1990. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 20, p. 134-14, 1992.
4. CAVALCANTI, L.F.H. et al. Nephrotic syndrome in dog associated *Babesia canis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 3, p. 335-338, 2006.
5. CONRAD, P. et al. Hemolytic anemia caused by *Babesia gibsoni* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 5, p. 601-605, 1991.
6. DELL'PORTO, A. et al. *Babesia canis* in stray of city of São Paulo. Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veteterinária**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1993.
7. KJEMTRUP, A.M., CONRAD, P.A. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 112-117, 2006.
8. LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, ano 6, n. 30, p. 24-32, 2001.
9. O'DWYER, L. H. et al. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.
10. PACHECO, A.M. et al. Erliquiose e Babesiose – relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IV, n. 13, 2009.
11. PASSOS, L.M.F. et al. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dog from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.
12. LEATCH, G. B. V. Parasitas sanguíneos. In: **Manual Merck de veterinária**. 8. ed., São Paulo: Editora Roca, 2001. p. 20-23.

4.3 Dirofilariose

Conceito

A dirofilariose destaca-se entre as helmintoses que acometem os canídeos por ser apontada como uma das principais causas de cardiopatia parasitária idiopática nesses animais, ocorrendo em determinadas regiões do Brasil^[11].

Etiologia e Patogênese

Canídeos domésticos e silvestres são considerados os hospedeiros naturais e principais reservatórios desta parasitose, embora outros mamíferos possam ser acometidos, inclusive o homem. A dirofilariose constitui-se em uma zoonose emergente, causada por um nematoide filarídeo, a *Dirofilaria immitis*, cuja transmissão ocorre pela picada de mosquitos da família *Culicidae*^[5].

A dirofilariose canina é enzoótica em muitas áreas, ao passo que a infecção entre os felinos é muito menos comum, sendo o cão considerado a principal fonte de infecção para os mosquitos vetores^[8]. No Brasil, a dirofilariose está amplamente distribuída.

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

A doença é de difícil diagnóstico clínico, pois pode ser assintomática ou apresentar sintomas comuns a muitas patologias, como tosse e dispneia (considerados os mais comuns à dirofilariose), redução da capacidade de exercícios e, em alguns casos mais graves, o animal pode apresentar caquexia.

Apesar de vários filariídeos infectarem os cães, somente a *Dirofilaria immitis* tem sido relatada por produzir alterações patológicas, incluindo lesões cardiovasculares, pulmonares, hepáticas e renais^[8]. Os mosquitos infectam os cães com larvas infectantes, que penetram pelo tecido subcutâneo e atingem o coração 90 a 100 dias após a infecção, causando lesões obstrutivas na artéria pulmonar, lesões endoteliais, infarto pulmonar com consequente hipertensão pulmonar e pós-carga ventricular direta, insuficiência ventricular e insuficiência cardíaca congestiva direita^[7].

Os parasitos alcançam a forma adulta no lado direito do coração e nas artérias pulmonares do cão, gato e outros mamíferos e, ocasionalmente, podem ser encontrados fora do sistema vascular. Dependendo da evolução da doença, os sinais clínicos podem comprometer o estado geral do paciente, podendo levá-lo à morte^[3]. Contudo, medidas terapêuticas e cirúrgicas podem ser utilizadas com sucesso no tratamento adulticida e microfilaricida, embora reações anafiláticas durante o tratamento possam acontecer em cães com dirofilariose que apresentam síndrome da veia cava^[3].

b) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da dirofilariose canina inclui a pesquisa das microfilárias por técnicas como o teste de Knott modificado e testes imunodiagnósticos que se baseiam na detecção de抗ígenos do parasito. Eles têm sido estudados quanto ao seu potencial uso diagnóstico em animais e no homem infectados com parasitos filariais para a detecção de anticorpos, pois são considerados de baixa especificidade^[7]. Contudo, pelo emprego dos testes sorológicos, foi possível chegar ao diagnóstico da forma oculta da doença. Uma forma alternativa para a detecção de anticorpos é o teste de *Immunoblot*, que detecta bandas específicas do parasito.

Sangue periférico pode ser lisado para a realização de esfregaços espessos corados com Giemsa, conforme descrito abaixo^[6]. As lâminas podem ser examinadas em microscópio óptico, utilizando-se objetivas de 10 e 40 vezes para a procura e identificação específica do gênero das microfilárias. Para validação do teste de Knott modificado, realiza-se teste de PCR com aproximadamente 20 a 30 amostras sanguíneas aleatórias^[2,10]. Sabendo que haverá sempre a possibilidade de falso-negativos, para os casos sintomáticos em que não se obtém resultado satisfatório podem-se utilizar outros testes para as repetições, como ELISA, imunocromatografia, hemoaglutinação, radiografia e ecocardiografia, reduzindo assim o percentual total de falso-negativos. Sen-

do a probabilidade de falso-positivos remotos, resultados positivos para apenas um dos testes serão soberanos sobre os negativos^[3,9]. Contudo, os retestes são sempre recomendados. No primeiro momento, os testes apenas serão sensíveis a infestações de tempo superior a 7 meses, portanto, mesmo em não se considerando os falso-negativos, pode-se oferecer como resultado que há 7 meses o paciente não estaria com a doença^[4], mas não se pode garantir o mesmo para o momento do teste, ou seja, o paciente pode ter sido contaminado há um período inferior a 7 meses e ainda não apresentar positividade nos exames^[1]. Dessa forma, repetindo-se após 7 meses fecha-se essa faixa temporal de insensibilidade do exame.

Embora exista sensibilidade das formas imaturas e adultas jovens ao microfilaricida, ela não é total, podendo haver indivíduos resistentes à terapia, sobrevivendo ao tratamento com macrolídeos^[4]. A repetição do teste a cada 2 ou 3 anos é recomendada como certificação do tratamento profilático^[1]. Quando o exame é realizado através da necropsia, devem-se encaminhar para análise fragmentos do pulmão e coração^[9].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a realização dos exames laboratoriais, colhem-se aproximadamente 7ml de sangue da veia cefálica, dos quais cerca de 2ml devem ser acondicionados para pesquisa de microfilárias pelo método de Knott modificado, e aproximadamente 5ml restantes mantidos em tubos de ensaio, com capacidade para 15ml, que devem ser deixados em repouso, inclinados, para dessorar, em caixa de isopor com gelo, durante o período em que se aguarda para envio ao laboratório para, após esse tempo, serem transferidos para refrigerador^[2,7]. Aproximadamente 12 horas depois, os soros devem ser obtidos e submetidos à centrifugação (1.200rpm por 15min) e transferidos para microtubos identificados e colocados em freezer a -20°C para estocagem ou para análise direta ao teste de *Immunoblot*.

Sangue periférico também pode ser adicionado a um tubo Falcon de 15ml contendo 10ml de uma solução de formalina a 2% (2ml de solução de formaldeído a 37% em 98ml de água destilada). Inverte-se o tubo suavemente e deve-se mantê-lo em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos para a lise de hemácias e fixação das microfilárias^[3,7]. Após esse período, centrifuga-se o sangue por 5 minutos a 1.500rpm e despreza-se o sobrenadante. Realizam-se esfregaços espessos com 35µl do sedimento em uma lâmina. Depois de seco o sedimento, afixa-se a lâmina com metanol e, em seguida, cora-se com Giemsa^[6].

Referências bibliográficas

1. BLATT, G. **Relatório técnico de avaliação de ações de controle da dengue dentro do PEA**. Cuiabá: Prefeitura Municipal de Cuiabá / Centro de Controle de Zoonoses, 1998. 3p.
2. BRITO, L. et al. Infecção por *Dirofilaria immitis* em cães de Maceió. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, p. 210-211, jun. 2000.
3. BRITO, A.C. et al. Prevalence of canine filariasis by *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in Maceió, Alagoas State, Brazil, **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1497-1504, 2001.
4. CANAL, I.H. et al. Dirofilariose. **Revista Nossa Clínico**, v. 45, 2005.
5. CAVALLAZZI, R.S. et al. Dirofilariose pulmonar humana: relato de sete casos. **Jornal Pneumologia**, v. 28, n. 2, p. 100-102, 2002.
6. COURTNEY, C.H.; ZENG, Q.Y. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariasis. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 199-204, 2001.

7. FERNANDES, C.G.N. et al. Epidemiological aspects of canine dirofilariasis in the metropolitan area of Cuiabá, Mato Grosso: the use of «Immunoblot» and of modified Knott test, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 4-14, 2000.
8. LABARTE, N. et al. Description of the occurrence of dirofilariasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 47-51, 1997.
9. LARSSON, M.H.M.A. et al. Diagnóstico de dirofilariose oculta pelo teste de ELISA, em cães do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 93-96, 1992.
10. SMYTH, J.D. Rare, new and emerging helminth zoonoses. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 1-45, 1995.
11. SOUZA, N.F. et al. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém, PA, com base na microfilaremia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 83-6, 1997.

4.4 Toxoplasmose

Conceito

Toxoplasmose canina é uma protozoonose extremamente difundida no mundo, causada pelo *Toxoplasma gondii*.

Etiologia e Patogênese

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, da família Sarcocystidae, ordem Coccidia, de distribuição mundial^[5], ocorrendo em diversas espécies homeotérmicas, incluindo o homem^[2,6].

Os felídeos, principalmente os gatos, desempenham papel fundamental na transmissão do *T. gondii* para o homem e outros animais, pois são os únicos hospedeiros que eliminam oocistos do parasita pelas fezes. Os oocistos são resistentes às condições ambientais e resultam da fase sexuada do ciclo, que é limitada ao epitélio intestinal desses animais^[5]. O papel do gato nesta zoonose é relacionado à produção de oocistos e à perpetuação da doença pela contaminação ambiental e por sua manutenção na cadeia alimentar^[10]. As primeiras descrições da presença do *T. gondii* na espécie canina ocorreram na Itália no ano de 1910 por Mello, e no Brasil em 1911 por Carini^[12]. Essa espécie possui alta suscetibilidade à infecção pelo parasito^[9].

Em sociedades onde o consumo de carnes cruas ou mal cozidas é frequente, bem como em regiões onde o saneamento básico é precário, observam-se taxas mais elevadas de infecção^[7]. A prevalência elevada da toxoplasmose em cães pode demonstrar um ambiente altamente contaminado, visto que a infecção é facilitada por seus hábitos alimentares e estreito contato com o solo^[4,11]. Do ponto de vista da saúde pública, a infecção da população canina significa que a área envolvida representa um nicho ecológico para esse coccídio e, consequentemente, um risco à população humana^[8]. O teste de cães como agentes de transmissão mecânica do *T. gondii* determinou que os animais, após a ingestão forçada de oocistos esporulados, foram capazes de eliminá-los nas fezes de forma viável e infectante^[7].

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

Entre os poucos trabalhos de inoculação experimental em cães encontrados na literatura, destacam-se as lesões oculares. Alguns autores descreveram retinite, coroidite e a presença de du-

as formas da doença observadas em cães: uma severa, multisistêmica e normalmente fatal, mais comum em cães jovens; a outra, localizada no sistema nervoso central e periférico^[1,6]. Os principais sinais clínicos são anorexia, letargia e pneumonia acompanhada de tosse. A forma severa é multisistêmica e geralmente fatal nos cães jovens. Os cães podem apresentar, ainda, esplenomegalia e insuficiência renal^[5,8].

b) Diagnóstico laboratorial

O teste de aglutinação direta (MAD) tem sido utilizado para evidenciar aglutininas anti-*Toxoplasma gondii* em diversas espécies animais domésticas e silvestres^[4]. Para execução do MAD, os soros são diluídos em solução salina tamponada (SST) (diluição 1:16) e transferidos para microplaca com fundo em V, adicionando-se 2-mercaptoetanol 0,1M e o antígeno. As placas devem ser mantidas em temperatura ambiente por período mínimo de seis horas, sendo consideradas positivas aquelas diluições dos soros em que se formava uma película que cobre pelo menos 50% da cavidade, e negativas quando se forma botão ou anel no fundo da cavidade.

O diagnóstico também pode ser realizado sorologicamente pela imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* da classe IgG^[3]. Os cães que apresentarem alterações na oftalmoscopia direta podem ser submetidos à oftalmoscopia indireta para análise da presença ou não de iridociclite e coriorretinite.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a realização dos exames sorológicos colhem-se amostras de soro, que devem ser armazenadas a -20°C em microtubos plásticos, sendo descongeladas apenas no momento de execução do exame sorológico. Para exame histopatológico, colhem-se fragmentos de retina e anexos oculares, bem como de baço, cérebro, coração, fígado, linfonodos, medula espinhal, músculo, pulmão e rins^[1].

Referências bibliográficas

1. ABREU, C.B. et al. Ocular toxoplasmosis in young dogs inoculated with *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 807-812, 2002.
2. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington: Organización Panamericana de la Salud, **Toxoplasmosis**, p. 646-658, 1986.
3. CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117-118, 1964.
4. DUBEY, J.P et al. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in experimentally infected pregnant goats and transplacentally infected kids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 1137-1140, 1985.
5. DUBEY, J.P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995a.
6. DUBEY, J.P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 723-729, 1995b.
7. FRENKEL, J.K., Transmission of toxoplasmosis and role of immunity in limiting infected transmission and illness. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 233-239, 1990.

8. GERMANO, P.M.L et al. Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imuno-fluorescência indireta, na cidade de Campinas, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 1, p. 53-58, 1985.
9. GUIMARÃES, A.M. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 1, p. 67-68, 1992.
10. LAPPIN, M.R. Feline zoonotic diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 57-79, 1993.
11. LINDSAY, D.S. et al. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 27-33, 1997.
12. VIDOTTO, O. Toxoplasmose: Epidemiologia e Importância da Doença na Saúde Animal. **Seminários Ciências Agrárias Londrina**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 1992.

4.5 Giardíase

Conceito

A giardíase é uma infecção do intestino delgado causada pelo protozoário flagelado do gênero *Giardia*^[5,8].

Etiologia e epidemiologia

O gênero *Giardia* foi descrito em 1882, ao se observar um flagelado presente no intestino de girinos de anfíbios anuros^[13]. Esse gênero é constituído por protozoários cosmopolitas que ocorrem principalmente em regiões tropicais, mas pode ser encontrado em temperaturas variadas^[3]. Atualmente, a classificação aceita para o gênero *Giardia* é descrita de acordo com as características morfológicas. Dessa forma, três espécies são descritas: *G. agilis*, *G. muris* e *G. intestinalis*, esta última também denominada *G. duodenalis* ou *G. lamblia*. Sabe-se hoje que somente a *G. intestinalis* parasita o homem e diversas espécies de mamíferos, o que indica o grande potencial zoonótico desse protozoário^[12].

Existem evidências de que *Giardia* sp. não apresenta especificidade quanto ao hospedeiro e pode parasitar seres humanos, assim como uma variedade de outros animais, sendo considerada uma importante zoonose^[5,8]. No sul da Alemanha, as infecções por *Giardia* spp. ocorrem com maior frequência em filhotes de cães e em canis ou em estabelecimentos de criação intensa do que em animais mais velhos, cães mantidos individualmente como animais de estimação ou cães de canis de pequeno porte^[2]. Entre os mamíferos, os cães são comumente parasitados e sua prevalência em diferentes regiões do mundo é variável, dependendo principalmente da localização geográfica, do método de detecção utilizado e da população estudada^[3].

A giardíase é cosmopolita, sendo encontrada principalmente em zonas tropicais e temperadas. O cisto é a forma infectante, e mede em torno de 7µm de largura por 10µm de comprimento. O trofozoíto mede 10µm de largura por 15µm de comprimento^[10]. A transmissão ocorre pelo contato direto, principalmente entre cães procedentes de canis e criações, pela rota fecal-oral^[11]. No entanto, a infecção também pode ser adquirida pela ingestão de água e alimentos contaminados com cistos eliminados junto das fezes. Cistos e, ocasionalmente, trofozoítos são encontrados nas fezes do hospedeiro entre o quinto e o décimo dia de infecção^[13]. Os cistos são suscetíveis à dessecção no meio externo e a temperaturas elevadas, mas podem sobreviver por vários meses fora do hospedeiro, em locais úmidos e frios.

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

As infecções por *Giardia* em vários animais são quase sempre assintomáticas, sendo esses animais os prováveis transmissores assintomáticos^[2]. Nos sintomáticos, os aspectos específicos da giardíase, quando ocorrem, incluem aqueles atribuídos à má digestão dos nutrientes: fezes pálidas e fétidas, esteatorreia, diarreia crônica, perda de peso ou pequeno ganho de peso, apesar de o apetite apresentar-se normal. Esses sinais podem ser constantes ou intermitentes, podendo desaparecer durante a administração de antidiarreicos inespecíficos, retornando, porém, após sua retirada^[9].

Diarreia hemorrágica, febre e vômitos são improváveis de ser unicamente devidos à giardíase. Os sinais clínicos não são patognomônicos e os testes laboratoriais (hematológico, bioquímica do sangue, radiologia e ultrassonografia), apesar de não ser específicos, podem auxiliar no diagnóstico. A identificação de cistos e trofozoítos da *Giardia* em amostras fecais é o método mais simples e barato para diagnóstico da infecção^[10]. Embora o assunto seja controverso, a giardíase deve ser considerada uma zoonose em potencial, pois estudos mais recentes têm demonstrado que algumas cepas provenientes do homem e de outros animais têm propriedades antigênicas, genéticas e bioquímicas similares, enquanto outras não apresentam essas propriedades. Desse modo, medidas de precaução devem ser observadas pelo homem quando em contato^[1,2].

b) Diagnóstico laboratorial

Muitas vezes o diagnóstico da *Giardia* é complexo devido à intermitência da eliminação dos cistos e da falta de sinais clínicos patognomônicos^[1]. O diagnóstico não pode basear-se somente nos achados de cistos ou trofozoítas nas fezes, já que o cão pode estar infectado e não eliminá-los, ocasionando um resultado falso-negativo^[10]. A realização de esfregaços de fezes é a forma mais simples, porém considerada pouco eficaz, para a pesquisa de *Giardia*, e pode ser conduzida pelo clínico sem a necessidade de materiais ou recursos caros e específicos; somente lâminas, lamínulas e um microscópio^[13]. Nas fezes diarreicas contendo trofozoítas percebe-se a movimentação circular do parasito; já os cistos podem ser mais bem visualizados nas fezes com consistência pastosa ou firme^[8]. Entretanto, mesmo sem ser encontrados trofozoítas ou cistos, a possibilidade de ocorrência de giardíase não deve ser descartada. Técnicas que promovem a flutuação dos cistos utilizando soluções saturadas de sulfato de zinco ou de açúcar permitem o diagnóstico da maioria dos casos^[4].

Cerca de 60% a 70% dos casos positivos são diagnosticados pela técnica de sulfato de zinco quando o exame das fezes é realizado somente uma vez, porém, aproximadamente 90% dos casos são detectados quando a técnica é repetida. Por isso, recomenda-se a realização de pelo menos duas repetições^[10]. Técnicas de diagnóstico mais sofisticado, como imunofluorescência e a PCR, entre outras, têm sido utilizadas experimentalmente com grande sucesso no diagnóstico com amostras pouco representativas de fezes^[7].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O ideal é colher três amostras de 10g de fezes, em intervalos de 7 dias entre cada uma delas^[3]. Do bolo fecal, colhe-se a parte superior procurando-se reduzir a contaminação com o solo. As fezes devem ser colocadas em frascos coletores, sem conservante, e identificados com nome, raça, idade, data da colheita e aspectos das fezes no dia da colheita. As amostras fecais devem ser conservadas à temperatura de 4°C até o momento do processamento^[1].

A técnica de aspiração duodenal tem demonstrado ser mais eficiente do que a técnica usual de flutuação em sulfato de zinco, principalmente em cães que apresentam sinais clínicos da doença^[13]. Para a realização desse procedimento, necessita-se de no mínimo 10ml de solução salina, que devem ser injetados no intestino através de endoscópio e, em seguida, aspira-se um volume igual ao injetado (contendo fezes e solução salina)^[5,6]. Em seguida, o material colhido deve ser encaminhado ao laboratório em temperatura ambiente para ser centrifugado e examinado sob microscopia de luz. Outro método para diagnóstico de *Giardia* é o ELISA, que detecta抗ígenos nas fezes conservadas em formol (10%) ou mantidas sob refrigeração (4°C)^[12,13].

Referências bibliográficas

1. BARR, S.C. et al. Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 2028-2031, 1992.
2. BARTMANN, A.; ARAÚJO, F.A.P. Frequência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1093-1096, 2004.
3. BECK, C. et al. Frequencia da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 126-130, 2005.
4. BUGG, R.J. et al. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. **Veterinary Journal**, v. 157, p. 295-301, 1999.
5. CASTOR, S.B., LINDQVIST, K.B. Canine giardiosis in Sweden: no evidence of infectivity to man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 249-250, 1990.
6. CIMERMAN, S. et al. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 203-206, 1999.
7. GENNARI, S.M.; SOUZA, S. **Giardíase**. São Paulo: Fort Dodge Saúde Animal LTDA, 2002. 13p. (Boletim Técnico).
8. HOREJS, R.; KOUDELA, B. Giardiasis in dogs in a breeding kennel. **Veterinary Medicine**, v. 39, p. 93-101, 1994.
9. KEULEN, H. et al. Presence of human Giardia in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 97-107, 2002.
10. LALLO, M.A. et al. Giardiasis in dogs and cats – a review. **Clínica Veterinária**, n. 43, 2003.
11. LEIB, M.S.; ZAJAC, A.M. Giardiasis in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, v. 94, n. 9, p. 793-802, 1999.
12. OLIVEIRA-SEQUÉIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 19-27, 2001.
13. QUADROS, R.M. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp (Tyzzer, 1907) detectada pelo método de imunofluorescência através da técnica de coloração da auramina em propriedades rurais do município de Lages (SC), Brasil**. 2002. 66f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

4.6 Neosporose

Conceito

É uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum* que podem afetar o sistema nervoso, resultando em sinais clínicos neuromusculares. É um parasita coccídeo que tem comportamento semelhante ao toxoplasma nos tecidos e só recentemente foi reconhecido como uma espécie distinta. Não se conhece seu ciclo de vida completo e infecções naturais em cães têm sido observadas.

Etiologia e epidemiologia

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório formador de cistos, do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, que apresenta distribuição mundial^[4,6]. Os oocistos esporulam em 24 a 72 horas, ficando cada oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Ainda é desconhecida a sobrevivência desses oocistos no ambiente. O hospedeiro intermediário ingere o oocisto esporulado, ocorre a liberação dos esporozoítos na luz intestinal, penetram nas células da parede e passam a se chamar taquizoítos. São ovoides, lunares ou globulares, dependendo do estágio de divisão, e medem 6 x 2mm^[2]. Os taquizoítos se dividem rapidamente, e podem penetrar em diversas células do hospedeiro (macrófagos, polimorfonucleares, neurônios, fibroblastos, endotélio vascular, miócitos, células tubulares renais e hepatócitos) causando severas lesões em diferentes órgãos. Alguns se transformam em bradizoítos, dentro de cistos de parede espessa, permanecendo latentes, em lenta divisão. Os cistos são ovais ou circulares, com mais de 107mm de diâmetro, encontrados, sobretudo no SNC, inclusive na retina. A parede é lisa, com 1 a 4mm de espessura, e o cisto não é septado. Os bradizoítos são resistentes a soluções pépticas e ácidas, indicando que seu ciclo pode envolver a ingestão por carnívoros^[5].

O protozoário tem o cão como hospedeiro definitivo, tendo outras espécies, como hospedeiros intermediários. Foi primeiramente constatado em cães na Noruega, sendo relacionado a um quadro de paralisia com a presença de cistos no cérebro e no tecido muscular. Esses animais, no entanto, não tinham anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, que pode causar lesões similares. No ano de 1988, verificou-se que esse agente causava uma forma clínica mais severa do que *T. gondii*, e foram constatadas diferenças estruturais e histopatológicas entre ambos. Desde então o agente passou a ser chamado de *Neospora caninum*, e possivelmente foi diagnosticado até o final da década de 80 como *T. gondii*^[5].

Em populações caninas, as soroprevalências variam muito entre regiões, sendo geralmente maior entre cães rurais do que entre urbanos, evidenciando a importância desse protozoário como causador de lesões neurológicas em cães da região^[2]. O uso de cães para o manejo de bovinos de leite e de corte pode facilitar a contaminação de pastagens e aguadas, aumentando a probabilidade de infecção do rebanho. Cadelas com infecção subclínica podem transmitir *Neospora caninum* pela via transplacentária a seus fetos, e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas. A maioria dos casos clínicos ocorre em filhotes infectados congenitamente^[9].

A infecção horizontal (pós-natal), pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos liberados pelos cães, também pode ocorrer, sobretudo em casos de surtos de abortos. Vários pesquisadores constataram associação entre soroprevalência (e abortos) dos bovinos e presença de cães na propriedade, comprovando que o convívio cães-bovinos aumenta a prevalência de soropositivos para *Neospora caninum* em ambas as espécies^[9]. Da mesma forma, os cães de propriedades rurais apresentaram maior prevalência de infecção do que os de área urbana. Isso sugere que os cães de área rural podem adquirir a infecção pela ingestão de alimento contaminado

de origem bovina, como fetos, membranas fetais e fluidos. O papel dos canídeos silvestres nessa cadeia epidemiológica precisa ser estudado^[3].

Estudos sequenciais de genes de uma pequena subunidade do RNA ribossomal de *Neospora* sp. isolados de bovinos e de cães não revelou diferenças entre ambos, indicando serem da mesma espécie, ou seja, *Neospora caninum* é a espécie que provoca aborto em bovinos^[2]. O cão é o hospedeiro definitivo, capaz de eliminar oocistos nas fezes, o que pode ser constatado após inoculação, por via oral, de cistos teciduais de camundongos infectados.

No Brasil, *Neospora caninum* foi diagnosticado a partir de 1999 em fetos abortados e por levantamentos sorológicos de bovinos e cães de diferentes estados. O cão é o hospedeiro definitivo do *Neospora caninum* e elimina oocistos do protozoário em suas fezes. Possivelmente outros canídeos também podem fechar o ciclo do protozoário, como o *Pseudalopex gymnocercus* e o *Cerdocyon thous* (sorros, graxains ou cachorros do mato) da região sul do RS, nos quais já foram encontrados anticorpos anti-*Neospora*^[9]. Além disso, o cão também serve como hospedeiro intermediário, formando cistos em seus tecidos, à semelhança de equinos, bovinos, ovinos, caprinos e veados. O hábito de alimentação dos cães nessas regiões inclui os resíduos da carcaça de animais abatidos sem o devido tratamento, contribuindo significavelmente para a disseminação do parasita^[8,9]. Não há relatos no mundo de casos da doença em humanos, embora já tenham sido detectados anticorpos anti-*Neospora caninum*.

Diagnóstico

O diagnóstico clínico no cão é difícil, pois os sinais de origem nervosa podem ser confundidos com traumatismos, patologias do disco intervertebral, cinomose, raiva, entre outras doenças.

a) Características clínico-patológicas

A neosporose é caracterizada por uma paralisia ascendente, com os membros posteriores geralmente mais afetados, podendo apresentar hiperextensão rígida ou flácida, provavelmente decorrente da poliradiculoneurite e miosite causadas pela infecção. Podem, ainda, apresentar dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, cegueira, convulsões, incontinência urinária e fecal, flacidez, atrofia muscular e falha cardíaca^[2]. Em cães adultos a apresentação é mais variada, e além do quadro neuromuscular, podem ocorrer dermatite piogranulomatosa, miocardite fatal e pneumonia. Os cães podem sobreviver durante meses com paralisia progressiva, meningoencefalite, insuficiência cardíaca, complicações pulmonares e, muitas vezes, os animais precisam ser submetidos à eutanásia.

O diagnóstico diferencial deve incluir diferentes patologias do disco intervertebral, cinomose e raiva, além de outras doenças que cursam com sinais neurológicos.

b) Diagnóstico laboratorial

Exames hematológicos de bioquímica clínica podem auxiliar, observando-se elevação dos níveis de creatinina, enzimas hepáticas e proteínas totais do liquor. Podem ser detectados bradizoítos no liquor^[4]. Nas fezes, podem ser encontrados oocistos que precisam ser diferenciados de outros gêneros após sua esporulação, principalmente de *Hammondia* sp., cujo oocisto também é dispórico e tetrazoico (2 esporocistos, com 4 esporozoítos cada), além de apresentar tamanho similar. Para isso, é realizada a inoculação experimental em animais de laboratório (preferencialmente gerbos)^[1].

As provas sorológicas mais utilizadas são imunofluorescência indireta (IFI) e reação imunoenzimática (ELISA). A imunofluorescência com título superior ou igual a 50 indica exposição do cão ao agente. Um título superior ou igual a 800, em cão com sinais clínicos, é forte indício de neosporose.

No diagnóstico pós-morte é necessário o uso de imuno-histoquímica para detectar taquizoítos e cistos nos tecidos fixados. No teste de aglutinação direta, geralmente são usados isolados cultivados *in vitro* para a preparação dos抗ígenos^[7]. Nas fezes, somente em quadros iniciais podem ser encontrados oocistos que precisam ser diferenciados de outros gêneros após sua esporulação, principalmente da *Hammondia* sp., cujo oocisto é muito semelhante. Assim como nos bovinos, também são utilizados métodos como IFI, ELISA, histopatologia, PCR e imuno-histoquímica^[6].

Na necropsia podem ser constatadas lesões inespecíficas, como áreas de necrose do SNC, granulomas em vísceras, estrias esbranquiçadas nos músculos e no megaesôfago^[1]. Pode haver hepatomegalia e lesões musculares (atrofia e fibrose). No exame microscópico, são identificados taquizoítos ou cistos em biópsias de tecidos (músculo) ou em aspirados citológicos (pulmonar, liquor, exsudato de pústula dérmica)^[5]. No SNC são detectados cistos, meningoencefalomielite multifocal não supurativa, infiltrado perivascular mononuclear ou polimorfonuclear, neovascularização, gliose e meningite. Pode ocorrer necrose multifocal do miocárdio, com grupos de taquizoítos nos miócitos cardíacos. O fígado apresenta áreas multifocais de necrose e lipideose dos hepatócitos, e nos pulmões se verifica pneumonia intersticial difusa com necrose total de células epiteliais alveolares, hemorragia, edema, macrófagos no espaço alveolar, podendo ainda aparecer taquizoítos^[4].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Devem ser colhidas amostras de sangue venoso sem anticoagulante (no mínimo 7ml) para obtenção de soro sanguíneo, mantido a -20°C até o momento do exame para a detecção de anticorpos^[1]. Para exame histopatológico devem-se colher amostras de uma ampla variedade de tecidos, como: cérebro, medula espinhal, coração, pulmão, fígado, rins, membranas fetais, placenta, músculo esquelético, pele e fluidos corporais^[3,8]. Os tecidos devem ser enviados em formalina a 10%, já os fluidos devem ser enviados em frascos estéreis com heparina e conservados à temperatura de -4°C. Também é possível enviar fezes para análise laboratorial, mas somente em quadros iniciais podem ser encontrados oocistos, que precisam ser diferenciados de oocistos de outras espécies de protozoários. As fezes devem ser colhidas e conservadas à temperatura de -4°C^[8].

Referências bibliográficas

1. ÁLVAREZ-GARCIA G. et al. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 15-27, 2002.
2. BOAVENTURA, M.C. Prevalência de *Neospora caninum* em cães de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 15-22, 2008.
3. DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 765-771, 1989.
4. CALIL, R.S. **Epidemiologia da neosporose canina e suas implicações na clínica médica de pequenos animais**. 2006. p. 57. Monografia (Pós-graduação *Lato Sensu*) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Castelo Branco, São Paulo.
5. FERNANDES, B.C.T.M., et al.. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1-2, p. 33-40, 2004.
6. GIRALDI, J.H. et al.. Neosporose canina – revisão. **Clínica Veterinária**, n. 34, p. 50-56, 2001.

7. HEMPHILL, A. The host – Parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**, v. 43, p. 49-104, 1999.
8. PETERS, M.; WAGNER, F.; SCHARES, G. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. **Parasitology Research**. v. 86, p. 1-7, 2000.
9. SOUZA, S.L.P. **Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães de propriedades rurais produtoras de leite B da Região Norte do Estado do Paraná**. 2001. 115f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

4.7 Rangeliose

Conceito

A doença, também denominada peste de sangue, nambiuvu e febre amarela dos cães^[3,5], é uma enfermidade que tem sido descrita no Brasil^[5], e ainda há poucos estudos acerca de seu agente etiológico.

Etiologia e epidemiologia

Rangelia vitalli é um protozoário do filo Apicomplexa, ordem *Piroplasmorida*, transmitido aos cães por carrapatos infectados. Controvérsias a respeito do ciclo evolutivo e sobre a real identidade de *R. vitalli* povoaram o meio científico brasileiro durante muitos anos^[3].

A rangeliose afeta cães jovens das zonas rurais e periurbanas nas épocas mais quentes do ano, época em que a população de carrapatos é maior, mas também pode ser observada ao longo do ano até mesmo em cães adultos^[4].

Sugere-se que os carrapatos ixodídeos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* sejam os vetores de *R. vitalli* e que reservatórios silvestres (carnívoros selvagens e passeriformes) mantenham esse protozoário no meio rural sem adoecer^[1,4]. Na maioria dos casos o diagnóstico de rangeliose só é conseguido por sinais clínicos, achados hematológicos e uso de drogas antiprotozoários, sendo descrito na literatura que somente em 4% dos casos se encontra o parasita na circulação^[1].

Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por *R. vitalli* é feito com base no histórico, no quadro clínico e na resposta favorável à terapia. O diagnóstico definitivo é problemático, uma vez que esse protozoário não tem sido observado nos esfregaços sanguíneos de casos espontâneos e experimentais dessa enfermidade. O diagnóstico definitivo da protozoose tem sido feito apenas por meio do exame microscópico de esfregaços de tecidos confeccionados durante a necropsia ou em cortes histológicos^[5].

a) Características clínico-patológicas

Clinicamente, a infecção por *R. vitalli* tem sido confundida com outras doenças infecciosas de cães que causam anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia e hemorragias persistentes pelas bordas (face externa) das orelhas, pelas narinas e pela cavidade oral. *R. vitalli* também tem sido confundido na histopatologia por pesquisadores brasileiros e estrangeiros com outros protozoários e riquetsias que causam enfermidade em cães e que ocorrem no sangue e em diversos órgãos e tecidos dos animais afetados. O hemograma dos animais afetados é consistente com o de

uma anemia hemolítica extravascular mediada pelo sistema imune^[3]. Histologicamente, *R. vitalli* tem sido observado no interior de vacúolos parasitóforos no citoplasma de células endoteliais dos capilares sanguíneos. Estudos em microscopia eletrônica revelam que esse parasito também pode ser encontrado livre no sangue circulante. O diagnóstico presuntivo dessa enfermidade é feito com base no histórico, no quadro clínico, no hemograma e na resposta favorável à terapia^[1].

A rangeliose deve ser diferenciada da erliquiose canina, da babesiose canina, de infecções por outros protozoários, como Hepatozoon, Trypanossoma Cruzi e Trypanossoma evansi, que cursam com anemia.

b) Diagnóstico laboratorial

Esse parasito intracelular tem sido encontrado na citologia e histologia em células endoteliais de capilares sanguíneos a partir de amostras colhidas na necropsia^[2]. O diagnóstico definitivo de uma anemia mediada pelo sistema imune consiste na realização do teste de Coombs (direto ou indireto) ou do teste de antiglobulina (direto), sabendo-se que este último revela a presença de fatores do complemento ou imunoglobulinas ligados à membrana dos eritrócitos^[3]. Recentemente (2000-2001), um teste de citometria de fluxo por imunofluorescência direta foi elaborado para confirmar o diagnóstico de anemias hemolíticas mediadas pelo sistema imunes em cães^[4]. Alterações hematológicas consistem de uma anemia regenerativa hemolítica extravascular mediada pelo sistema imune (esferocitose, eritrofagocitose, policromasia, metarrubricitose e a presença de corpúsculos de Howell-Jolly).

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para exames laboratoriais deve-se remeter sangue para análise de hemograma armazenando à temperatura de 4°C. O sangue colhido dos capilares marginais das orelhas para a realização de esfregaços sanguíneos deve ser encaminhado congelado a -4°C para longas distâncias. Para esfregaços as amostras de sangue devem ser colhidas a vácuo para os seguintes procedimentos: 4ml de sangue em EDTA a 10% para pesquisa de hematozoários, contagem de hemácias, reticulócitos e plaquetas; determinação da concentração de hemoglobina, fibrionogênio plasmático bem como da contagem total e diferencial de leucócitos. Se o profissional optar por fazer os esfregaços e enviar as lâminas para leitura, a inserção da agulha para obter o sangue deve ser com uma lâmina extensora e deverá ser corada com corante comum panótico rápido, sendo encaminhadas em temperatura ambiente.

A amostra de medula óssea deve ter no mínimo 1ml de sangue e ser remetida em temperatura ambiente a pequenas distâncias e a -4°C se longas distâncias. Para imunofluorescência e PCR enviam-se 5ml de sangue sem anticoagulante. Pode-se, ainda, encaminhar 1ml de sangue da medula óssea, com anticoagulante, colhida da crista ilíaca ou de ossos longos para avaliar a presença de anemia normocítica normocrômica arregenerativa e supressão medular^[1,2,3].

Referências bibliográficas

1. FIGHERA R.A. Rangeliose. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, p. 261-263, 2007.
2. KRAUSPENHAR, C. et al. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, n. 4, p. 273-281. 2003.
3. LORETTI, A.P. Casos de intoxicação por aceturato de diminazeno em caninos diagnosticados no Estado do Rio Grande do Sul durante 2002-2003 [online]. Seção Alerta Tóxico. Disponível em: <<http://www.cit.rs.gov.br>>. Acesso em: 25 abr. 2009.

4. LORETTI, A.P.; BARROS, S.S. Parasitismo por *rangelia vitalli* em cães (“nambiuuvú”, “peste de sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 71, n. 1, p. 101-131, 2004.
5. SPAGNOL, C. et al. Parasitismo de cães por *Rangelia vitalli* no Estado do Rio Grande do Sul. In: **SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12.**, 2003, Porto Alegre. *Anais*. Porto Alegre: 2003. p. 232-233. Resumo 211.

4.7 Hepatozoonose

Conceito

A hepatozoonose é uma doença causada por um hematozoário do gênero *Hepatozoon* e transmitida por invertebrados hematófagos aos cães, principalmente pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma maculatum*^[6].

Etiologia e epidemiologia

Mesmo existindo várias espécies de *Hepatozoon* que infectam os animais, somente duas espécies infectam os canídeos domésticos, o *H. canis* e o *H. americanum*. Essas espécies diferem geneticamente e levam a síndromes diferentes^[2].

No Brasil, a hepatozoonose canina foi descrita pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro. Essa doença vem sendo descrita em outros Estados, como Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul^[4], e em Brasília^[9]. Alguns casos apresentam baixa parasitemia(1%), que varia entre 0,5% e 3% no Brasil^[8]. A transmissão ocorre pela ingestão de ectoparasitas hematófagos infectados pelo protozoário^[11], durante seus hábitos de cuidado e coçar com a boca áreas de prurido, e também pela predação de animais infestados pelos vetores infectados. Outras possíveis formas de transmissão foram descritas no Japão, como a transmissão congênita^[11].

Existem muitas espécies de vetores da hepatozoonose canina, e no Brasil o principal vetor dessa doença é o carrapato do cão, *Rhipicephalus sanguineus*^[2], pois essa espécie de carrapato é frequentemente encontrada em cães^[9]. A alta prevalência das espécies de *Amblyomma* é observada em cães de áreas rurais. Ainda no Brasil, outros gêneros de ectoparasitos, como *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma cajennense* demonstraram ser vetores do *Hepatozoon* spp.

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

A hepatozoonose é uma doença altamente debilitante para alguns animais^[3], caracterizada por sinais clínicos de doença crônica, como febre, anorexia, letargia, perda de peso, anemia, des-carga ocular mucopurulenta, além de mialgia, leucocitose neutrofílica matura, dores ósseas, proliferação óssea periosteal, dificuldades de locomoção e manutenção da postura, atrofia muscular generalizada e fraqueza dos membros pélvicos^[2,10]. A hepatozoonose canina causada pelo *H. canis* pode apresentar-se assintomática ou causar uma doença severa e potencialmente fatal pela anemia, letargia e caquexia^[2].

Os sinais mais severos apresentados pelos animais infectados com o *H. canis* geralmente são observados em animais com outras infecções ou doenças concomitantes. Essas geralmente são observadas em animais de zonas rurais, onde a hepatozoonose canina é crônica e debilitante, mas raramente fatal^[8]. Geralmente os sinais mais acentuados ocorrem em animais com elevada

parasitemia^[9,10]. A parasitemia pode aumentar com o decorrer do tempo, e casos de infecção leve ou moderada podem evoluir para infecção severa^[1,2].

b) Diagnóstico laboratorial

O encontro de gametócitos nos esfregaços sanguíneos é um importante achado hematológico para o diagnóstico da doença, porém em cães com *H. americanum* os gametócitos dificilmente são encontrados. Nos cães com *H. canis* apresentando baixa ou alta parasitemia os gametócitos podem ser visualizados nos esfregaços. No exame de animais que apresentam baixa parasitemia, podem ser observados gametócitos no interior de 1% a 5% dos neutrófilos, enquanto nos com elevada parasitemia podem ser observados até 100% dos neutrófilos periféricos infectados^[7,9].

O diagnóstico clínico não é preciso, pois os sintomas apresentados pela maioria dos cães são inespecíficos, podendo ser encontrados em outras doenças. Para a confirmação dos sinais clínicos apresentados, podem-se realizar análises de esfregaços sanguíneos de sangue periférico, corados pelo Giemsa^[8], onde serão encontrados os gametócitos no interior de neutrófilos e monócitos. Esse exame pode ser realizado a partir de material de biópsia e de exame pós-morte, podendo ser encontradas as formas teciduais (pequenos cistos) de *H. canis*^[5] e merontes nas biópsias musculares^[10].

Existem ainda testes sorológicos específicos para o *H. americanum*^[6] e para o *H. canis*^[9]. Ambos são ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA). A imunofluorescência indireta (IFI), que detecta anticorpos de *H. canis* com sensibilidade superior a 85%, possui maior sensibilidade do que o esfregaço sanguíneo de sangue periférico^[2], porém como ainda não foi determinado por quanto tempo o animal permanece sorologicamente positivo^[11], pode causar confusão no diagnóstico definitivo. Os merontes de *H. canis* são encontrados principalmente em amostras de fígado, medula e linfonodos, e em impressões e histopatologia dos tecidos, corados por hematoxilina e eosina^[4].

Devido à pouca frequência com que os gametócitos de *H. americanum* são evidenciados, a biópsia muscular é atualmente o único método confiável para a obtenção de diagnóstico definitivo^[4]. Contudo, é um procedimento invasivo que envolve risco cirúrgico^[9]. Por outro lado, a elevada parasitemia (9% a 100% dos neutrófilos circulantes) produzida pelo *H. canis* facilita o diagnóstico com esfregaços sanguíneos^[1,2]. Porém, nas infecções intermitentes, os gametócitos nem sempre são encontrados ou ocorrem em número baixo. É importante enfatizar que o gametócito deixa rapidamente o leucócito após a colheita do sangue, podendo dificultar o achado de gametócitos nos esfregaços sanguíneos e fazendo com que a parasitemia seja subestimada^[4]. Os estágios teciduais do *H. canis* são vistos no baço, nos linfonodos e em outros órgãos, mas não na musculatura esquelética como ocorre com o *H. americanum*^[11]. Essas evidências ainda não estão totalmente elucidadas devido à pequena rotina de diagnóstico baseado em biópsia muscular^[3,9]. Acredita-se que isso se deva à baixa parasitemia encontrada nos animais infectados^[8].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O diagnóstico específico é baseado na identificação dos microrganismos em esfregaço sanguíneo (nos leucócitos) ou em biópsia de tecidos musculares, cerebrais e viscerais. Os fragmentos de tecidos devem ser colhidos e armazenados em formalina a 10% e encaminhados ao laboratório para análise histopatológica em temperatura ambiente^[3,4].

Referências bibliográficas

1. BANETH, G. et al. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *Journal Clinical Microbiology*. v. 38, n. 3, p. 1298-1301, 2000a.

2. BANETH, G. et al. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends Parasitology**. v. 19, n. 1, p. 27-31, 2003a.
3. EWING, S.A.; PANCIERA, R.J. American canine hepatozoonosis. **Clinical Microbiology Review**. v. 16, n. 4, p. 688-97, 2003a.
4. GONDIM, L.F. et al. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**. v. 74, n. 2-4, p. 319-323, 1998.
5. HARMELIN, A. Concurrent Hepatozoon canis and Toxoplasma gondii infections in a dog. **Veterinary Parasitology**. v. 43, n. 1-2, p. 131-136, 1992.
6. MATHEW, J.S.; SALIKI, J.T. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of American canine hepatozoonosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 13, n. 1, p. 17-21, 2001.
7. MURATA, T. et al. Investigation of nitroblue tetrazolium reduction of neutrophils in the dog infected with *Hepatozoon canis*. **Jikken Dobutsu**. v. 43, n. 1, p. 101-3, 1994.
8. O'DWYER, L. H. et al. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 94, n. 3, p. 143-50, 2001.
9. PALUDO, G.R. et al. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**. v. 97, n. 2, p. 167-70, 2005.
10. PANCIERA, R.J. et al. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with *Hepatozoon americanum*. **Veterinary Parasitology**. v. 82, n. 4, p. 261-272, 1999.
11. SMITH, T.G. The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). **Journal Parasitology**. v. 82, n. 4, p. 565-585, 1996.

4.8 Ancilostomíase e toxocaríase

Conceito

As doenças parasitárias mantêm lugar de destaque na sanidade animal e humana, sendo responsáveis por baixo rendimento, deficiência no desempenho, condenação de vísceras e carcaças, descarte de couro e o estabelecimento de diversas zoonoses. A prevenção dessas doenças é vital para a produção econômica e a manutenção da saúde animal e humana. Para tanto, é necessária a identificação do agente etiológico, em caráter individual e populacional dentro de sua epidemiologia, permitindo, assim, o estabelecimento local de medidas preventivas das enfermidades parasitárias. A intervenção terapêutica deve ser feita de maneira consciente e responsável, considerando o comprometimento do animal, do homem, do ambiente e também o custo^[5,8].

Etiologia e epidemiologia

As praças e parques públicos contaminados por fezes de cães constituem uma importante via de transmissão de zoonoses parasitárias^[1]. O crescente número de cães domiciliados, peridomiciliados e errantes e o aumento do acesso deles a locais públicos têm aumentado o risco de contaminação ambiental e infecção por zoonoses, como a larva migrans cutânea (LMC) e a larva migrans visceral (LMV)^[3]. A LMC é causada pelo *Ancylostoma* sp., helminto que parasita cães e gatos e, ocasionalmente, os seres humanos, pela penetração da larva infectante (3º estádio larval) pela pele.

Essa dermatose tem sido observada em pessoas com histórico de contato com areia de praias, depósitos peridomiciliares ou áreas de recreação^[4]. A ancilostomíase e a toxocaríase de animais de estimação (helmintoses intestinais de cães e gatos) vêm sendo reconhecidas como im-

portante problema para a saúde pública^[2]. Devido ao reconhecimento da importância em saúde pública das larvas migrans, vem-se alertando, principalmente nos países desenvolvidos, sobre a necessidade de controle da presença de dejetos de animais domésticos, principalmente de cães, em lugares públicos (praias, campings, tanques de areia em praças).

As enfermidades ocasionadas por helmintos gastrointestinais em cães têm grande importância na clínica veterinária, principalmente por esses dois parasitos, *Toxocara canis* e *Ancylostoma caninum*^[9]. A infecção por um desses nematoides, ou por ambos, é considerada causa primária de doença ou morte em cães filhotes. O aumento do número de cães criados em residências nas grandes cidades, para guarda e companhia, aliado ao estreito contato físico com o homem, possibilitam uma maior exposição aos parasitos e às doenças que eles albergam^[11]. A infecção por *T. canis* também pode ocorrer por ingestão de ovos que ficam aderidos aos pêlos do cão. A infecção por contato direto não é considerada de grande risco, pois os ovos de *Toxocara* sp. necessitam de aproximadamente duas semanas para desenvolver a L3 (larva estágio 3) infectante.

A LMC determina lesões lineares progressivas e prurido intenso na pele de crianças e de trabalhadores que apresentam contato com areia e solo, como pedreiros, bombeiros hidráulicos e jardineiros^[10]. A LMV também ocorre com frequência em crianças e é responsável por distúrbios neurológicos. A forma ocular dessa doença produz danos ou mesmo a perda da visão^[11]. Entre os proprietários de animais de companhia há um desconhecimento sobre essas doenças, principalmente entre a população carente, cujos animais dificilmente recebem alguma assistência no que diz respeito a tratamento com anti-helmínticos^[2]. Esses aspectos tornam importante o diagnóstico laboratorial precoce para determinar-se um controle eficaz^[9].

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

Os sinais clínicos mais frequentes em cães filhotes acometidos por *T. canis* são desconforto abdominal, gemidos, barriga inchada, pelos opacos, vômito melena ou diarreia sanguinolenta acompanhada por palidez, fraqueza, emaciação e desidratação, relacionando-se diretamente à atividade sugadora de sangue e capacidade de causar perda sanguínea intestinal. Raramente grande quantidade de vermes adultos fecha o lúmen intestinal provocando obstrução, intussuscepção ou perfuração intestinal^[5,8]. No cão neonato, a migração de larvas de *T. canis* através dos pulmões pode causar danos severos e pneumonia fatal^[13]. Nos animais jovens com infecções leves e nos adultos a doença é comumente assintomática ou é evidenciada meramente por perda da condição corporal^[5]. Observa-se anemia por perda sanguínea rapidamente progressiva que pode resultar em morte aguda nos neonatos^[8]. Em animais adultos, a perda crônica de sangue pode produzir anemia por deficiência de ferro, caracterizada por hemácias que mostram hipocromasia e macrocitose. Devido à penetração ativa das larvas na derme e na epiderme, observa-se prurido agudo^[7]. Nos animais adultos as ancilostomíases são frequentemente assintomáticas^[6]. Em alguns animais pode-se observar dermatite pruriginosa aguda^[5,8].

b) Diagnóstico laboratorial

O processamento pode ser realizado por técnica qualitativa de flutuação simples (Willis Mollay) e sedimentação espontânea (Hoffmann)^[2]. O diagnóstico é facilmente estabelecido pela identificação dos ovos na flutuação fecal de rotina. Na necropsia, os helmintos adultos podem ser encontrados no intestino delgado, estômago e esôfago. Os helmintos colhidos de acordo com sua localização anatômica podem ser quantificados, identificados e conservados em etanol a 70° GL 5% glicerinado para posteriores pequisas^[8].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico de *Toxocara canis* e *Ancylostoma* spp. colhem-se amostras fecais diretamente da ampola retal ou do bolo fecal sem entrar em contato com o solo. Essas amostras devem ser transportadas ao laboratório acondicionadas e refrigeradas (4°C) até o processamento e a identificação.

Referências bibliográficas

1. ARAÚJO, F.R. et al. Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de Toxocara e Ancylostoma em fezes de cães. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 32, p. 581-583, 1999.
2. BLAZIUS, R.D. et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães errantes da Cidade de Itapema, Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 73-74, 2005.
3. CASTRO, J. M. et al. Contaminação de canteiros da orla marítima do Município de Praia Grande, São Paulo, por ovos de Ancylostoma e Toxocara em fezes de cães. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 199-201, 2005.
4. GENNARI, S.M. et al. Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Vetnews**. n. 52, p. 11-12, 2001.
5. GUIMARÃES, A.M. et al. Ovos de Toxocara sp e Larvas de Ancylostoma sp em praça pública de Lavras, MG. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 293-5, 2005.
6. NUNES, C.M. et al. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, 2000.
7. OVERGAAUW, P.A.M. Aspects of Toxocara epidemiology: human toxocariasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 215-231, 1997.
8. SANTARÉM, V.A. et al. Larva *migrans* cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 179-181, 2004.
9. SCAINI, C.J. et al. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 617-619, 2003.
10. TAYLOR, M.R.H. The epidemiology of ocular toxocariasis. **Journal of Helminthology**, n. 75, p. 109-118, 2001.
11. WOLFE, A.; WRIGHT, I.P. Human toxocariasis and direct contact with dogs. **The Veterinary Record**, n. 152, p. 419-422, 2003.

4.9 Escabiose

Conceito

A escabiose é uma parasitose altamente contagiosa entre animais e pode contaminar o homem. A sarna sarcóptica é uma dermatose parasitária causada por um ácaro designado *Sarcoptes scabiei*. Esse parasita externo tem expressão clínica em diversos animais domésticos: cão, gato, roedores, coelhos, equinos, ovinos (no qual é apelidada de “ronha”), caprinos e bovinos, sendo transmitida aos humanos pelo contato direto^[1].

Etiologia e epidemiologia

O *Sarcoptes scabiei* é um ácaro parasitário. A fêmea desse ácaro enterra-se na epiderme de seus hospedeiros formando túneis nos quais ocorre a oviposição. A presença do ácaro e a reação de hipersensibilidade decorrente provocam uma dermatite pruriginosa. A variabilidade das manifestações clínicas dessas dermatoses parasitárias reflete provavelmente as variações na duração e intensidade da reação pruriginosa e na capacidade do hospedeiro em limitar a multiplicação do parasita. Frequentemente os seres humanos são infectados por contato direto com seus animais infectados^[4].

A sarna sarcóptica afeta cães independentemente da idade, sexo ou raça. Essa doença é altamente contagiosa e a exposição a esses ácaros relaciona-se intimamente aos fatores ambientais. O contágio ocorre por exposição ao ácaro, pelo contato direto com animais infectados, instrumentos de higiene ou mesmo utensílios e locais onde existem animais infectados. O ácaro pode resistir alguns dias fora do hospedeiro, no meio ambiente, favorecendo sua transmissão^[3].

O cão é sem dúvida o animal de companhia mais atingido, especialmente os cães errantes. Também são bastante atingidos os animais que vivem em canis que recolhem cães abandonados^[4].

Diagnóstico

Muitas vezes, mesmo em animais portadores, o ácaro não é encontrado em exame de microscopia. Portanto, um resultado negativo nesse exame, aliado à presença de sinais compatíveis com a sarna, não deve ser suficiente para excluir esta doença dos diagnósticos possíveis. O aparecimento simultâneo de vários animais com o mesmo problema ajuda a limitar as possibilidades de diagnóstico.

a) Características clínico-patológicas

A escabiose canina consiste em dermatopatia não sazonal, extremamente pruriginosa e contagiosa, causada pela infestação do ácaro *Sarcoptes scabiei*. O animal apresenta-se, na maioria dos casos, com pequenas crostas hemorrágicas e perda da pelagem nas regiões ventral e axilar e no focinho, mas o quadro clínico pode ser mais abrangente^[2]. A dermatite é acompanhada invariavelmente por produção exacerbada de gordura, dando aspecto e odor “rançoso” ao animal. O prurido intenso pode mascarar as lesões primárias com o aparecimento de feridas provocadas pelo coçar ou mordiscar^[4].

As reações em humanos ocorrem dentro de 24 horas após breve exposição direta e caracterizam-se por pápulas pruriginosas no tronco e nos braços^[7]. Os animais atingidos geralmente apresentam histórico de permanência em abrigos, contato com cães de rua ou visitas a exposições^[7].

As lesões incluem pápulas, alopecia, eritema, crostas e escoriações. Inicialmente a pele com menos pelos é acometida: extremidades dos membros pélvicos e torácicos, cotovelo, extremitade do pavilhão auricular e região ventral do abdome e tórax^[9]. Nos casos crônicos, as lesões podem espalhar-se pelo corpo, apresentando intensa descamação e crostas, além de linfadenomegalia periférica^[1].

O isolamento dos animais infectados deve ser escrupulosamente seguido, bem como os cuidados e o uso de equipamentos de proteção individual (luvas, roupas descartáveis) ao realizar o tratamento, pelo risco de contágio fácil desta doença de pele. O ambiente contaminado por ácaros deve ser higienizado e tratado com um produto acaricida. Todos os animais co-habitantes devem ser tratados simultaneamente^[5]. Outras dermatoses parasitárias, como a sarna demodélica, ou ainda alérgicas, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial^[8].

a) Diagnóstico laboratorial

Exames laboratoriais para a comprovação do diagnóstico clínico e para a identificação do parasita se resumem a exames dermatológicos, sanguíneos e coproparasitológicos. Mesmo em cães normais, podem ser encontrados alguns ácaros comensais no material, mas a presença de uma alta proporção de larvas e ninfas indicará uma população rapidamente crescente e, portanto, infecção ativa. O exame frequentemente utilizado para diagnóstico da sarna é o raspado profundo de pele, acompanhado de observação e identificação do parasita nas amostras ao microscópio óptico. Amostras de pele colhidas por biópsia podem ser utilizadas para detectar ácaros nos folículos, sendo usadas nos cães gravemente afetados, porém essa técnica raramente é necessária^[4,8].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para confirmar o diagnóstico são necessários raspados profundos de pele, para atingir os ácaros no fundo dos folículos e das glândulas. A melhor forma de conseguir um raspado profundo e representativo é realizá-lo em uma prega cutânea aplicando uma gota de parafina líquida e restando o raspado até que apareça sangue capilar^[6].

Referências bibliográficas

1. BICUDO, P.I.M.T. Percepções do médico chefe a respeito de atividades educativas em postos de assistência médica. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 306-314, 1991.
2. CHRISTIAN, F.S.; EBERHARD, T. Dirofilariosis canina y felina: diagnóstico y tratamiento. **Whaltam Focus**, Pennsylvania, v. 8, p. 28, 1998.
3. FOK, E. et al. Prevalence of intestinal parasites in dogs in some urban and rural areas of Hungary. **The Veterinary Quarterly**, v. 23 n. 2, p. 96-98, Apr. 2001.
4. IRWING, P.J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 581-593, May 2002.
5. MCGLADE, T.R. et al. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western, Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 251-262, Nov. 2003.
6. MEYER, D.J. Obtenção e manuseio das amostras para exame citológico. In: RASKIN, R.E. MEYER, D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca. 2003.
7. MUELLER, R. S. Treatment protocols of demodicosis: an evidence – based review. **Veterinary Dermatology**. v. 15, 2004. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1365-3164.2004.00344.x/full/>. Acesso em: 27 de abril de 2009.
8. SANCHEZ, T.P. et al. Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the Province of Chubut, Argentina, Patagonia. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 263-268, Nov. 2003.
9. SOUSA, M. G. et al Use of moxidectin as a single therapy in canine demodicosis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 17-20, 2004.

CAPÍTULO 11

DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DOS GATOS

Josaine Cristina da Silva Rappeti

Renata Dezengrini Slhessarenko

Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

INTRODUÇÃO

Mundialmente, existe uma tendência de aumento da população de gatos como animal de companhia, tendo em alguns países superado a população de cães. Esse aumento tem ocorrido principalmente devido à sua capacidade de viver em pequenos espaços, adaptando-se facilmente à vida em apartamentos, e pelo fato de as pessoas apresentarem um ritmo de vida cada vez mais acelerado nas grandes cidades, tendo pouco tempo para dispor de cuidados com o seu *pet*. Os felinos são, portanto, mais independentes do que os caninos da presença diária do proprietário, de sua atenção e de cuidados constantes. Eles diferem dos cães tanto para o manejo quanto para o diagnóstico de doenças. Apesar de ser uma espécie animal próxima do homem, os felinos domésticos não fogem de seus instintos. Embora tenham alimento disponível em casa, sempre caçarão e apresentarão hábito noturno, podendo muitas vezes se infectar e se tornar um possível transmissor de zoonoses.

Os gatos são sensíveis a muitos agentes tóxicos, e a toxicidade de algumas substâncias é seletiva para a espécie. Apesar disso, a probabilidade de um felino se intoxicar é menor se comparada aos cães, devido ao seu olfato aguçado e ao seu paladar seletivo. A principal forma de intoxicação em felinos é a iatrogênica, quando os proprietários utilizam medicamentos sem orientação do médico-veterinário. Gatos têm acesso a locais altos e, por isso, podem ingerir várias substâncias tóxicas que os proprietários acreditam estar fora do alcance. Gatos frequentemente realizam a autolimpeza, por meio de lambedura, e quando ocorre a exposição a uma toxina em sua derme, concomitantemente ocorre ingestão e absorção.

Para traçar um diagnóstico diferencial é importante realizar uma cuidadosa anamnese a fim de investigar o ambiente em que o animal estava antes do surgimento dos sinais clínicos, indagando sobre a fonte de água e comida, contato com outros animais, se existe acesso à rua, bem como a medicamentos e outros produtos tóxicos. Deve-se questionar se existe a possibilidade de ocorrência de uma intoxicação intencional, fato comumente observado, ou de uma criança ter dado alimentos ou medicação ao animal. É necessário lembrar-se de averiguar se o animal é vacinado anualmente, pois alguns sinais de doenças infecciosas podem ser confundidos com os de intoxicação.

A obtenção de um resultado laboratorial confiável está vinculada a fatores como: preparo do animal, colheita do material, e manuseio e armazenamento da amostra. O medo ou a agitação do animal durante a coleta, a hemólise e lipemia da amostra devem ser evitados, assim como o armazenamento inadequado e a demora no processamento do material. Falta de informações sobre os sinais clínicos, medicamentos e anestésicos utilizados no paciente também podem interferir no resultado laboratorial. Os testes laboratoriais e a interpretação dos resultados dependem da qualidade da amostra recebida, respeitando as técnicas de colheita, buscando que ocorra o mínimo de alterações antes da colheita, como o estresse; durante a colheita, com o garroteamento prolongado e antisepsia inadequada; e após a colheita, como identificação da amostra, meio de transporte, contaminação com microrganismos e a temperatura adequada de transporte e armazenamento, fatores esses que poderão interferir na correta análise e interpretação dos resultados obtidos com o exame. As amostras enviadas ao laboratório de diagnóstico devem ser devidamente identificadas, utilizando canetas resistentes à água, fitas com cola ou etiquetas com adesivos apropriados. Na maioria das vezes, devem ser refrigeradas e sempre ser enviadas o mais rápido possível após a colheita do material.

As informações nas amostras a serem enviadas ao laboratório devem conter: identificação do proprietário e do médico-veterinário ou da pessoa responsável com telefone e endereço, dados de identificação do animal e anamnese completa do paciente. Nunca omitir dados relevantes da história clínica, como a suspeita de doenças infecciosas ou o uso de quaisquer tratamentos medicamentosos. Ainda é importante salientar que a embalagem utilizada para a amostra deve ser segura, principalmente para os que vão manuseá-la.

Neste capítulo são descritas algumas enfermidades que acometem os gatos, abrangendo as doenças víricas, bacterianas, fúngicas, parasitárias, intoxicações, além de técnicas como a realização da eutanásia, necropsia e como colher – e quais – materiais para análise laboratorial das respectivas doenças.

1. PRINCIPAIS DOENÇAS BACTERIANAS DOS GATOS

1.1 Piotórax

Conceito

Piotórax (empíema torácico) é uma infecção secundária que ocorre devido a contaminações decorrente de trauma ou de outras enfermidades. É uma inflamação supurativa da cavidade torácica com acúmulo de exsudato inflamatório no interior do espaço pleural^[3,8].

Etiologia e Patogênese

A pleura é uma membrana de origem mesotelial dividida em parietal e visceral. A pleura parietal reveste a parede torácica, o diafragma, e o mediastino. A pleura visceral reveste os pul-

mões e o coração. Existe um espaço entre a pleura parietal e a visceral denominado cavidade ou espaço pleural. Durante o movimento respiratório, a pleura visceral desliza sobre a pleura parietal. Em gatos hígidos, o espaço pleural contém alguns mililitros de líquido seroso, que funciona como lubrificante entre as pleuras, facilitando esse movimento^[11]. Na presença de um desequilíbrio, ocorre acúmulo de líquido na cavidade entre as pleuras visceral e parietal. Esse desequilíbrio se refere à formação de líquido pleural, à absorção através dos vasos capilares pleurais e à circulação linfática^[13]. Conforme o tipo de exsudato da cavidade, ele pode ser classificado como fibrinoso, supurativo, piogranulomatoso, hemorrágico ou uma combinação de exsudatos. Quando o exsudato purulento está presente na cavidade torácica, a lesão denomina-se piotorax ou empieema torácico^[7].

Muitas espécies de bactérias podem estar presentes no piotorax, sozinhas ou como infecções mistas com a *Pasteurella multocida*, *Bactereoides* spp., *E. coli*, *A. pyogenes* e *F. necrophorum*^[7,10]. Foram isolados, também, porém com menor frequência, *Streptococos* spp., *Stafilococos* spp., *Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp., *Nocardia* spp., *Enterobacteriaceae*, *Mycoplasmas* spp., e alguns fungos^[8]. A infecção pode resultar de mordidas, corpos estranhos, feridas por punção, lesões no esôfago^[4], pneumonias, trauma pulmonar ou torácico, neoplasias^[3,9], e de doenças imunossupressivas como vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da imunodeficiência felina (FIV)^[6]. A infecção poderá também resultar da disseminação hematógena a partir de outros sítios de infecção, como abscessos e gengivites, e os gatos com comprometimento da imunidade apresentam um risco maior à infecção pleural^[3,7].

Diagnóstico

O clínico deverá suspeitar de piotorax quando o gato apresentar dificuldade respiratória, sem histórico de trauma, como atropelamento. Muitas vezes, o quadro clínico já está avançado, pois os sinais de angústia respiratória são aparentes dias ou até semanas após a instalação do quadro clínico.

a) Epidemiologia

Os gatos que têm acesso à rua são os que mais correm o risco de feridas por exposição a mordidas e corpos estranhos, apresentando maior probabilidade de ser acometidos por essa enfermidade. Já os mais idosos são mais predispostos a neoplasias e distúrbios imunossupressores^[3]. Em gatos, independentemente da causa que leva ao acúmulo de líquido pleural, ela requer uma investigação minuciosa, pois indica que o animal apresenta uma afecção grave que está colocando em risco a sua vida^[11].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos estão relacionados a alterações respiratórias. Quanto maior a quantidade de líquido e a velocidade de acúmulo na cavidade torácica, mais gravemente o animal será afetado^[2]. Os gatos podem apresentar poucos sinais clínicos antes do início aparente de angústia respiratória aguda^[14], embora, geralmente, o dono relate o surgimento agudo da dispneia. Nesses casos, muitas vezes, a doença já se instalou há dias ou mesmo semanas^[10]. O sinal clínico mais evidente em casos de piotorax é a dispneia inspiratória. Outros sinais como intolerância ao exercício, cianose, anorexia, depressão, perda de peso, desidratação, tosse, pirexia, sons cardíacos abafados, taquipneia, sons pulmonares diminuídos ventralmente e amplificados dorsalmente^[9,10,12,14] e hipotermia podem estar presentes^[1]. Em gatos com derrame torácico, a parede torácica pode parecer impossível de ser comprimida^[6].

c) Patologia

Nem sempre ficará evidente como ocorre o piotorax, se é através da disseminação hematogena ou por via linfática. Feridas penetrantes no tórax, lesões no esôfago torácico, corpos estranhos e até mesmo causas iatrogênicas podem levar a essa enfermidade^[8]. Algumas vezes, os microrganismos que causam piotorax chegam ao espaço pleural por meio de ferimentos como mordidas de outros gatos. Com a presença dos patógenos e de suas toxinas, os gatos apresentam febre e começam a desenvolver os sinais clínicos da doença^[10].

d) Diagnóstico laboratorial

Para chegar ao diagnóstico, é fundamental o exame físico (inspeção e palpação), e esse é confirmado por meio do exame radiográfico do tórax e da toracocentese. Exames radiográficos são importantes e os achados são típicos de derrame pleural com fissuras pleurais e bordas pulmonares denteadas^[3,10] com efusão pleural, podendo apresentar atelectasia^[1]. Para ser observada a efusão no exame radiográfico, são necessários pelo menos 50ml de líquido^[11]. Na toracocentese como diagnóstico e também como técnica terapêutica^[5] pode-se remover alguns mililitros de líquido com o objetivo de confirmar a presença de derrame pleural e realizar a análise^[10]. O líquido colhido deve ser enviado para análise citológica e cultura^[1], sendo recomendada também a realização da avaliação sanguínea para hemograma do paciente. A avaliação citológica é necessária para confirmação do diagnóstico^[14]. O líquido aspirado do tórax se caracteriza por um aspirado fluido viscoso, opaco e de cor creme^[8]. Após aspirar o líquido do tórax, deve-se lavar a cavidade abundantemente com solução fisiológica estéril^[1].

e) Diagnóstico diferencial

É importante fazer testes sorológicos de vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV)^[1]. Bioquímica sérica, função renal, hepática e urinanálise são exames auxiliares, indicados para avaliar o paciente com piotorax^[10].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se enviar líquido pleural aspirado para exame citológico, cultura e antibiograma; sangue para a realização de hemograma; soro sanguíneo para sorologia de FIV, FeLV, e bioquímica sérica.

A toracocentese deve ser realizada no 7º ou 8º espaço intercostal, na junção costocondral, e o gato deve estar em decúbito esternal^[5]. Para colheita do líquido pleural é necessário que seja acoplada a uma agulha hipodérmica uma seringa de 10ml. Na realização da toracocentese, o material colhido deve ser armazenado em tubos, para análise, como citado anteriormente. Colher de 5 a 10ml de líquido pleural, manter 3ml em uma seringa estéril, sem ar e com uma borracha na ponta da agulha, para cultura de bactérias anaeróbicas^[11]. Em outros dois tubos, coloca-se líquido pleural com anticoagulante, e EDTA, para realização de citologia; já o outro tubo estéril sem EDTA será encaminhado para análise bioquímica e realização da cultura microbiana^[11].

Referências bibliográficas

1. BARRS, V.R.; ALLAN, G.S., MARTIN, P. et al. Feline pyothorax: a retrospective study of 24 cases in Australia. *Journal of feline medicine and surgery*. v. 7, p. 211-222, 2004.
2. BICHARD, S.J. Derrame pleural não-cardiogênico. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999, cap. 69, 1446p.

3. COLERAN, E.J., Piotórax. In: LAPPIN, M.R., **Segredos em Medicina Interna de Felinos**. Porto Alegre: Artmed, 2004, cap. 13, 560p.
4. CUNHA, O.; PIPPI, N.L.; RAISER, A. G. et al. Esofagoplastia torácica com retalho de pericárdio em gatos. **Ciência Rural**. v. 33. n. 2, p. 325-330, 2003.
5. FOSSUM, T.W., Lactescent pleural fluids in cats: diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 1, n. 3, p. 191-196, 1999.
6. FOSSUM, T.W., Cirurgia do sistema respiratório inferior: cavidade pleural e diafragma. In: _____. **Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 22, 2005, 1.390p.
7. YAMASAKI, L.; FIORETTI, G. E.; TANIGUTI, M. H. et al., Piotórax em felino. XI Encontro Anual de Iniciação Científica. **Anais...** Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR. 2002.
8. KERINS, A.M.; BREATHNACH, R., Sistema Respiratório. In: CHANDLER, E.A., GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006, cap. 12, 590p.
9. NELSON, R.W.; COUTO, C.G., Distúrbios da cavidade pleural. In: _____. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 25, 2001, 1.084p.
10. NORWORTHY, G.D., Piotórax. In: NORWORTHY, G.D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S.F. et al., **O paciente felino**. 2. ed., São Paulo: Manole, cap. 117, 2004, 815p.
11. SOUZA, H.J.M. **Efusões pleurais em gatos**. Asociación argentina de medicina felina. Disponível em: <http://www.aamefe.org/efusoes_pleurais_justen.htm>. Acesso em: 10 jun. 2008.
12. SOUZA, H.J.M.; SOUZA, E.W. Piotórax felino. **Clínica Veterinária**. n. 11, p. 8-12., 1997.
13. RAMIREZ, E.Y. **Derrames pleurales en animales de compañía**. Aproximación al diagnóstico. Disponível em: <<http://www.cardiovet.es/html/Derr.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2008.
14. TILLEY, L.P.; SIMITH JR., F.W.K. **Consulta veterinária em 5 minutos. Espécies canina e felina**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003, 1.423p.

1.2 Tétano

Conceito

Tétano é uma doença infecciosa de ocorrência mundial que acomete os animais domésticos e o homem^[12]. É causada pela ação de uma potente neurotoxina tetânica produzida pela bactéria *Clostridium tetani*^[2]. Os gatos nascem com resistência ao tétano^[11], pois existe uma incapacidade da toxina de penetrar no sistema nervoso e se fixar aos locais de conjugação. Na maioria das vezes essa espécie apresenta a doença localizada^[9].

Etiologia e Patogênese

O *Clostridium tetani* é um bacilo Gram-negativo anaeróbico obrigatório, não capsulado, móvel e seus esporos são encontrados no solo e no interior do trato intestinal de animais^[6]. Procedimentos cirúrgicos, ferimentos profundos e extrações dentárias são alguns exemplos que podem gerar um meio anaeróbico que favorece a multiplicação do agente, levando ao tétano^[5]. Quando o microrganismo estiver presente em meio anaeróbico, ele produzirá três toxinas: a tetanolisina, que é responsável pela necrose tecidual; a tetanoplasmina, que produz hipertonia e espasmos musculares; e a toxina não espamogênica, que produz efeitos autonômicos, gerando hiperestimulação do sistema nervoso simpático^[10]. O período de incubação é de aproximadamente 8 dias após a lesão^[5,12]. Quando a doença se apresenta na forma localizada, as toxinas podem disseminar-se via

nervos motores periféricos até alcançar o SNC (medula e encéfalo). Os interneurônios inibitórios da substância cinzenta são inibidos e ocorre a espasticidade muscular, afetando inicialmente os músculos próximos à infecção e, em seguida, os demais músculos, caracterizando o tétano ascendente. Quando há um excesso de liberação de toxina, ultrapassando a capacidade de absorção dos nervos, ocorre uma remoção pela linfa à corrente sanguínea e dessa para o SNC, levando aos sinais neurológicos generalizados^[6]. Geralmente não se observa febre, pois o animal apresenta toxemia e não septicemia.

Diagnóstico

O tétano generalizado é fácil de diagnosticar, pois o animal apresenta rigidez muscular generalizada e as características clínicas da doença, como contrações tônicas dos músculos com histórico de lesão, feridas, andar rígido, membros hiperextendidos, opistotônico, entre outros. A forma localizada é frequentemente diagnosticada erroneamente, pois músculos isolados ou grupos de músculos exibem espasmos ou contraturas próximas ao local da lesão (ferida).

Geralmente, o gato que apresenta sinais de tétano possui histórico de lesão recente, ou de ter sofrido procedimento cirúrgico. Deve-se fazer um bom exame clínico associado à anamnese, bem como observar se existe rigidez em músculos próximos da lesão. Os critérios para se chegar ao diagnóstico de tétano localizado incluem, além dos sinais clínicos, a presença do microrganismo em esfregaços do ferimento contaminado corados por coloração Gram^[9].

a) Epidemiologia

O tétano é uma toxinfecção que acomete homens e animais. A ocorrência nos felinos é rara quando comparada a outras espécies, como a equina, pois os gatos apresentam uma suscetibilidade 7.200 vezes menor para desenvolver essa doença se comparados àquela espécie^[8].

b) Sinais clínicos

O gato com tétano localizado pode apresentar-se alerta, com espasticidade no membro ou em grupos musculares. Espasmos musculares ocorrem inicialmente próximos ou distais à ferida, evoluindo para rigidez muscular. A resolução poderá ocorrer em semanas ou até meses^[1]. A forma localizada pode evoluir para a forma generalizada, a qual apresentará paralisia espástica dos membros; coluna arqueada, com rigidez da musculatura lombar e abdominal; rigidez na base da cauda e complicações em órgãos abdominais, podendo ainda, esses sinais se tornar agudos, em 24 horas, apresentando também trismo, lábios repuxados (riso sardônico), opistotônico, protrusão da terceira pálpebra, dispneia e disfagia^[12]. O diagnóstico da forma generalizada é direto, pois os sinais clínicos são distintos, tais como rigidez extensora, hiperestesia por opistotônico e trismo. Na maioria das vezes existe o histórico de lesão há pelo menos três dias antes do desenvolvimento dos sinais^[9]. A contração tônica dos músculos impede a deambulação. Nos casos em que o animal conseguir deambular, a marcha será rígida^[4].

c) Patologia

Nas amostras de tecidos necróticos da região afetada pode ser evidenciada, por meio do exame citopatológico, a presença de bacilos Gram-positivos, ligeiramente curvos e com a presença de esporo terminal sugerindo ser *Clostridium tetani*^[5].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de tétano é clínico-epidemiológico e não depende da confirmação laboratorial, pois os sinais clínicos são característicos. O histórico de ferida recente ou procedimento ci-

rúrgico realizado de maneira imprópria, associados aos sinais clínicos, são muito importante para auxiliar no diagnóstico^[7]. O microrganismo é facilmente identificável por seu esporo. Para o diagnóstico, realiza-se a prova biológica por meio da inoculação de soro em camundongo, cultivo anaeróbico e citologia da ferida, com posterior coloração de Gram^[3].

e) Diagnóstico diferencial

Observar bem o histórico de cada paciente, pois os gatos apresentam, na maioria das vezes, a forma local de tétano, podendo ser facilmente confundida com lesão em nervos periféricos, traumas, raiva, fraturas e, principalmente, intoxicações.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Pode-se encaminhar ao laboratório sangue, soro ou fragmento da lesão^[3]. Como as bactérias são destruídas quando expostas ao ar, dificilmente serão detectadas por meio de citologia da ferida. Por esse motivo devem ser feitos cultivos anaeróbicos

Referências bibliográficas

1. BARAL, R.M., CATT, M.J., MALIK, M. What is your diagnosis? (localised tetanus in a cat). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n. 4, p. 222-224, 2002.
2. BARAL, R.; NORRIS, J.M.; MALIK, R. Localized and generalized tetanus. In: AUGUST, J.R. **Consultations in feline internal medicine**. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2006, v. 5, cap. 8, p. 57-64.
3. BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. Roca: São Paulo, 1999, p. 250-254.
4. BENNETT, D. Sistema musculoesquelético. In: CHANDLER, E.A.; GASKELL, C.J.; GASKELL, R. M., **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3ed., Roca: São Paulo, cap. 8, 2006, p. 103-142.
5. COSTA, F.S., AGUIAR, D.M., GIUFFRIDA, R. et al. Tetanus in a cat. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 39, n. 3, 2002.
6. ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C., **Tratado de Medicina Veterinária**. Manole: São Paulo, 1997. vol.1, p. 539-540.
7. COLEMAN, E.S. Clostridial neurotoxins: tetanus and botulism. **The compendium**. v. 20, n. 10, p. 1089-1094, 1998.
8. GREENE, C.E. Tetnus. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. W.B. Saunders, 1998, p. 267-273.
9. JONES, B.R. Sistema nervoso. In: CHANDLER, E.A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed., Roca: São Paulo, cap. 7, 2006, p. 103-142.
10. MARTINS, V.M.V., MEDEIROS, P.T.; COLODEL, M.M. **Tétano em caninos – relato de caso**. Disponível em: <www.cav.udesc.br/rca/arquivos/2002/n1/vera2002n1.pdf>. Acesso em: 04 maio. 2008.
11. RISIO, L. de; GELATI, A. Tetanus in the cat – an unusual presentation case report. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n. 5, p. 237-240, 2003.
12. TRINDADE, R.R.R.; TRINDADE, W.M Tétano felino (relato de caso). **Nosso Clínico – Medicina Veterinária para Animais de Companhia**. n. 50, p. 30-36, 2006.

1.3 Lepra felina

Conceito

A lepra felina é uma doença geralmente indolor, na qual os gatos desenvolvem granulomas na pele ou no tecido subcutâneo^[1,9].

Etiologia e Patogênese

A *Mycobacterium lepraeumurium*, uma microbactéria de crescimento lento, que possui a característica de ser muito difícil de cultivar^[2,10,12,18], tem sido tradicionalmente considerada o agente etiológico da lepra felina^[3,9,12].

Diagnóstico

Deve-se suspeitar dessa doença quando se observam nódulos indolores na pele de felinos, que frequentemente ulceram. Para se chegar ao diagnóstico, testes específicos devem ser realizados, pois muitas lesões semelhantes ocorrem em outras doenças.

a) Epidemiologia

A doença possui distribuição mundial^[15,17] e aparenta ser mais comum em climas temperados e em cidades portuárias^[17]. Existe a hipótese de que gatos se infectam depois de serem mordidos por ratos infectados^[11] e até mesmo por outros vetores, tais como pulgas, mosquitos e carrapatos, uma vez que a *M. leprae* (bacilo vivo da lepra humana) já foi encontrado nesses agentes. Entretanto, o modo natural de transmissão da doença ainda é desconhecido. Sugere-se que não seja naturalmente transmissível entre os gatos, pois não existe relato da transmissão da doença entre gatos que vivem no mesmo ambiente^[5]. Gatos que se recuperam da lesão natural tornam-se imunes à reinfecção experimental^[17,19]. O período de incubação é de 2 meses a 1 ano e não é necessária a supressão da imunidade do animal para a infecção ocorrer^[4]. Essa doença afeta gatos jovens, geralmente com idade inferior a cinco anos, sendo os machos mais predispostos. Possivelmente essa predisposição por idade e sexo reflete a necessidade da interação com ratos para o felino se tornar infectado.

b) Sinais clínicos

Em geral, o felino apresenta-se em um bom estado, no entanto, quando a doença se torna generalizada, com o desenvolvimento de numerosas lesões na pele em todo o corpo, pode-se tornar apático e inapetente^[17,21]. A ocorrência de linfadenopatia indolor é comum^[4].

c) Patologia

Os proprietários relatam que seus animais apresentam um aumento de volume indolor que varia de 4mm a 4cm de diâmetro^[1,17]. É caracterizado por formar um único (ou múltiplos) nódulo(s), firme e macio na pele ou no tecido subcutâneo, os quais frequentemente ulceram^[11,13,16,20]. Os nódulos podem ser encontrados em qualquer local do corpo, mas frequentemente estão localizados na cabeça, membros e tronco. É comum ocorrer linfadenopatia regional e raramente ocorre a sua forma sistêmica^[14,16,19]. Pequenas lesões também podem ser encontradas na língua, nos lábios e no plano nasal^[15]. Essas lesões não apresentam aderências nos tecidos adjacentes, mas apresentam crescimento rápido e, quando grandes, podem ulcerar^[17,21]. Os nódulos tendem a concentrar-se em apenas uma região e apresentam propensão a recorrer após a sua excisão cirúrgica^[15].

d) Diagnóstico laboratorial

Inicialmente, deve ser realizado esfregaço ou *imprint* da lesão. Caracteristicamente, *Mycobacterium* spp. não são visíveis em lâminas de tecidos corados com hematoxilina e eosina, por isso colorações resistentes a ácido e álcool (Ziehl Neelsen) são usadas para detectar a presença de numerosos bacilos^[5]. A presença desses bacilos em esfregaços e em exames histopatológicos e citológicos leva à suspeita da doença. Apesar de ser muito difícil e demorado se obter um cultivo de *M. lepraeumurium*, esse é um método de se conseguir o diagnóstico da doença. Outra forma, mais sensível, é o exame de PCR^[6].

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial inclui infecção fúngica, outra infecção bacteriana crônica, neoplasia e complexo granuloma eosinofílico.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Pode ser enviado material de aspirado por agulha fina, *imprint* da lesão ou o nódulo^[8]. Os nódulos devem ser amplamente excisados e metade deve ser conservada em formol a 10% e a outra metade refrigerada para posterior realização do cultivo^[5]. Para a realização de PCR, a amostra deve ser congelada e encaminhada quanto antes para um laboratório de referência. Algumas vezes o exame de PCR pode ter sucesso em detectar a bactéria em amostras conservadas em formol. No entanto, a fixação causa algum grau de degradação no DNA, podendo limitar o sucesso do procedimento^[7]. Em casos de infecção sistêmica e em casos generalizados, os animais podem vir a óbito. Nesses casos, podem ocorrer lesões granulomatosas em órgãos internos, devendo-se coletar fígado, baço, pulmão, linfonodos, medula óssea e os nódulos dérmicos^[17,21] e encaminhar para análise histopatológica, cultivo bacteriano ou exame de PCR.

Referências bibliográficas

1. ALLAN, G.S; WICKHAM, N. Mycobacterial granulomas in a cat diagnosed as leprosy. **Feline Practice**, v. 6, p. 34-36, 1976.
2. BANERJEE, P.; CHAKRABARTY, A.N.; DASTIDAR, S.G. Propagation of *Mycobacterium lepraeumurium* on supplemented minimal medium and its experimental pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 102, p. 104-113, 1995.
3. BARRS, V.R.; MARTIN, P.; JAMES, G.; CHEN, S.; LOVE, D.N.; MALIK, R. Feline leprosy due to infection with novel mycobacterial species. **Australian Veterinary Practice**, v. 29, p. 159-164, 1999.
4. BURTON, G. The cat with non-healing wounds. In: RAND, J. **Problem-based feline medicine**, Elsevier Saunders: Philadelphia, 2006. cap. 32, p. 1090.
5. COURTIN, F.; HUERRE, M.; FYVE, J.; et al. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, p. 238-241, 2007.
6. HUGHES, M.S., BALL, N.W., DE LISLE, G.W., SKUCE, R.A., NEILL, S.D. Determination of the etiology of presumptive feline leprosy by 16S rRNA gene analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2464-2471, 1997.
7. HUGHES, M.S; JAMES, M.J.; MCCARROLL J. et al. PCR studies of feline leprosy cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 4, p. 235-243, 2004.
8. GROSS T.L.; IHRKE P.J.; WALDER E.J. **Veterinary Dermatopathology**: Macroscopic and Microscopic Evaluation of Canine and Feline Skin Disease. Mosby Yearbook Inc., Saint Louis, MO, 1992, p. 170.

9. GUNN-MOORE, D.A.; JENKINS, P.A.; LUCKE, V.M. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. **Veterinary Records**, v. 138, p. 53-58, 1996.
10. JENKINS, P.A.; DUDDRIDGE, L.R.; YATES, M.D.; GRANGE, J.M. Identification of pathogenic and environmental mycobacteria. In: BOARD R.G., JONES D., SKINNER F.A. **Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology**. The Society for Applied Bacteriology Technical Series, n. 29. 1992, Blackwell Scientific, Oxford, UK, p. 311-324.
11. LAWRENCE, W.E. Cat leprosy: infection by a bacillus resembling *Mycobacterium leprae-murium*. **Australian Veterinary Journal**, v. 39, p. 390-393, 1963.
12. LEIKER, D.L., POELMA, F.G. On the etiology of cat leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 42, p. 312-315, 1974.
13. LEMARIE, S.L. Mycobacterial dermatitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, p. 1291-1301, 1999.
14. GUNN-MOORE D.; SHAW, S. Mycobacterial disease in the cat. **In Practice**; v. 19, p. 493-501, 1997.
15. MALIK, R.; HUGHES, M.S.; JAMES, G.; MARTIN, P.; WIGNEY, D.I.; CANFIELD, P.J.; CHEN, S.C.A.; MITCHELL, D.H.; LOVE, D.N. Feline leprosy: two different clinical syndromes. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v. 4, n. 1, p. 43-59, 2002.
16. MCINTOSH, D.W. Feline leprosy: a review of forty-four cases from Western Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 291-295, 1982.
17. PEDERSEN, N.C. Atypical mycobacteriosis. In: Feline Infectious Diseases. **American Veterinary Publications**, p. 194-197, 1988.
18. REES, R.J.W.; TEE, R.D. Studies on *Mycobacterium lepraeumurium* in tissue culture. **British Journal of Experimental Pathology**, v. XLIII, p. 480-487, 1962.
19. SCHIEFER, H.B., MIDDLETON, D.M. Experimental transmission of a feline mycobacterial skin disease (feline leprosy). **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 460-471, 1983.
20. SCHIEFER, B.; GEE, B. R.; WARD, G.E. A disease resembling feline leprosy in Western Canada. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 12, p. 1085-1087, 1974.
21. WILKINSON, G.T.; MASON, K.V. Clinical aspects of mycobacterial infections of the skin. In: AUGUST, J.R. **Consultations in Feline Internal Medicine**, 1991. WB Saunders: Philadelphia, p. 129-136.

1.4 Anemia infecciosa felina

Conceito

A anemia infecciosa felina, causada pela *Mycoplasma haemofelis*, é uma hemoplasmose também conhecida como A hemobartonelose^[2,6].

Etiologia e Patogênese

A primeira descrição dessa doença no Brasil foi em 1976, por Massart e colaboradores. O *M. haemofelis*, anteriormente denominado *Hemobartonella felis*, foi recentemente isolado e documentado como pertencente ao gênero *Mycoplasma*^[12]. É relatado como um organismo *Mycoplasma* eritrocitário e também conhecido como *haemoplasma*^[13]. É uma bactéria Gram-negativa que fica na superfície eritrocitária^[4,9], podendo apresentar-se na forma de cocos ou bacilos. Está

relacionada à anemia hemolítica e à imunodepressão. Quando está associada a outra doença debilitante, pode levar a óbito^[10,16]. A transmissão ocorre pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*^[7], e existem evidências de que a pulga *Ctenocephalides felis* esteja envolvida na transmissão desse agente, no entanto ainda não está bem esclarecido se a pulga participa da forma natural de transmissão^[13].

Quando a célula é parasitada, ocorre um dano na membrana do eritrócito e este é removido pelo sistema imune da circulação sanguínea através da eritrofagocitose extravascular no baço, no fígado, nos pulmões e na medula óssea^[9,10]. A hemoplasmose induz anemia por hemólise, eritrofagocitose e sequestro. A fixação do hemoplasma ao eritrócito resulta em dano direto à membrana eritrocitária, provocando aumento da fragilidade osmótica e redução do tempo de vida dessa célula. O dano ao eritrócito também pode expor os抗ígenos eritrocitários escondidos ou resultar em uma alteração nesses抗ígenos, induzindo à produção de anticorpos antieritrócitos. Além disso, os eritrócitos são sequestrados no baço, onde os macrófagos removem os microrganismos *M. haemofelis* da superfície dos eritrócitos, devolvendo as células não parasitadas à circulação. A liberação de eritrócitos sequestrados explica o rápido aumento do hematórito em alguns gatos após a depuração da *M. haemofelis* da circulação^[10,11,17].

Diagnóstico

Para se chegar ao diagnóstico é necessário observar o microrganismo no sangue por meio de sorologia ou técnicas moleculares. O meio mais tradicional de diagnóstico da *M. haemofelis* é através de um esfregaço sanguíneo^[12].

a) Epidemiologia

Não existe predileção quanto a sexo ou raça, embora os machos sejam mais representativos na população dos acometidos pela hemobartonelose^[8].

b) Sinais clínicos

A hemobartonelose pode ser assintomática na forma aguda ou levar à anemia regenerativa quando crônica^[2]. Os gatos acometidos podem apresentar letargia, anorexia de 1 a 2 dias de duração, desidratação, depressão, perda de peso e icterícia^[11,16]. Ao fazer o exame físico, pode-se observar febre intermitente na fase aguda^[13].

c) Patologia

Os achados mais frequentes são esplenomegalia e linfadenopatia, que ocorrem como consequência da hematopoese extramedular. Em alguns casos, observa-se icterícia, decorrente da intensa hemólise^[11].

d) Diagnóstico laboratorial

A infecção por *M. haemofelis* tipicamente causa anemia regenerativa com reticulocitose, anisocitose, macrocitose e policromasia. A severidade da anemia dependerá do estágio da infecção, mas a queda do hematórito abaixo de 20% (15% a 18%) normalmente é comum nessa infecção^[3,14].

O *M. haemofelis* não pode ser cultivado. Por esse motivo, o diagnóstico de infecção fica restrito à sua identificação citológica na superfície dos eritrócitos, por meio de esfregaços ou de testes moleculares, como a PCR. Atualmente, o método de diagnóstico mais usado é a citologia; no entanto, possui a desvantagem de ocorrer falso-negativo e falso-positivo em alguns casos. O teste PCR é o teste de escolha para o diagnóstico de infecção por esse agente^[11].

O ideal é que não se colham amostras durante o tratamento antibiótico. Caso seja realizado durante esse período, e evidencie um resultado altamente positivo, indica que a terapia não está sendo eficaz. O PCR pode detectar infecções crônicas e até mesmo casos assintomáticos. Por isso, um resultado positivo nem sempre indicará a presença da doença clínica.

Os esfregaços podem ser preparados por inúmeros corantes, tais como Giemsa, Grunwald-Giemsa, Wright e Wright-Giemsa^[11]. A ausência de organismos no esfregaço sanguíneo não descarta a hemoplasmose. O organismo é tipicamente encontrado na periferia do eritrócito, podendo apresentar-se sozinho ou em pares, ou até mesmo em cadeias, em infestações severas. Muito ocasionalmente os organismos podem ser vistos livremente na lâmina. Falsos positivos ocorrem em algumas vezes devido à presença de artefatos em lâminas mal preparadas.

O teste PCR mostrou-se mais sensível do que os esfregaços sanguíneos para a detecção de *M. haemofelis*. Somente 37,5% das amostras foram positivas em exames citopatológicos comparados com 100% positivos em teste PCR^[15]. A PCR tem ainda a vantagem de distinguir entre as diferentes espécies de hemoplasmas. Western blot também pode ser aplicado para o diagnóstico da doença, como técnica conformatória complementar a outras metodologias^[1].

e) Diagnóstico diferencial

Cytuaxzoom felis e *Babesia felis* também causam anemia, porém regenerativa e normalmente o paciente apresenta icterícia. Doenças hepáticas crônicas também poderão causar anemia, normalmente mediana (hematócrito de 18% a 27%). Qualquer doença infecciosa, mediada pelo sistema imune ou neoplásica, que cause anemia hemolítica possui sinais clínicos semelhantes, como anemia e febre.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se enviar sangue com EDTA para análise hematológica^[5] e esfregaços sanguíneos de ponta de orelha. Para a realização de testes sorológicos e moleculares envia-se soro sob refrigeração.

Referências bibliográficas

1. ALLEMAN A.R. et al. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1474-1479, 1999.
2. CARTER, G.R. **Major infectious diseases of dogs and cats** (listed alphabetically – part 2 (E through L). Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 05 maio. 2008.
3. FOLEY, J.E. et al. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 1581-1588, 1998.
4. HARVEY, J.W. **Infectious disease of feline blood**. Small animal. Hematology. The North American veterinary conference. 2006. [online] Disponível em: <www.tnavc.org>. Acesso em: 05 jun. 2008.
5. KURTDEDE, A.; URAL, K. Haemobartonellosis in cats in Ankara, Turkey. **Acta Veterinaria BRMO**. v. 73, p. 507-512, 2004.
6. MASSARD, C.L. SERRA FREIRE, N.M.S.; FLAUSINO, W. *Haemobartonella felis* Flint and McKelvie, 1955 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em hemárias de *Felis catus* domesticus L. no continente Sul Americano. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 1, Rio de Janeiro, p. 1. 1976.

7. MILKEN, V.M.F.; CABRAL, D.D.; SANTOS, R.T.G.; et al. Prevalência de *Haemobartonella felis* em gatos errantes no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Biotemas**, v. 15, n. 2, p. 79-84, 2002.
8. NORSWORTHY, G.D. Hemobartonelose. In: NORSWORTHY, G.D.C.; CRYSTAL, M. A.; GRACE, S.F. et al. **O paciente felino**. 2. ed., 2004, cap. 69, São Paulo: Manole, p. 299-302.
9. Quinn, P.J., W.J. Donnelly, M.E. Carter, B.K. Markey, P.R. **Microbial and Parasitic Diseases of the Dog and Cat**. Breathnach: Saunders Company, 1997, 372p.
10. SOUZA, A.M., SÁ, A.G. de; DA SILVA, C.F.G.K. et al. **Perfil hematológico e frequência de hemoparasitos em gatos domésticos** (*Felis catus*, LINAEUS, 1758), da região de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em: <<http://www.castelobranco.br/pesquisa>>. Acesso em: 10 mai. 2009.
11. TASKER, S; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002.
12. TASKER, S.; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. n. 4, p. 3-11, 2004.
13. TASKER, S. Anemia infeciosa felina. In: CHANDLER, E.A., GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3. ed., 2006, cap. 29, São Paulo: Roca, 590p.
14. TASKER, S. **Feline haemoplasma infection (haemobartonella), an update**. The North American veterinary conference. Disponível em: <www.tnacv.org>. Acesso em: 10 jul. 2008.
15. TASKER, S. **Feline haemoplasma infections**. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 05 maio. 2008.
16. VANSTEENHOUSE, J.L.; MILLARD, J.R.; TABOADA, J. Feline haemobartonellosis. **Compendium of Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 15, p. 535-545, 1993.
17. WESTFALL, D.S. et al. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 5, p. 687-681, 2001.

1.5 Bartonelose

Conceito

A bartonelose é uma doença bacteriana conhecida como a doença do arranhão do gato.

Etiologia e Patogênese

Bartonella ssp. é uma bactéria facultativa intraeritrocitária ou epieritrocitária. Em forma de bastonetes que medem de 1 a 2µm de comprimento, tem aspecto ligeiramente encurvado e se cora positivamente com corantes de prata^[4].

Diagnóstico

Os gatos com *Bartonella* geralmente têm infecção inaparente. É necessária uma combinação de fatores para se chegar ao diagnóstico utilizando exames laboratoriais como culturas e sorologia^[3].

a) Epidemiologia

A transmissão entre hospedeiros da *Bartonella* ocorre pelos artrópodes, predominando as pulgas. A *Bartonella henselae* (mais comum) e a *B. clarridgeiae* podem ser identificadas em ga-

tos que causam a doença da arranhadura^[7,8], considerada uma zoonose. Quando a *Bartonela* spp. entra em contato com uma pessoa com imunidade deprimida, poderá desenvolver um quadro de bactеремia^[1]. Na Espanha foram diagnosticadas seis pessoas com endocardite causada pela *Bartonella henselae*. Todos os pacientes tiveram contato com gatos^[6].

b) Sinais clínicos

Os gatos naturalmente infectados são assintomáticos. A *Bartonela* spp. pode estar relacionada a endocardite e uveíte em felinos. Não está claro se a *Bartonella* é o único microrganismo associado a doença em gatos, porém foram evidenciados episódios de febre que cessavam em 48 a 72 horas em felinos experimentalmente infectados, febre, sintomas nervosos e desordens na reprodução^[2]. Os animais com infecções crônicas apresentam lesões inflamatórias no fígado, baço, miocárdio e rim^[4,8].

c) Patologia

Em gatos infectados experimentalmente foram observadas, na necropsia, hiperplasia foliicular esplênica, colangite/pericolangite linfocítica, hepatite linfocítica, miocardite linfoplasmocítica e nefrite linfocítica intersticial^[2].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico da bartonelose é por meio de uma combinação de fatores, tais como a detecção positiva da *Bartonela* spp. por meio de testes como cultura e sorologia, e resposta à administração de fármacos antibartonela^[3]. A *Bartonella* spp. pode ser isolada de hemocultura, linfonodos e espécimes de biópsia cutânea. Quando existe a suspeita clínica, deve-se incubar a amostra por, no mínimo, 7 a 40 dias^[1].

e) Diagnóstico diferencial

É importante considerar enfermidades que cursam com quadros de hepatoesplenomegalia, linfoadenomegalia, miocardite e nefrite.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O envio de sangue ao laboratório deve ser realizado com utilização de frascos sem anticoagulante a fim de pesquisar IgG por meio do teste de imunodeficiência indireta (IFI), e também para o hemocultivo em ágar sangue de cordeiro e ágar chocolate^[5].

Referências bibliográficas

1. ANVISA. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Agência nacional de vigilância sanitária. Módulo v. 2005.
2. BREITSCHWERDT, E.B. Cat Scratch and Feline Bartonellosis. In: SEVC Proceedings 2007.
3. BRUNT, J.; GUPTILL, L.; KORDICK, D.L. et al. American Association of Feline Practitioners 2006. Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. Infections. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n. 8, p. 213-226, 2006.
4. CRYSTAL, M.A. Bartonelose (Doença do Arranhão do Gato). In: NORSWORTHY, G.D.; CRYSTAL, M. A.; GRACE, S.F. et al. **O paciente Felino**. 2. ed., 2004, São Paulo: Manole, cap. 36, p. 156-159.

5. FERRÉS, M.; ABARCA, K.; GODOY, P. et al. Presencia de *Bartonella henselae* en gatos: cuantificación del reservorio natural y riesgo de exposición humana de esta zoonosis en Chile. **Revista Médica de Chile.** v. 133, n. 12, p. 1465-1471, 2005.
6. OTEO, J.A.; CASTILLA, A.; AROSEY, A. et al. Endocarditis por *Bartonella* spp.: Aportación de tres nuevos casos y revisión de la literatura nacional. **Enferm Infect Microbiol Clin.** n. 24, p. 297-301, 2006.
7. WILLOUGHBY, K.; BENNETT, M. Outras infecções. In: **Clínica e terapêutica em felinos.** São Paulo: Roca, cap. 30, 2006, p. 553-567.
8. WOLF, A.M., Feline Bartonella Infections – Just the facts. The North American Veterinary Conference, 2006.

1.6 Leptospirose

Conceito

A leptospirose é uma zoonose causada por uma bactéria aeróbica, móvel, de formato espiralado e de fácil penetração^[12]. Em gatos tem sido citada como incomum, porém investigações feitas no Brasil e em outros países indicam reações sorológicas positivas nessa espécie^[2].

Etiologia e Patogênese

A *Leptospira interrogans* engloba 22 sorotipos e mais de 200 sorovares, dos quais muitos são patogênicos aos animais domésticos^[13]. Os roedores da espécie *Rattus rattus* transmitem leptospirose para o ser humano e para outros animais, provocando distúrbios econômicos^[3]. Foi investigado o papel dos gatos como reservatório para outras espécies pela presença de aglutininas antileptospiras em felinos do município de Patos, PB. Em 100 animais, 12% foram sororreagentes para leptospires, predominando sorotipo *autumnalis*, *pomona*, *bratislava* e *icterohaemorrhagiae*^[2]. A leptospirose também foi investigada em um grupo de gatos domésticos, nos quais foi encontrada uma grande quantidade do sorovar *pomona*. Também detectados os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippotyphosa*, *autumnalis*, *ballum*, *tarassovi*, *coepnhagen* e *zanolii*^[10].

Ao se infectar, tanto os homens quanto os animais tornam-se portadores de leptospira em nível renal, eliminando espiroquetas através da urina durante meses ou até anos, como nos casos de roedores peridomiciliares e animais silvestres assintomáticos^[11]. A transmissão ao homem ocorre pelo contato direto com sangue, tecidos, órgãos ou urina de animais infectados, ou ainda de maneira indireta pelo contato com água ou solo contaminado com urina infectada^[11]. Por esse motivo, a importância de detectar o gato que se apresenta soropositivo para leptospirose. Em um estudo realizado em Uberaba, MG, dos nove felinos selvagens testados, quatro foram positivos (44,45%). Os sorovares encontrados foram *canicola*, *icterohaemorrhagiae* e *andamana*, e os autores descrevem que a infecção por *Leptospira* spp. em felinos é relatada com maior frequência em gatos domésticos^[5]. Foram pesquisados 359 soros sanguíneos de felídeos neotropicais da Região Sudeste do Brasil com o objetivo de avaliar a presença de sorovares de leptospires. Foram encontrados em 12,81% sorovares reagentes com 23 leptospires patogênicas e dois sorovares de leptospires apatogênicas.

Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose deve ser realizado pelos sinais clínicos e patológicos e pela epidemiologia da doença, e confirmados por exames laboratoriais.

a) Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose que tem distribuição cosmopolita, ocasionada pela *L. interrogan*. Apresenta diversos sorotipos e acomete praticamente todas as espécies animais, incluindo o homem. A leptospirose em felinos é considerada rara^[1,4], pois existe certa resistência natural à leptospira. No entanto, existem relatos de doença nesses animais, e as avaliações soroepidemiológicas têm mostrado vários sorovares de *Leptospira*^[4].

b) Sinais clínicos

Os felinos, por serem mais resistentes a essa infecção, na maioria das vezes não apresentam sinais clínicos. Quando se infectam, podem apresentar leptospiúria, sendo assim fonte de infecção para outros animais e para o próprio homem^[7]. Os gatos infectados poderão apresentar distensão abdominal pela presença de ascite^[1].

Foi realizado um experimento com dois grupos de felinos: um grupo ingeriu ratos infectados com leptospiras e o outro ingeriu apenas vísceras infectadas. Os sinais clínicos observados foram brandos. Um desses sinais foi o fato de os animais demonstrarem aumento de temperatura concomitantemente com a leptospiúria. O grupo que ingeriu vísceras contaminadas apresentou leptospiúria após 12 dias, e o grupo de felinos que ingeriu ratos contaminados demonstrou leptospiúria 15 dias após a ingestão, porém com infecção mais leve, comparada ao grupo que se alimentou com vísceras contaminadas^[9].

c) Patologia

Nos gatos que foram experimentalmente infectados, a patogênese da leptospirose felina foi semelhante à da infecção canina, porém os sinais clínicos geralmente não se desenvolvem. Alguns animais apresentam lesões histológicas nos rins e no fígado.

d) Diagnóstico laboratorial

Exames laboratoriais indicarão elevação de enzimas hepáticas e bilirrubinúria. O exame solicitado é a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) utilizando culturas vivas de leptospiras em meio enriquecido (EMJH)^[6]. Resultados positivos são indícios de infecção.

Outros testes que podem ser utilizados são: ELISA, imunofluorescência e PCR^[8]. As técnicas de imunofluorescência e a imuno-histoquímica têm sido adaptadas para a identificação desse organismo em impressões de tecidos renal e hepático e em líquidos corporais, tais como sangue, urina e eflusões. O ideal é que o organismo seja cultivado de sangue, urina e liquor, no entanto, a *Leptospira* sp. é difícil de cultivar, podendo levar de semanas a meses para crescer^[8].

e) Diagnóstico diferencial

As doenças hepáticas são as principais doenças que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial, entre elas a lipidose hepática e a colangio-hepatite. Outras doenças que devem ser incluídas são aquelas que causam hemólise em gatos, tais como a babesiose, a *citauxzoonose*, a hemobartonelose e a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV). A avaliação ultrassonográfica e a citologia por agulha fina do tecido hepático auxiliarão na diferenciação do diagnóstico, quando se suspeita de alteração hepática.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se colher sangue assepticamente e armazená-lo em tubo sem anticoagulante para obter o soro^[15]. Colher em média 4ml para conseguir 2ml de soro. Após a obtenção do soro, as amostras podem ficar sob refrigeração até o envio da amostra ao laboratório^[14].

Referências bibliográficas

1. ABRAMS-OGG, A. The cat with abdominal distension or abdominal fluid. In: RAND, J. **Problem-based feline medicine**, Elsevier Saunders: Philadelphia, 2007, cap. 22, p. 478.
2. ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas antileptospiras em gatos no município de Patos, PB. **Clínica Veterinária**, n. 46, p. 48-54, 2003.
3. BEVILACQUA, P.D.; CARMO, R.P.; SILVA, J.C.P. et al. Roedores inventariados no hospital veterinário e fragmentos de mata nativa da zona da mata de Minas Gerais, Brasil: Caracterização populacional e infecção por *Leptospira* sp. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1519-1523.
4. CABRAL, K.G.; KRONFLY, C.S.; LANGONI, H. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em gatos (*Felis doméstica*). In: COMBRAVET. Gramado-RS, **Anais...** Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul. 1997. p. 174.
5. ESTEVES, F.M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R.J. da S. et al. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do zoológico municipal de Uberaba, MG. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 72, n. 3, p. 283-288, 2005.
6. GUERRA-NETO, G.G., ANDRADE, R.J.S., KOPROSKI, L.P. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais pertencentes ao criadouro de animais silvestres de Itaipu binacional e ao zoológico municipal bosque guarani, Foz do Iguaçu, Estado do Paraná. **ARS Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 75-80, 2004.
7. HAGIWARA, M.K. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leptospirose animal. In: ENCONTRO NACIONAL DE LEPTOSPIROSE, 3. Rio de Janeiro. **Anais...** 157p. 1993.
8. HARTMANN, K.; GREENE, C.E. Diseases by systemic bacterial infections. In: ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary Internal Medicine**. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2005, cap. 165, p. 616-619.
9. LANGONI, D.; CABRAL, K.G.; KRONFLY, C.C. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em gatos. **Clínica Veterinária**, n. 17, p. 24-26, 1988.
10. NETO, G.G. **Freqüência de anticorpos contra *leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, 2006, 62p.
11. LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista Educação Continuada CRMV – SP**, v. 2, p. 52-58, 1999.
12. MARTINI, K. **Leptospirose: uma questão de saúde pública**. Agência centralsul de notícias. Disponível em: <www.agenciacentralsul.org>. Acesso em: 20 nov. 2008.
13. RODRIGUES, A.M.A.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAES, Z.A. et al. *Leptospira* spp. de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Supl 2): s705-s706, 2007.
14. SARMENTO, A.M.C.; GUAZELLI, A.; BARRETO, L.F.G. Estudo de leptospirose em cães e gatos, da leishmaniose e da doença de chagas em cães de aldeias indígenas guaranis em Paralheiros, Município de São Paulo, SP. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 193-203, 2007.
15. VIEGAS, S.A.; CALDAS, E.M.; OLIVEIRA, E.M. de D. Aglutininas anti-leptospira em hemosoro de animais domésticos de diferentes espécies, no Estado da Bahia, 1997/1999. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**. v. 1, p. 1-6, 2001.

1.7 Clamidiose

Conceito

A clamidiose é um importante agente que leva à conjuntivite aguda e crônica em felinos.

Etiologia e Patogênese

Chlamydophila felis (comumente denominada *Chlamydia psittaci*) são bactérias intracelulares altamente especializadas, com predileção por células epiteliais conjuntivais, que causam conjuntivite e infecção respiratória em gatos^[5,15,19,20]. São facilmente inativadas com solventes lipídicos e detergentes e sobrevivem poucos dias à temperatura ambiente^[15]. A transmissão natural ocorre pelo íntimo contato com um gato infectado, por aerossóis e fômites. Ainda não está bem definido se ocorre a transmissão venérea em gatos. O período de incubação é de 3 a 5 dias e a infecção por esse agente tende a ter um curso insidioso crônico, frequentemente progredindo para um estágio assintomático devido à persistência do agente nos tecidos^[17].

Diagnóstico

A clamidiose precisa ser diferenciada de outras doenças infecciosas, pois não é possível diferenciar infecções causadas por calicivírus, herpesvírus e *Chlamydia* sp. com base apenas em sinais clínicos, além do fato de infecções mistas poderem ocorrer.

a) Epidemiologia

Chlamydophila felis têm sido isoladas de gatos neonatais com conjuntivite, embora muitos gatos pareçam ter proteção derivada de anticorpos maternos^[15]. A primeira vez que a *C. felis* foi isolada em gatos com doença do trato respiratório foi em 1942. Com a descoberta dos herpesvírus felino e do calicivírus, a importância da *C. felis* foi questionada, no entanto inúmeros trabalhos têm confirmado sua importância como agente etiológico de doenças oculares em gatos^[4,15], e sua prevalência é de 23% a 31% em casos de doença do trato respiratório superior^[19]. Estudos com utilização da cultura e PCR têm demonstrado que gatos com menos de 1 ano de idade são mais suscetíveis e com mais de 5 anos menos suscetíveis. No entanto, gatos idosos (com mais de 10 anos) são ainda mais suscetíveis do que os filhotes^[11,12]. Não há predileção por sexo ou raça.

Evidência molecular de infecção por *C. felis* já foi detectada em uma pequena porcentagem de humanos com doença do trato respiratório^[1]. *C. felis* têm sido também relatadas como causadoras de outras doenças em humanos, tais como hepatomegalia, glomerulonefrite e endocardite^[2,7,8]. *C. felis* parecem ter predileção por células conjuntivais epiteliais. A transmissão natural ocorre pelo contato com felinos infectados e seus aerossóis e fômites. Tanto a *Mycoplasma* spp. quanto a *Bordetella bronchiseptica* podem complicar a infecção por *C. felis*^[9,10]. A coinfecção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) prolongará a duração da conjuntivite e a persistência da bactéria no gatil^[7]. Embora previamente tenha sido referido como agente de pneumonia felina, há uma controvérsia se *C. felis* possui um papel na doença do trato respiratório dos felinos, pois a maioria das cepas de *Chlamydia* em felinos foi originada de casos de conjuntivite^[11].

b) Sinais clínicos

Há relatos de infecção experimental por *C. felis* em filhotes de gatos causando febre, letargia e redução do ganho de peso, além dos sinais oculares^[16]. *C. felis* é um patógeno primariamente conjuntival capaz de causar conjuntivite aguda ou crônica com evidência de blefarospasmo, quemose, congestão e secreção serosa ou mucopurulenta. Febre transitória, inapetência, espirros e perda de peso podem ocorrer embora a maioria dos felinos permaneça sem sinais e com apetite normal^[12,16,17].

Os sinais clínicos melhoram após poucas semanas, mas uma conjuntivite média frequentemente permanece por meses. Descarga nasal e espirros podem ocorrer em alguns gatos, e quando ocorrem na ausência de alteração clínica ocular, é improvável que haja infecção por *C. felis*^[9].

c) Patologia

Chlamydophila felis é um patógeno primariamente conjuntival capaz de causar quemose, hiperemia e secreção serosa ou mucopurulenta. Em alguns gatos, observa-se ainda secreção nasal purulenta^[12,16].

d) Diagnóstico laboratorial

Um diagnóstico acurado requer avaliação microbiológica. Em alguns casos pode ser difícil diagnosticar a doença por meio de suabe conjuntival devido ao baixo número de organismos presentes e à presença de anticorpos na lágrima em casos de doença crônica^[3]. O uso de PCR convencional e o em tempo real são mais sensíveis do que o isolamento para se detectar a infecção^[6,13]. A principal vantagem do uso de PCR em tempo real é a menor chance de falso-positivo, sendo mais sensível do que a PCR convencional, além de o resultado ser mais rápido (cerca de duas horas)^[3]. Existem inúmeros kits de testes de antígeno ELISA para o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* que podem ser utilizados no diagnóstico de clamidiose em felinos. Possuem especificidade de 80% a 90% e sensibilidade de 25% a 80% para a detecção de *C. felis* quando comparado com o cultivo celular. Esses testes são interessantes, quando testes mais sensíveis não estão disponíveis^[15], pois embora esses testes demonstrem a presença de *Chlamydia* sp., não permitem a identificação de qual espécie e sorotipo estão envolvidos^[9].

O exame de coloração Giemsa de esfregaços conjuntivais não é recomendado, pois as inclusões, quando presentes, são visíveis apenas na fase inicial da doença. Por isso, comumente ocorrem falso-negativos. Falso-positivos podem ocorrer por confundir grânulos de melanina no citoplasma de células conjuntivais ou medicações, tais como a neosporina, com as inclusões típicas da doença^[15]. A imunofluorescência e a imunoperoxidase também podem ser realizadas, e são mais sensíveis do que a coloração de Giemsa para a detecção de inclusões de clamídia na conjuntiva^[21]. No entanto, possuem menor sensibilidade quando comparadas à PCR.

e) Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve incluir o herpesvírus e a conjuntivite por micoplasma (*Mycoplasma gatae* e *Mycoplasma felis*), que são facilmente confundidos com clamidiose, sendo impossível realizar o diagnóstico sem que sejam realizados testes específicos.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Passar um suave seco e estéril umedecido em solução salina, firme e vigorosamente nas regiões intranasal, faríngea, urogenital e na superfície conjuntival ocular^[14,18]. As amostras devem ser refrigeradas caso haja um atraso no envio ou durante temperaturas amenas; e devem ser congeladas caso se tenha certeza de que permanecerão congeladas até chegar ao laboratório que avaliará o material.

Referências bibliográficas

1. CORSARO, D. et al. New parachlamydial 16S rDNA phenotypes detected in human clinical samples. **Research in Microbiology**, v. 513, p. 563-567, 2002.
2. GRIFFITHS, P.D.; LECHLER, R.I.; TREHARNE, J.D. Unusual chlamydial infection in a human renal allograft recipient. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1264-1265, 1978.

3. HELPS, C. et al. Use of Real-Time Quantitative PCR to Detect *Chlamydophila felis* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2675-2676, 2001.
4. IWAMOTO, K. et al. Isolation of Chlamydia psittaci from Domestic cats with oculonasal discharge in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 8, p. 937-938, 2001.
5. JOHNSON, F.W. Isolation of *Chlamydia psittaci* from nasal and conjunctival exudate of a domestic cat. **Veterinary Records**, v. 114, p. 342-344, 1984.
6. MCDONALD, M. et al. A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. **Veterinary Records**, v. 143, p. 97-101, 1998.
7. O'DAIR, H.A. et al. Clinical aspects of *Chlamydia psittaci* infection in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Records**, v. 134, p. 365-368, 1994.
8. REGAN, R.J.; DATHAN, J. R. E.; TREHARNE, J.D. Infective endocarditis with glomerulonephritis associated with cat chlamydia (*Chlamydia psittaci*) infection. **British Heart Journal**, v. 42, p. 349-352, 1979.
9. SACHSE, K. et al. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 1-2, p. 2-21, 2009.
10. SHEWEN, P.E.; POVEY, R.C.; WILSON, M.R. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. **Canadian Veterinary**, v. 21, p. 231-233, 1980.
11. SYKES, J.E. Improvements in Diagnosis and Understanding of Feline Upper Respiratory Tract Pathogens. PhD thesis, University of Melbourne, 1997.
12. SYKES, J.E. et al. Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 153-162, 1999a.
13. SYKES, J.E.; STUDDERT, V.P.; BROWNING, G.F. Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline *Chlamydia psittaci* in untreated and doxycycline-treated experimentally infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 146-152, 1999b.
14. SYKES, J.E. et al. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and Chlamydia psittaci mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 95-108, 2001.
15. SYKES, J.E. Feline Chlamydiosis. **Clinical Technique Small Animal Practice**, v. 20, p. 129-134, 2005.
16. TERWEE, J. et al. Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 259-281, 1998.
17. TUZIO, H. et al. Feline zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 7, p. 243-274, 2005.
18. VOLOPICH, S. et al. Cytologic findings, and feline herpesvirus DNA and Chlamydophila felis antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, p. 25-32, 2005.
19. WILLS, J.M. et al. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat populations in Britain. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 327-339, 1988.
20. WOLDEHIWET, Z. Vaccines against chlamydial infections: A complex but effective strategy for disease control. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 200-203, 2006.
21. WOODLAND, R.M. et al. Sensitivity of immunoperoxidase and immunofluorescence staining for detecting Chlamydia in conjunctival scrapings and in cell culture. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 1073-1077, 1978.

1.8 Erliquiose

Conceito

A erliquiose¹ é uma doença causada por bactéria Gram-negativa intracelular pertencente à ordem *Rickettsiales*, família Anaplasmataceae, gêneros *Erlitchia* e *Anaplasma*^[1,6].

Etiologia e Patogênese

A erliquiose é uma doença incomum em gatos^[11], não havendo relatos de necropsia de gatos portadores desse mal^[3]. Já houve descrição de casos de gatos com mórulas com características de erlíquia em leucócitos, e plaquetas em células sanguíneas periféricas^[2]. Os gatos podem ser contaminados pela *E. risticci* e existem indícios sorológicos de uma espécie semelhante a *E. canis* que também pode ser a causa da doença nos gatos, podendo ter reação cruzada entre espécie e gênero^[9,11].

Por elas parasitarem leucócitos, eritrócitos e plaquetas, podem levar a alterações em vários órgãos, como fígado, pulmão e baço^[6]. O carrapato (*Rhipicephalus sanguineos*) infectado transmite a enfermidade pela saliva, sendo o período de incubação de aproximadamente três semanas. Podem ocorrer três estágios da doença: aguda, subclínica e crônica. A forma aguda inicia-se no momento da picada. A erlíquia é disseminada para o baço, fígado e sistema linfático. Infecta o sistema endotelial causando uma vasculite que leva a uma redução da vida das plaquetas e, consequentemente, à trombocitopenia. Ocorre também uma leucopenia variável e ligeira anemia. Na forma subclínica ocorre uma resposta imune à hiperglobulinemia, e a trombocitopenia persiste. Já na forma crônica ocorre uma diminuição da resposta medular com uma supressão de eritrócitos^[1,9].

Diagnóstico

Nos gatos que apresentam anemia é importante a realização de exames para investigar a etiologia, como colheita de sangue e esfregaço^[1].

a) Epidemiologia

Foi considerado pelos autores que a transmissão da *E. canis* seja por meio da ingestão de roedores ou de seus parasitas, pois os gatos não apresentavam sinais clínicos nem mórulas circulantes^[3]. Existem relatos que em um leão adulto, no seu habitat, parasitado por carrapatos do gênero *Haemaphisisalis*, havia a presença de mórulas de características do gênero *Ehrlichia* nos monócitos, indicando a possibilidade da transmissão da *Ehrlichia* sp. por vetores artrópodes^[4]. Não estão definidas as vias de transmissão da infecção natural, se é a exposição por artrópodes ou a ingestão de roedores. Logo, ambos devem ser evitados^[6].

b) Sinais clínicos

Os gatos infectados apresentam anemia, apatia, febre e presença de mórulas de *Ehrlichia* sp. em esfregaços sanguíneos^[2]. Os sinais clínicos dos gatos com erliquiose também podem ser: emagrecimento, caquexia, abatimento, anorexia, febre intermitente, dores articulares, hiperestesia, sensibilidade à palpação lombar, desidratação, esplenomegalia, linfadenomegalia e mucosas pálidas^[2,3,6].

¹ Nota de revisão: Palavra ainda não dicionarizada, mas comum na área veterinária.

c) Patologia

Os dados laboratoriais são: anemia normocítica normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia^[3]. O cultivo da amostra pode ser feito por meio de aspirados de vísceras, por exemplo, do animal vivo e podem ser observadas mórulas em células mononucleares^[3,10]. A *Ehrlichia* pode ser visualizada como corpúsculos de inclusão ou mórulas em leucócitos e plaquetas nos esfregaços sanguíneos que são obtidos de sangue total^[5,8]. A sorologia pode tornar-se duvidosa devido às reações cruzadas^[7]. O teste de *Western Blotting* tem sido utilizado para o diagnóstico de erliquiose, porém ele é menos eficaz do que o teste de PCR, e a PCR é mais viável levando-se em conta os custos^[12]. Sangue para testes hematológicos; soro para provas bioquímicas, sorologia e PCR; aspirado de órgãos, tais como pulmão e massas abdominais (se houver) devem ser investigados^[3,10]. Não existe relato de necropsia de gatos portadores de erliquiose^[3].

d) Diagnóstico laboratorial

As técnicas de diagnóstico utilizadas são as mesmas para todas as espécies conhecidas até o momento, que são: hematologia, provas bioquímicas, sorologia, detecção de *Ehrlichia* sp., *Western Blotting* e reação em cadeia pela polimerase (PCR)^[6]. O diagnóstico se dá por inclusões no citoplasma de monócitos, linfócitos e leucócitos^[3,4].

e) Diagnóstico diferencial

As doenças que devem constar no diagnóstico diferencial incluem neoplasias, a anaplasmosse, entre outras doenças infecciosas, e doenças imunomedidas que resultam em febre, poliartrite e anemia.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os exames laboratoriais são realizados por meio de sangue para testes hematológicos, e soro para provas bioquímicas, sorologia e PCR. Aspirado de órgãos, como pulmão e massas abdominais, também podem ser enviados^[3,10].

Referências bibliográficas

1. ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose Felina. Revisão. **Clínica Veterinária**. n. 23, p. 30-32, 1999.
2. ALMOSNY, N.R.P. et al, Erliquiose clínica em gato (*Felis Catus*). **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. n. 5, v. 2, p. 82-83, 1998.
3. BOULOY, R.P. et al. Clinical Ehrlichiosis in a Cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. n. 204, v. 9, p. 1475-1478, 1994.
4. BOURO, I.B.J.; NYAMWANGE, S.B.; KIPTOON, J.C. Presence of Ehrlichia-Like Bodies in Monocytes of Adult Lioness. **Feline Practice**. n. 22, v. 1, p. 36-37, 1994.
5. BURR, E.W. Methods for Diagnosis of *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Haemobartonella canis*. The **Indian Veterinary Journal**. v. 59, n. 12, p. 984-987, 1982.
6. DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e nos homens. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 22, n. 2, p. 191-201, 2001.
7. DAWSON, J.E. et al. Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equinemonocytic ehrlichioses. **American Journal of Veterinary Research**. n. 49, v. 12, p. 2096-2100, 1988.

8. EVERMANN, J. F. Diagnostic strategies for current and emerging canine infectious diseases. Proceedings for the canine infectious diseases workshop: From clinics to molecular pathogenesis. In: James A. Baker Institute **Proceedings for the Canine Infectious Diseases Workshp: From Clinics to Molecular Pathogenesis**, 1999. Disponível em: <www.ivis.org/proceedings/Baker_Can_Inf_Dis/Bprd/d06.asp>. Acesso em: 10 jan. 2009.
9. KLEINER, J.A., **Erliquiose**. Disponível em: <www.vetweb.com.br/vetweb>. Acesso em: 10 jan. 2009.
10. NYINDO, M.B.A. et al. Tropical canine pancytopenia: *In vitro* cultivation of the causative agent – *Ehrlichia cani*. **American Journal of Veterinary Research**. n. 32, v. 11, p. 1651-1658, 1971.
11. PEAVY, G.M. et al. Suspected ehrlichial infection in five cats from a household. **Journal of American Veterinary Medical Association**. n. 210, v. 2, p. 231-234, 1997.
12. SUKASAWAT, J.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticci* in sick dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 14, p. 50-55, 2000.

2. PRINCIPAIS DOENÇAS VIRAIS DOS GATOS

2.1 Calicivirose felina

Conceito

A calicivirose felina é uma doença viral do trato respiratório felino que produz úlceras na mucosa oral e possui maior ocorrência e gravidade em filhotes não vacinados. Essa doença apresenta distribuição mundial, e a prevalência é maior em criações e em gatis. A presença de animais carreadores, clinicamente normais, que excretam o vírus em secreções por longos períodos favorece a disseminação desse agente e a ocorrência da doença.

Etiologia e Patogênese

O calicivírus felino (FCV) é associado a surtos de doença respiratória em populações de felinos^[9,8]. Identificado em 1950, é um membro da família Caliciviridae, gênero *Vesivirus*, considerado um dos principais patógenos de felinos^[8]. Esse vírus é pequeno, não envelopado, possui uma fita simples e linear de RNA como genoma e, apesar do grande número de cepas com antigenicidade e patogenicidade variada, possui somente um sorotípo^[1,6,8]. O FCV é sensível à solução de hipoclorito de sódio (uma parte para 32 de água)^[6].

Diagnóstico

Suspeita-se de infecção pelo FCV quando o animal apresenta sinais respiratórios geralmente associados a vesículas e úlceras orais. Tosse ou espirros são pouco frequentes, uma forma de diferenciar a calicivirose da rinotraqueite viral felina. No entanto, essas observações são subjetivas e, para o diagnóstico definitivo da enfermidade, é necessária a confirmação da etiologia. Além do FeHV-1 e do FCV, a *Chlamydophila felis*, *Mycoplasma* spp. e a *Bordetella bronchiseptica* também produzem doença respiratória em felinos. A *Chlamydophila felis* é considerada um patógeno predominantemente conjuntival, *Mycoplasma* spp. podem ser agentes primários ou secundários e a *Bordetella bronchiseptica* tem sido considerada um patógeno primário do trato respiratório de felinos e caninos^[6]. Outros vírus, como o reovírus felino, podem ser responsáveis por casos brandos e esporádicos, não sendo causa importante na ocorrência natural de doença respiratória supe-

rior de felinos. Outros agentes bacterianos (estafilococos, estreptococos, *Pasteurella* spp. e coliformes) são considerados patógenos predominantemente secundários^[6].

a) Epidemiologia

Tanto o FCV quanto o FeHV-1 são altamente contagiosos, produzindo surtos de elevada morbidade em populações de felinos, principalmente em abrigos, gatis e criações onde os animais possuem maior contato entre si^[1,5,6]. A transmissão do FCV ocorre principalmente pelas secreções orais, nasais e oculares de animais infectados, pelo contato direto ou ainda por meio de aerossóis e fômites contaminados. Gatos assintomáticos com infecção persistente podem excretar o vírus nas secreções nasais e oculares por períodos prolongados, ou mesmo por toda a vida^[1,9,8]. Estudos demonstram que 50% dos gatos infectados continuam a excretar o vírus 75 dias após a infecção. Como o vírus sobrevive por pouco tempo no ambiente, a transmissão é mais frequente pelo contato direto entre animais infectados e suscetíveis^[6].

O período de incubação geralmente é de 2 a 5 dias^[4,9]. A replicação viral ocorre nos tecidos orais e respiratórios, podendo atingir os pulmões. Eventualmente, o vírus pode ser detectado em macrófagos na membrana sinovial das articulações e em órgãos, e ainda nas fezes e na urina^[6]. Gatos com infecção crônica possuem o vírus na faringe e nas tonsilas, onde o FCV se replica por meses ou anos em baixos níveis, sendo excretado na secreção oronasal e transmitido a outros animais suscetíveis^[8]. Esses animais podem apresentar, eventualmente, doença respiratória ou lesões orais, porém na maioria dos casos esses gatos carreadores não apresentam sinais clínicos da infecção.

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a doença produzida pelo FCV pode ser aguda ou subaguda, sendo caracterizada por conjuntivite, rinite, traqueíte, pneumonia e formação de vesículas e úlceras na mucosa oral, na língua e no palato^[1,9]. As cepas do FCV diferem no tropismo e na virulência; por esse motivo, a infecção pode ser subclínica, uma síndrome branda, caracterizada por depressão, pirexia, úlceras orais, e sinais respiratórios e conjuntivais leves ou, ainda, doença sistêmica aguda e severa com elevada taxa de mortalidade^[6]. A doença é mais grave em filhotes, porém pode ser observada em felinos de todas as idades^[1]. Espirros, conjuntivite e descarga ocular e nasal são menos proeminentes quando comparados com a infecção produzida pelo FeHV-1^[6].

Gatos com infecção mais grave apresentam descarga nasal e ocular, que pode evoluir de serosa para mucopurulenta pela presença de infecções bacterianas secundárias^[1]. Febre, anorexia, obstrução das narinas e pálpebras, desidratação e hipersalivação também podem ser observadas^[5]. Edema de face e patas, e hemorragia no nariz e nas fezes podem ser relatados em casos graves. Em um estudo, verificou-se que 80% dos gatos com a doença oral crônica ou o complexo estomatite e gengivite linfoplasmática (LPGS) excretam o FCV^[6].

Além da forma pneumotrópica da calicivirusose, ocasionalmente pode ocorrer a forma reumática, causando edema, dor articular e claudicação em filhotes com poliartrite. Acredita-se que a poliartrite possa ser produzida pela deposição de imunocomplexos^[1,8]. A recuperação clínica geralmente ocorre em 7 a 10 dias, porém em casos mais graves a recuperação pode ser mais longa e a mortalidade pode ocorrer.

c) Patologia

Na análise *post mortem* observa-se pneumonia intersticial primária, alveolite com áreas de consolidação pulmonar difusa, edema, hemorragia, ulcerações na mucosa, infiltrado de células inflamatórias, hiperplasia, hipertrofia e necrose dos pneumócitos e espessamento dos septos alve-

olares. Um aumento na quantidade de líquido sinovial, sinovite e redução da espessura da membrana sinovial podem ser observadas nas articulações. Hepatomegalia, pancreatite e pericardite podem ser relatadas quando ocorre infecção aguda sistêmica^[2,6].

d) Diagnóstico laboratorial

O FCV produz efeito citopático em células de origem felina, como cultivos primários e a linhagem CRFK, caracterizado por lise e arredondamento celular. Suabes nasais, oculares ou orofaríngeos podem ser colhidos para a realização de isolamento viral e imunofluorescência (IFA)^[1,8]. Ademais, amostras de pulmão, tonsilas e mucosa da orofaringe de felinos que morreram em consequência da doença respiratória também podem ser submetidas ao isolamento viral. “Crio-seções” de pulmão podem ainda ser submetidas à IFA para a detecção de抗ígenos do vírus^[1,9]. Alternativamente,抗ígenos do FCV também podem ser detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA)^[9].

A diferenciação entre o FCV e o FeHV-1 pode ser realizada por microscopia eletrônica, IFA, sensibilidade a solventes lipídicos (o FCV não possui envelope; já o FeHV-1 possui envelope lipídico, portanto é sensível a solventes lipídicos), RT-PCR/PCR e testes imunológicos^[9]. Infecções concomitantes são comuns, no entanto por características de replicação *in vitro* desses dois vírus, o FCV é identificado com maior frequência por isolamento viral, mascarando o efeito citopático e a detecção do FeHV-1. Portanto, para a detecção dos dois agentes pode ser necessária a aplicação de técnicas adicionais, como a PCR. A detecção do vírus com anticorpos monoclonais por *Western blot* foi descrita experimentalmente^[3]. O teste de amostras de secreção oral, nasal ou ocular por RT-PCR é útil para a identificação de animais positivos, acompanhamento da excreção de vírus, bem como diferenciação da infecção produzida pelo FCV daquela produzida pelo FeHV-1. O desenvolvimento de um PCR multiplex para o FCV, FeHV-1 e *Chlamydophila felis* (anteriormente *Chlamydia psittaci*) é uma ferramenta útil para o diagnóstico e também para inquéritos epidemiológicos^[10].

Anticorpos contra o FCV podem ser detectados por ELISA ou ainda por soroneutralização^[7]. Porém, não é possível diferenciar animais vacinados de animais infectados naturalmente por sorologia. Pode-se, contudo, utilizar a sorologia em amostras pareadas de soro, colhidas com um intervalo mínimo de duas semanas, para a confirmação de infecção recente, pela observação de soroconversão^[2].

e) Diagnóstico diferencial

A infecção respiratória produzida pelo FCV deve ser diferenciada daquela produzida pelo FeHV-1. Clinicamente, a presença de espirros, tosse e ceratite ulcerativa são menos frequentes quando a doença é produzida pelo FCV. A presença de úlceras na língua ou na mucosa oral também é uma forma de diferenciar essas infecções clinicamente, porém somente o diagnóstico laboratorial pode ser definitivo, uma vez que infecções concomitantes por esses vírus, e ainda com a presença de bactérias, são frequentes. Além da rinotraqueite infecciosa, outras infecções que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial são as produzidas por *Chlamydophila felis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma* spp. e outras bactérias, além do reovírus felino e do vírus da varíola bovina. Observar a diferenciação clínica das enfermidades respiratórias em felinos na Tabela 1. Alergias e neoplasias também podem produzir sinais do trato respiratório superior.

Quando a infecção respiratória é mista (vírus e bactérias), o animal pode apresentar descarga nasal mucopurulenta, rinite e halitose. Nesses casos, pode-se pensar em criptococose e em neoplasias, que são diferenciadas com citologia e biópsias, respectivamente. As ulcerações orais em felinos podem ainda ocorrer em decorrência de uremia ou possuir causas tóxicas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Material de descargas nasais, oculares ou orofaríngeas pode ser colhido com o auxílio de suabes estéreis e acondicionado em tubos de rotina esterilizados contendo meio essencial mínimo (MEM)^[1,8]. Amostras de pulmão, tonsilas e mucosa da orofaringe de felinos que morreram em consequência da doença respiratória também podem ser colhidas, com antisepsia, protegidas e devidamente identificadas em embalagens individuais. Amostras de soro devem ser separadas do coágulo. Aconselha-se que as amostras biológicas para o diagnóstico virológico sejam enviadas refrigeradas ou congeladas ao laboratório de virologia, acondicionadas em caixas isotérmicas, acompanhadas do histórico completo, suspeita clínica e a relação de exames solicitados. Amostras para exame histológico não devem ser congeladas, podendo ser enviadas em formol 10% ou tamponado, dependendo da técnica a ser utilizada.

Referências bibliográficas

1. BARLOUGH, J.E. Calicivirus. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**: a practitioner's guide. St Louis: Mosby year book, 1992. p. 178-181.
2. BARR, M.C. et al. Moléstias vírais felinas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-631.
3. CARTER, M.J. et al. Monoclonal Antibodies to Feline Calicivirus. **Journal of General Virology**, p. 2197-2200, 1989.
4. CARTER, G.R.; WISE, D.J. Caliciviridae. In: CARTER, G.R.; WISE, D.J.; FLORES, E.F. **A Concise Review of Veterinary Virology**. International Veterinary Information Service: Ithaca- NY, 2005. Disponível em: <www.ivis.org>, Acesso em: 05 set. 2009.
5. FORD, R.B. Feline viral upper respiratory disease: herpesvirus and calicivirus. **Proceedings: world congress of the world small animal veterinary association**, 30, Cidade do México, 2005.
6. GASKELL, R.M.; DAWSON, S.; RADFORD, A. Feline Respiratory Disease. In: GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 16, p. 145-154.
7. LAPPIN, M.R. et al. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 220, n. 1, p. 38-42, 2002.
8. NEILL, J. Caliciviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 4525-4536. Cap. 20.
9. MURPHY, F.A. et al. Caliciviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap. 36, p. 533-542.
10. SYKES, J.E. et al. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and Chlamydia psitacci mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. **Vet Microbiol.**, n. 81, p. 95-108, 2001

2.2 Rinotraqueíte viral felina

Conceito

A Rinotraqueíte viral felina é uma doença do trato respiratório superior, causada pela infecção pelo herpesvírus felino (FVR), frequentemente associada a infecção pelo calicívirus felino e algumas bactérias. A infecção geralmente permanece latente após a recuperação dos animais, tor-

nando-se portadores. Condições de estresse ou tratamento com corticosteróides pode levar à reativação do vírus^[8].

A rinotraquíte viral felina (FVR), juntamente com a calicivirose felina, é responsável por 80% a 90% dos casos de doenças do trato respiratório superior de felinos^[3].

Etiologia e Patogênese

A FVR é produzida pelo herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1), um membro da subfamília Alphaherpesvirinae, família Herpesviridae. Esse vírus possui uma cadeia dupla de DNA como genoma, é envelopado e sua família é conhecida pela habilidade de produzir infecções latentes em seus hospedeiros, reativando a infecção e excreção de vírus na secreção nasal com ou sem recrudescência clínica periodicamente, principalmente em situações de estresse. Esse vírus é suscetível à maioria dos desinfetantes comuns^[6,4].

A replicação do FeHV-1 é mais eficiente em locais onde a temperatura corpórea é mais baixa, limitando a infecção aos tecidos epiteliais oculares, ao trato respiratório superior e à cavidade oral. O envolvimento do trato respiratório inferior é raro, podendo ocorrer viremia e infecção sistêmica generalizada. A infecção genital pelo herpesvírus manifesta-se por vaginite ou cervicite e resulta em problemas reprodutivos temporários^[4].

Diagnóstico

O diagnóstico da FVR é realizado pelos sinais clínicos de infecção do trato respiratório superior. Em gatis e abrigos, um grande número de animais apresenta sinais da infecção pela rápida disseminação do agente entre gatos suscetíveis não vacinados^[6,2,3]. No entanto, para definir a etiologia de um surto ou caso, é necessária a realização de testes laboratoriais, pois clinicamente a infecção pelo FeHV-1 é pouco distinguível daquela produzida pelo FCV, podendo ainda existir a coinfeção por esses dois vírus ou mesmo com outros agentes^[3].

a) Epidemiologia

A transmissão do FeHV-1 ocorre principalmente por contato direto com secreções orais, nasais e oculares. A transmissão por contato indireto com descarga nasal, ou ainda por aerossóis e fômites contaminados, também é relatada. Gatos com infecção aguda se constituem na principal fonte de vírus, excretando e disseminando o FeHV-1 entre os gatos suscetíveis em contato. O período de incubação é de 24 a 48 horas e a replicação viral ocorre na mucosa do septo nasal, dos cornetos, da nasofaringe e das tonsilas^[6,4,3]. Períodos intermitentes de excreção viral (uma a duas semanas) podem ocorrer principalmente após situações de estresse, como parto, feiras, *cat shows*, mudanças de local, propiciando o contato dos filhotes com o vírus. O desenvolvimento ou não de sinais clínicos pelos filhotes depende diretamente do título de anticorpos recebidos via colostrum^[4].

b) Sinais clínicos

Clinicamente, a infecção é caracterizada por espirros intermitentes, que aumentam de intensidade e frequência por 3 a 5 dias. Febre, descarga nasal e ocular (serosa ou mucopurulenta), conjuntivite e depressão podem estar presentes. Com a progressão da doença, as narinas podem ficar obstruídas e as pálpebras, aderentes juntamente com alopecia ao redor dos olhos e do nariz. A ceratite herpética é exclusivamente associada ao FeHV-1, e caracteriza-se por úlceras de córnea do tipo dendríticas lineares. Ulcerações orais são pouco frequentes, e podem ser acompanhadas de hipersalivação, desidratação, anorexia e desnutrição^[2]. A infecção pelo FeHV-1 pode ser agrava-

da pela presença de infecções secundárias, principalmente pela bactéria *Chlamydophila felis*^[2,3]. A infecção é mais grave em filhotes com até quatro semanas de idade, e casos agravados por broncopneumonia podem ser fatais^[6]. Gatos que se recuperam da infecção aguda possuem o vírus latente e, em condições de estresse, podem reativar e excretar o vírus na secreção nasal, favorecendo a transmissão do vírus a outros felinos suscetíveis, principalmente em gatis, abrigos e locais de criação de grande número de gatos. A recrudescência da infecção latente é caracterizada por úlceras de córnea, ceratite e sinais respiratórios mais leves e menos frequentes que os da infecção aguda^[6,2]. Infecções concomitantes com o FCV são comuns e, geralmente, são mais severas.

c) Patologia

Achados de necropsia incluem necrose multifocal do epitélio da cavidade nasal, faringe, epiglote, tonsilas, laringe, traqueia e, em casos mais graves, broncopneumonia. Infiltrado neutrófílico com exsudato e fibrina também podem ser observados. Inclusões intranucleares podem estar presentes no início da infecção, quando a morte do animal ocorre de 7 a 9 dias após a infecção^[4,6].

d) Diagnóstico laboratorial

A confirmação do diagnóstico clínico pode ser realizada pela colheita de secreção nasal, orofaríngea ou ocular de gatos com sinais clínicos e tecidos como a mucosa nasal, ocular e faríngea de animais que morreram em decorrência da doença para isolamento viral. Para isolamento do FeHV-1, utilizam-se células de linhagem ou células primárias de origem felina^[1,3]. Amostras de fígado, baço, região faríngea, palato mole, tonsilas e cavidade nasal também podem ser submetidos à tentativa de isolamento viral, no entanto esse vírus não é isolado de animais com infecção latente. Em alguns casos, foi possível a detecção do FeHV-1 no gânglio trigêmeo^[1].

Técnicas como imunofluorescência e imunoperoxidase também podem ser empregadas para o diagnóstico da infecção, principalmente para confirmar a etiologia de casos em que foi possível o isolamento de vírus, diferenciando o FeHV-1 do FCV^[3]. O DNA do vírus pode ser detectado por PCR em tecidos como trigêmeo, nervo óptico, bulbo olfatório e córnea colhidos na necropsia, tanto de animais com infecção aguda como latente. Em um estudo, o DNA viral foi detectado com maior frequência no gânglio trigêmeo, no nervo óptico, no bulbo olfatório e na córnea, e com menor frequência nas glândulas salivares e lacrimais, no cerebelo e na conjuntiva de gatos infectados. Tecidos como traqueia, córtex cerebral, timo, pulmão, fígado, baço, rins e células mononucleares periféricas foram negativos^[7]. Imunoprecipitação² e imunoblot² com anticorpos monoclonais também podem ser utilizados para a identificação do vírus^[5].

A sorologia pareada pode ser empregada para o diagnóstico da infecção aguda, ou ativa, demonstrando soroconversão pela técnica de soroneutralização^[1].

e) Diagnóstico diferencial

A infecção pelo FeHV-1 deve ser diferenciada da infecção por outros agentes que produzem doença respiratória. Na Tabela 1 se observam as principais características clínicas das infecções respiratórias mais comuns de felinos.

² Método de diagnóstico imunológico.

Tabela 1. Características da doença clínica produzida por patógenos do trato respiratório

Sinal clínico	FeHV-1 ¹	FCV	Bb	Chf
Letargia	+++ ²	+	+	+
Espirros	+++	+	++	+
Conjuntivite	++	+	-	++ ³
Hipersalivação	++	(+) ⁴	-	-
Descarga ocular	+++	+	(+)	+++
Descarga nasal	+++	+	++	+
Ulceração oral	(+)	+++	-	-
Ceratite	+	-	-	-
Tosse	(+)	-	++	-
Pneumonia	(+)	(+)	+	+/-
Claudicação	-	+	-	-

¹ FeHV-1: herpesvírus felino tipo 1; FCV: Calicivírus felino; Bb: *Bordetella bronchiseptica*; Chf: *Chlamydophila felis*.

² +++: acentuada; ++: moderada; + leve; (+): pouco comum; +/-: subclínica; -: ausente.

³ Geralmente persistente.

⁴ Pode ser observada quando o animal apresenta úlceras orais.

Fonte: Adaptado de GASKELL et al. (2006)^[4].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O herpesvírus felino geralmente é excretado por um período de 10 a 14 dias após a infecção. Esse período deve ser levado em consideração para a colheita de amostras como secreção nasal, ocular ou orofaríngea com o auxílio de suabes e meio de transporte. Soro sem o coágulo sanguíneo para sorologia e sangue total com anticoagulante (para separação da capa flogística), tecidos como mucosa nasal, ocular e faríngea, glândulas salivares e lacrimais, fígado, baço, rins, traqueia, pulmão, tonsilas, trigêmeo, nervo óptico, bulbo olfatório, conjuntiva e córnea também podem ser colhidos na necropsia e enviados refrigerados em poucas horas ao laboratório de virologia, ou congelados e acompanhados de gelo seco ou reciclável se for necessário um período maior que 24 horas, em caixa isotérmica^[1], lembrando que amostras para histologia não devem ser congeladas, podendo ser fixadas em formol a 10% e enviadas em temperatura ambiente.

Referências bibliográficas

1. BALDWIN, C.A. Feline Viral Rhinotracheitis. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**: a practitioner's guide. St Louis: Mosby year book, 1992. p. 189-191.
2. FORD, R.B. Feline viral upper respiratory disease: herpesvirus and calicivirus. **Proceedings: 30 world congress of the world small animal veterinary association**, Cidade do México, 2005.
3. FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 433-485. Cap. 17.
4. GASKELL, R.M.; DAWSON, S.; RADFORD, A. Feline Respiratory Disease. In: GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 16, p. 145-154.

5. HORIMOTO, T. et al. Feline herpesvirus type 1 glycoproteins eliciting virus neutralizing and hemagglutination-inhibiting antibodies. **Archives of Virology**, v. 111, n. 1-2, p. 127-132, 1990.
6. MURPHY, F.A. et al. Herpesviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap. 18, p. 301-326.
7. REUBEL, G.H. et al. Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infections using the polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, v. 132, n. 3-4, p. 409-420, 1993.
8. THIRY, E. et al. Feline herpesvirus infection. Abcd guidelines on prevention and management. **J. Feline. Med. Surg.** v. 11, n. 7, p. 547-55, 2009.

2.3 Coronavírus entérico felino e peritonite infecciosa felina

Conceito

O coronavírus entérico felino (FCoV) geralmente produz infecção entérica leve e localizada em felinos, que pode ser inaparente. Já a peritonite infecciosa felina (FIP) é uma doença crônica, sistêmica e debilitante de felinos que se constitui na maior causa de mortalidade de felinos por doença viral^[1].

Etiologia e Patogênese

O coronavírus felino (FCoV) é classificado na família *Coronaviridae* e possui dois biotipos. O biotipo mais frequente é o coronavírus entérico felino (FECV), que produz doença entérica leve em felinos. Porém o segundo biotipo, o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), é responsável pela FIP, uma doença grave e fatal, de ocorrência rara em gatos criados sozinhos, apresentando maior frequência em gatos de raças puras e em abrigos^[7,9]. Acredita-se que a FIP ocorra em decorrência de mutações do FECV^[9,11]. Se essa hipótese de que mutações no FECV originam o FIPV for correta, é possível que cada caso de FIP seja produzido por um vírus geneticamente distinto.

Os vírions do FCoV são relativamente grandes, envelopados e possuem uma fita de RNA com polaridade positiva como genoma. O coronavírus felino pertence ao grupo I dos coronavírus, mesmo grupo em que são classificados o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), o coronavírus respiratório suíno e o coronavírus canino (CCoV)^[6,7].

Diagnóstico

Clinicamente, as infecções pelo FCoV podem ser confundidas com outras doenças de felinos por apresentarem sinais muito variáveis. A forma efusiva da FIP pode ser evidenciada pela presença de ascite ou hidrotórax em gatos com perda de peso, sinais oculares ou neurológicos, massas palpáveis nos rins, linfonodos mesentéricos, fígado e ceco. No hemograma, os animais com FIP podem apresentar leucocitose com linfopenia e neutrofilia, anemia, hiperfibrinogenia e hipergamaglobulinemia^[9]. Acredita-se atualmente que todos os isolados de FCoV podem produzir FIP em decorrência de mutações, porém estima-se que elas ocorram somente em 10% dos casos de infecção pelo FCoV^[11]. No entanto, os fatores que levam à ocorrência das mutações (deleções e mutações *nonsense*) que originam o FIPV a partir do FCoV e a consequente alteração no tropismo celular (de enterócitos para macrófagos) resultando em FIP são pouco conhecidos.

a) Epidemiologia

A infecção pelo FCoV apresenta distribuição mundial e, no Brasil, as doenças produzidas por ele são bem documentadas. A transmissão ocorre pela rota fecal-oral, sendo as fezes a principal fonte de vírus para gatos suscetíveis. Animais saudáveis, porém infectados, também podem excretar o vírus nas fezes por períodos prolongados, favorecendo a transmissão^[7].

Os gatos ingerem ou, possivelmente, inalam o FCoV, que infecta células do epitélio intestinal. No início da infecção, acredita-se que o vírus possa replicar-se na orofaringe e nas tonsilas, sendo excretado na saliva por poucas horas ou dias. No entanto, a excreção viral ocorre principalmente pelas fezes. Os mecanismos envolvidos na disseminação sistêmica do FCoV, com consequente alteração ou ampliação do tropismo para monócitos e macrófagos são pouco conhecidos, porém gatos que não possuem anticorpos contra o FCoV não desenvolvem FIP.

b) Sinais clínicos

A maioria das infecções pelo FCoV é inaparente, ou subclínica. Sinais respiratórios ou ainda diarreia, vômito e perda de peso relacionada à má absorção de nutrientes podem ser relatados^[6,1,7].

A FIP é caracterizada por debilidade progressiva, com perda de peso acentuada, anorexia, febre e letargia^[7]. Essa doença é classificada em três formas clínicas: a forma clássica ou efusiva, a seca ou não efusiva, e uma terceira que combina ambas^[6,7].

Inicialmente, podem-se observar sinais de doença respiratória leve em gatos com FIP. Porém, com o aumento da permeabilidade vascular, pode ocorrer acúmulo de líquido rico em proteínas nas cavidades torácica e abdominal, além do pericárdio, do escroto e dos espaços subcapsulares renais. Gatos com a forma efusiva podem apresentar dificuldade respiratória e aumento de volume nos locais de deposição de líquidos. Outros sinais relatados incluem uveíte anterior, irite, coriorretinite, edema de córnea, descolamento de retina, ataxia, convulsões, paresia, hiperestesia, incontinência urinária, entre outros, como hepatopatia e insuficiência pancreática^[2]. Acredita-se que a presença de anticorpos anticoronavírus no soro do animal pode contribuir para o agravamento da infecção, pois eles permitiriam uma maior eficiência na infecção dos macrófagos pelo mecanismo de ADE (*antibody-dependent enhancement of infection*). Nesse mecanismo, anticorpos não neutralizantes contra proteínas de superfície do vírus se ligariam ao receptor Fc na superfície de macrófagos, através de sua porção Fc, e serviriam de ponte para o FIPV infectar os macrófagos.

Podem, ainda, ocorrer depósitos de complexos imunológicos nas paredes dos vasos sanguíneos de gatos infectados que possuem anticorpos. Com isso, há ativação da cascata do complemento e da coagulação sanguínea, liberação de citocinas e atração de leucócitos polimorfonucleares, potencializando o processo inflamatório e a necrose^[2]. Esses fatores têm limitado o desenvolvimento de vacinas contra essa doença^[7]. Apesar da demonstração de complexo antígeno-anticorpo na circulação de gatos com FIP, esta seria uma doença autoimune atípica, pois raramente ocorre envolvimento das articulações e da pele dos gatos^[1].

c) Patologia

Na necropsia ou biópsia intestinal de casos suspeitos de infecção pelo FECV pode-se observar ulceração, achatamento e fusão das vilosidades intestinais, porém esses achados são considerados inespecíficos^[1]. Pode-se evidenciar, ainda, serosite fibrinosa, placas esbranquiçadas, aderências, espessamento do mesentério e do omento, e linfadenopatia^[2]. Histologicamente, a FIP é uma inflamação piogranulomatosa localizada ao redor dos vasos, onde se observa vasculite, caracterizada por uma área de necrose envolta por infiltrado de células mononucleares, macrófagos

e linfócitos e neutrófilos^[8,1]. O cólon de gatos com FIP pode apresentar-se espesso, com aparência semelhante ao linfossarcoma alimentar^[1].

d) Diagnóstico laboratorial

A suspeita clínica de infecção pelo FCoV pode ser confirmada por meio de testes laboratoriais. A detecção de antígenos virais por imunofluorescência pode ser realizada em amostras de sangue, na capa flogística e em células da efusão abdominal, demonstrando os macrófagos infectados pelo FIPV^[5,1]. Amostras de epitélio intestinal também podem ser submetidas à imunofluorescência e à imuno-histoquímica para o diagnóstico do FECV^[1].

A análise do líquido depositado nas cavidades torácica e peritoneal, colhidos por toracocentese ou abdominocentese, respectivamente, pode ser realizada. Esse líquido é viscoso, possui coloração amarelo-palha, níveis aumentados de proteína, sangue e filamentos de fibrina, além de células inflamatórias, como neutrófilos, linfócitos e macrófagos. A efusão na FIP é classificada como transudato modificado, em que o conteúdo de proteína é elevado ($> 3,5\text{g/dl}$), com um número de células nucleadas inferior a 5.000/ml. Biópsias ou aspirados de órgãos e tecidos suspeitos de granuloma podem ser colhidos para histologia. Para isso, é necessário que se descarte a existência de coagulação intravascular disseminada^[9,1]. A glicoproteína $\alpha 1$ -ácida (AGP) é uma proteína de fase aguda que pode estar aumentada em processos inflamatórios e infecciosos, podendo ser mensurada por radioimunodifusão ou pelo teste imunoturbidimétrico rápido no soro ou fluido peritoneal de gatos, podendo auxiliar no diagnóstico da FIP^[3].

Até pouco tempo atrás, a confirmação da FIP somente era possível por meio de análises histológicas. O desenvolvimento de técnicas moleculares, como a RT-PCR, tem fornecido alternativas para o diagnóstico da doença, apresentando como vantagem a sensibilidade e a possibilidade de detecção do FCoV em amostras de sangue^[5,4].

Testes sorológicos podem auxiliar na confirmação da suspeita da infecção, uma vez que não existem vacinas disponíveis contra esses vírus. Para isso, podem ser aplicadas as técnicas de imunofluorescência e ELISA, demonstrando títulos de moderados a altos de anticorpos no soro^[6,7]. No entanto, muitos gatos infectados permanecem soronegativos ou apresentam títulos muito baixos de anticorpos, enquanto felinos saudáveis podem possuir altos títulos de anticorpos no soro^[6]. Além disso, não é possível determinar por técnicas sorológicas se ocorreu somente a infecção com o FECV ou se o FIPV foi originado^[9]. Portanto, sorologia positiva é indicativa de exposição prévia a um coronavírus, devendo ser interpretada com cautela.

e) Diagnóstico diferencial

A infecção entérica pelo FCoV pode ser confundida com outras infecções e enfermidades que produzem diarreia, vômito e sinais respiratórios.

A forma efusiva da FIP pode ser confundida com tumores que produzem a deposição de líquidos cavitários, como neoplasias de fígado e colangite linfocítica, além de cardiomiopatias. A principal causa de peritonite em felinos é a perfuração intestinal. Exames como citologia, ultrassonografia e radiografias podem ser úteis no diagnóstico diferencial^[1].

A forma não efusiva da FIP produz lesões oculares que podem ser confundidas com as produzidas nas infecções por toxoplasma, pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), pelo vírus da leucemia felina (FeLV) e por infecções fúngicas sistêmicas. Sinais neurológicos são observados em 25% a 33% dos gatos com FIP não efusiva. Os mais comuns são ataxia, convulsões e nistagmo, além de sinais relacionados à meningite. Entre os gatos com sinais neurológicos, 75% apresentam hidrocefalia, uma forma de diferenciar a doença da criptococose, da toxoplasmose e da presença de linfomas, que não têm sido relatados como causa de hidrocefalia^[1].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de sangue com anticoagulante (preferencialmente EDTA) podem ser colhidas e enviadas refrigeradas (entre 4 e 25°C) dentro de 24 horas para o laboratório. Amostras de soro devem ser separadas do coágulo e acondicionadas em frascos estéreis. Amostras biológicas devem ser acondicionadas em caixas isotérmicas e enviadas ao laboratório de virologia. Sangue total e fluido peritoneal também podem ser colhidos e enviados ao laboratório de análises clínicas.

Biópsias ou aspirados de órgãos e tecidos suspeitos de granuloma podem ser colhidos para histologia ou para detecção do material genético do vírus por RT-PCR. Essas amostras podem ser transportadas em caixas isotérmicas, refrigeradas ou, preferencialmente, congeladas para o laboratório de virologia, e fragmentos de órgãos e tecidos fixados em formol 10% ou tamponado, de acordo com a técnica a ser empregada, enviados em temperatura ambiente para a patologia.

Referências bibliográficas

1. ADDIE, D.D.; JARRET, O. Feline Coronavirus infections In: GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 11, p. 88-102.
2. BARR, M.C. et al. Moléstias virais felinas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-631.
3. BENCE, L.M. et al. An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. **Vet Clin Pathol.**, v. 34, n. 4, p. 335-341, 2005.
4. CAN-SAHNA, K. et al. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. **J. Feline Med. Surg.**, v. 9, n. 5, p. 369-372, 2007.
5. HARTMANN, K. et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 17, n. 6, p. 781-790, 2003.
6. MURPHY, F.A. et al. Coronaviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic Press, 1999, p. 495-516.
7. LOVATO, L.T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007, p. 615-640. Cap. 24.
8. OLIVEIRA, F.N. et al. Peritonite infecciosa felina: 13 casos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 905-911, 2003.
9. PEDERSEN, N.C. Feline infectious peritonitis. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**: – a practitioner's guide. St Louis: Mosby year book, 1992. p. 183-186.

2.4 Panleucopenia felina

Conceito

A panleucopenia felina (FLP) é considerada a principal doença viral felina. Ela é produzida por um parvovírus que necessita de células em divisão para replicar-se. Portanto, a ocorrência das diferentes manifestações clínicas da doença depende da idade do animal infectado, e estão relacionadas à presença de células em mitose nos tecidos.

Etiologia e Patogênese

A FLP é produzida por um membro da família *Parvoviridae*, que possui fita simples de DNA como genoma, é pequeno e não envelopado, resistente a condições ambientais diversas e

sobrevive por longos períodos na presença de matéria orgânica e em temperatura ambiente^[4,2,3]. Outra característica do parvovírus é a replicação exclusiva em células em mitose^[4]. Esse vírus é resistente a solventes orgânicos, componentes de amônia quaternária, diluições de iodo orgânico, fenólico e álcool 70% e a variações de temperatura. Porém é susceptível ao hipoclorito de sódio a 6%, ao formaldeído 4% e ao glutaraldeído 1%^[5,2,3]. A doença recebe esse nome por conta ao tropismo do vírus, que infecta células da linhagem hematopoiética, produzindo a lise de leucócitos. O vírus da panleucopenia felina (FLPV) é semelhante ao parvovírus canino (CPV-2). A infecção de felinos com amostras de CPV-2 resulta em doença idêntica à FLP^[3].

Diagnóstico

Suspeita-se de infecção pelo FLPV quando, além do quadro de sinais clínicos relacionados ao trato digestório, se observa intensa leucopenia no hemograma em 3 a 7 dias após a infecção^[5,1,3]. As fezes apresentam-se líquidas e podem conter sangue. Anemia pode ser observada em alguns casos, porém o hematócrito não possui valor para o diagnóstico da infecção pelo FLPV^[5].

a) Epidemiologia

O FLPV apresenta distribuição mundial, e é um vírus altamente contagioso que sobrevive por longos períodos no ambiente. A doença é mais comum e severa em gatos jovens, com 3 a 5 meses de idade, fase em que ocorre o declínio da imunidade passiva^[1]. A transmissão do vírus ocorre pela rota fecal-oral, por contato direto ou indireto com animais infectados e suas secreções, ocorrendo também transmissão transplacentária. O vírus é excretado em altos títulos nas fezes, usualmente por uma a duas semanas, porém existem relatos de excreção do FPLV por até seis semanas nas fezes. Esse vírus pode estar presente em outras secreções e excreções, como a urina^[5,2,3].

O período de incubação da FLP é de 4 a 10 dias, e a evolução dos sinais clínicos é rápida. Animais infectados que sobrevivem aos primeiros 5 dias da doença frequentemente apresentam recuperação clínica^[4,1,3].

b) Sinais clínicos

A panleucopenia felina tem um curso agudo e clinicamente pode ser caracterizada por infecção entérica, choque e hipotermia, que antecedem a morte. A forma mais comum da doença é caracterizada pelo surgimento súbito de depressão, hipertermia, anorexia, vômito, descarga nasal e desidratação, além de diarreia, que pode ser sanguinolenta. Infecções subclínicas podem ocorrer em gatos mais velhos, e as maiores taxas de morbidade e mortalidade ocorrem entre 3 e 5 meses de idade. Morte súbita neonatal pode ocorrer em filhotes com duas semanas a 12 meses de idade, e os animais que não desenvolvem complicações fatais nos 5 primeiros dias da doença se recuperam em algumas semanas^[2]. Petéquias e equimoses podem ser observadas em animais com coagulação intravascular disseminada^[3]. A infecção de fêmeas prenhas pode resultar em reabsorção fetal, aborto, fetos mumificados, atrofia do nervo óptico, retinopatia e hidrocefalia, ou ainda no nascimento de filhotes fracos, com depleção linfoide e hipoplasia cerebelar^[2]. Devido à vacinação e à alta prevalência de anticorpos contra o agente nas mães, a infecção transplacentária e o nascimento de filhotes com hipoplasia cerebelar têm ocorrido com menor frequência^[5,4,1,3]. Na Tabela 2 é apresentada uma relação entre idade e as síndromes desenvolvidas pelos animais infectados pelo FLPV.

Tabela 2. Síndromes relatadas em felinos em consequência da infecção pelo vírus da panleucopenia felina (FLPV) e idade de ocorrência.

Síndrome	Idade
Infecção neonatal:	
- Infertilidade, reabsorção e morte fetal	Início da gestação
- Aborto, fetos mumificados	Meio da gestação
- Atrofia do nervo óptico, retinopatia, hidrocefalia	Final da gestação
Doença neonatal generalizada	2 a 12 dias de vida
Hipoplásia cerebelar	2 sem. antes a 4 sem. após o nasc.
Enterite e panleucopenia	1 a 4 meses de vida
Enterite	4 a 12 meses de vida

Fonte: Adaptado de Greene e Addie (2006)^[2] e Parrish (1992)^[5].

c) Patologia

Geralmente, as alterações macroscópicas em gatos infectados naturalmente são mínimas. Observa-se dilatação e hiperemia no intestino, que pode estar firme, com petéquias e equimoses na superfície serosa e com conteúdo fétido pela presença de sangue^[2].

Desidratação e emaciação, enterite aguda, linfonodos mesentéricos e baço aumentado de tamanho, aplasia de medula óssea, erosões e petéquias na mucosa, atrofia das vilosidades do intestino, dilatação e muco nas criptas intestinais são achados frequentes na histologia^[1]. A infiltração de células na mucosa é considerada leve, pela ausência de leucócitos e, quando ocorre, há uma predominância de linfócitos T. Na medula óssea, observa-se redução no número de células. Depleção linfoides nos linfonodos, no baço e nas placas de Peyer, e atrofia linfoide com hiperplasia mononuclear fagocítica também podem ser observadas^[2]. Nos filhotes com ataxia, pode-se observar hipoplásia cerebelar, hidrocefalia, dilatação dos ventrículos, lise das células ependimais, redução granular e da população de células de Purkinje, indicativos de degeneração cerebelar, malacia da substância branca subcortical e degeneração da mielina na medula espinhal. E, também, inclusões intranucleares eosinofílicas podem ser detectadas nos tecidos em que ocorreu replicação viral^[5,2].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo FLPV pode ser realizado pela identificação do vírus nas fezes ou no sangue, ou, ainda, em tecidos colhidos na necropsia. Nas fezes, podem-se detectar as partículas víricas do FLPV por microscopia eletrônica, hemaglutinação, ELISA, imunofluorescência, imuno-histoquímica ou isolamento viral. Na técnica de isolamento, podem-se utilizar células de linhagem CRFK ou células primárias de felinos. Para hemaglutinação, utilizam-se hemácias de suínos ou de macacos Rhesus. Existem kits de ELISA práticos para uso nas clínicas e consultórios para a detecção de抗ígenos nas fezes^[4,1,2,3]. O DNA do vírus também pode ser detectado por PCR em tecidos e secreções^[4,7] e por hibridização *in situ* em tecidos de animais infectados^[6].

No hemograma, verifica-se leucopenia (contagem entre 50 e 3000 células/ μ L, casos moderados entre 3.000 e 7.000 células/ μ L), uma redução na contagem de reticulócitos entre 5% e 10%, porém anemia é um achado pouco comum. Trombocitopenia pode ser observada em associação com a leucopenia, resultando da lesão na medula óssea. Achados bioquímicos não específicos que refletem envolvimento hepático incluem aumento na alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina. Azotemia pode estar presente por causas pré-renais, como desidratação^[2].

A sorologia pode ser realizada por meio de inibição da hemaglutinação, ELISA, soroneutralização e imunofluorescência indireta^[5]. Porém, a detecção de anticorpos somente auxilia no diagnóstico de infecção recente quando realizada em amostras pareadas de soro demonstrando soroconversão, ou ainda pela aplicação de testes de ELISA para detecção de IgM^[3]. A infecção natural pelo FLPV resulta na produção de altos títulos de anticorpos, que podem ser detectados 7 dias após a infecção^[5,2].

e) Diagnóstico diferencial

Existem poucas doenças que podem ser confundidas com a forma mais severa da doença, geralmente presente em filhotes. A salmonelose felina acompanhada de septicemia pode ser confundida com a panleucopenia felina pela presença de leucopenia e doença gastrointestinal aguda. A Doença de Tyzzer, produzida pelo *Bacillus piriformis*, é caracterizada por sinais clínicos idênticos aos da FLP. Campilobacteriose, giardíase, coccidiose (isospororose, toxoplasmose, criptosporidiose) e a presença de nematódeos como *Toxocara cati*, *Toxascaris leonina* e *Ancylostoma tubaeforme* também produzem doença gastrointestinal, porém mais branda que a panleucopenia felina. Cultura fecal e exame parasitológico podem auxiliar no diagnóstico diferencial.

A presença de anemia não é comum em casos de FPL, exceto quando há perda intensa de sangue pelas fezes. Nesses casos, a presença de anemia e leucopenia pode levar à suspeita de infecção pelo FeLV. Outras enfermidades que produzem trombocitopenia e distúrbios de coagulação que podem ser acompanhadas de coagulação intravascular disseminada também devem ser consideradas para o diagnóstico da panleucopenia felina^[2].

Outras causas de diarreia incluem corpos estranhos, intussuscepção, hipertireoidismo e outras causas metabólicas, intolerância ou alergia a determinados alimentos, neoplasias, doença intestinal inflamatória idiopática, ingestão de plantas tóxicas, metais, organofosfatos, piretrinas, fármacos, como antibióticos, e causas idiopáticas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de fezes, sangue total com anticoagulante, tecidos como linfonodos mesentéricos, intestino delgado, timo e baço, fetos abortados e encéfalo de filhotes com sinais de ataxia podem ser submetidos ao laboratório de virologia, acondicionados em embalagens limpas, estéreis e caixas isotérmicas, adicionando-se gelo reciclável para conservação das amostras^[5,1]. O período entre a colheita da amostra e a chegada ao laboratório influencia diretamente na detecção do vírus nas amostras clínicas. Portanto, quanto menor o tempo decorrido, maior a chance de se realizar um diagnóstico preciso.

Referências bibliográficas

1. CARTER, G.R.; WISE, D.J. Parvoviridae In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, 2005. Disponível em: <www.ivis.org>, Acesso em: 10 set. 2009.
2. GREENE, C.E.; ADDIE, D.D. Feline Parvovirus Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 10, p. 78-88.
3. MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. Parvoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, cap. 14, p. 377-396, 2007.
4. MURPHY, F.A. et al. Parvoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic, 1999, p. 343-356.
5. PARRISH, C.R. Panleukopenia. In: CASTRO, A.E., HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology. A practitioner's guide**. 1. ed. St Louis: Mosby Year Book, 1992, p. 194-197.

6. STEINEL, A. et al. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. **Journal General Virology**, v. 81, p. 345-350, 2000.
7. SCHAUDIEN, D. et al. Concurrent Infection of a Cat with Cowpox Virus and Feline Parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 2-3, p. 151-154, 2007.

2.5 Imunodeficiência felina

O vírus da imunodeficiência felina produz uma síndrome de imunodeficiência semelhante àquela apresentada por humanos infectados com o vírus da aids (HIV). Esse agente possui uma ampla distribuição, e a infecção tem sido relatada em vários Estados do Brasil.

Etiologia e Patogênese

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) possui distribuição mundial, pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. Isolados de FIV são classificados de acordo com a diversidade genética na região V3-V5 do gene *env* em cinco genótipos (A, B, C, D e E). Conforme demonstrado por estudos sorológicos, gatos infectados podem albergar diferentes subtipos^[8]. Esse vírus produz depleção de linfócitos T e, consequentemente, imunossupressão em gatos infectados^[7,2,4]. Além de linfócitos, esse vírus pode infectar monócitos, macrófagos, células dendríticas foliculares, células epiteliais do timo, encéfalo e da glândula salivar, fibroblastos da medula óssea, megacariócitos, células da micróglia e astrócitos^[8].

Diagnóstico

A infecção pelo FIV geralmente é inaparente ou caracterizada por sinais inespecíficos. Suspeita-se de infecção pelo FIV principalmente em gatos com infecções crônicas ou recorrentes na cavidade oral, no trato respiratório, na pele, entre outras.

a) Epidemiologia

Esse vírus é transmitido por contato direto com saliva de gatos infectados, principalmente durante brigas. A principal forma de transmissão entre gatos é a mordedura. Portanto, gatos de rua, mais velhos e machos representam a maior população de risco^[8]. A ocorrência da infecção é maior em gatos com mais de 1 ano de idade; os machos se infectam com maior frequência que as fêmeas devido ao seu comportamento mais agressivo. O vírus pode ser excretado ainda no sêmen e no leite, além da saliva^[7].

b) Sinais clínicos

As manifestações clínicas associadas ao FIV podem persistir por semanas, meses ou anos (Tabela 3). Também, os sinais de progressão da doença podem ser divididos em estágios^[7,6]. O estágio transitório da doença ocorre entre quatro e oito semanas após a infecção, com duração de uma a quatro semanas, sendo caracterizado por febre, depressão, leucopenia, diarreia e linfadenopatia. Menos de 10% dos gatos morrem nessa fase. Os gatos permanecem virêmicos por toda a vida, e no estágio secundário da doença a infecção é inaparente, ou subclínica, permanecendo assim por meses ou anos até que se desenvolva o estágio terminal da doença, semelhante à aids em humanos (HIV). Doenças imunológicas, como anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia autoimune e artrite têm sido relatadas em gatos infectados pelo FIV, assim como infecções oportunistas por vírus, bactérias, fungos e protozoários^[6,8].

Tabela 3. Manifestações clínicas associadas à infecção pelo FIV.

	Infecção aguda	Infecção subclínica	Complexo semelhante à aids	Aids felina
Sinais Clínicos	Febre, linfadenopatia, diarreia, infecções respiratórias secundárias	Inaparente	Linfadenopatia, febre, anorexia, perda de peso, caquexia, infecções secundárias crônicas (mucosa oral, pele, intestino e tratos respiratório superior e urinário)	Infecções crônicas graves, tumores, emaciação

Fonte: Adaptado de Barr, et al. (1995)^[1]; Pedersen, (1992)^[6] e Ravazzolo, et al. (2007)^[7].

c) Patologia

Na histopatologia, pode-se observar hiperplasia folicular e áreas de depleção linfoide no tecido linfoide associado às mucosas (MALT), nos linfonodos, no timo e na medula óssea^[7,1]. Linfadenopatia generalizada, hiperplasia folicular acentuada, centros foliculares hiperativos, plasmocitose medular e proliferação interfolicular foram relatados em gatos infectados experimentalmente com o FIV^[5].

d) Diagnóstico laboratorial

Alterações hematológicas frequentemente observadas em gatos infectados são: anemia, linfopenia, neutropenia e hipergamaglobulinemia^[1]. O isolamento viral pode ser realizado em células de origem linfoide, como células primárias mononucleares do sangue periférico e a linhagem MYA-1, de células linfoblastoides T felinas, dependentes de interleucina 2^[3].

A detecção de抗ígenos do FIV no sangue total por meio de *kits* de ELISA pode ser realizada no ambulatório^[7]. Sangue total também pode ser enviado refrigerado para a amplificação do DNA proviral por PCR, extraído de leucócitos do sangue periférico de gatos persistentemente infectados^[4].

Anticorpos contra o vírus podem ser detectados no soro dos gatos após duas a quatro semanas da infecção por ELISA, imunofluorescência e *Western blot*^[4]. Animais com testes negativos devem ser retestados após oito semanas para a confirmação do resultado^[7]. Testes de ELISA disponíveis podem apresentar resultados falso-positivos em 2% a 20% dos casos^[4]. Como a infecção por esse vírus persiste por toda a vida do animal, é provável que o resultado sorológico positivo seja confirmatório de infecção, principalmente em áreas onde não são utilizadas vacinas contra o FIV.

e) Diagnóstico diferencial

A infecção pelo FIV deve ser diferenciada da infecção pelo vírus da leucemia felina. Por produzir imunossupressão, várias infecções secundárias ou concomitantes ocorrem, dificultando o diagnóstico da infecção, que, na maioria dos casos, é inaparente. A presença de neoplasias como linfoma e leucemia em gatos infectados pelo FIV é razão comum para o proprietário procurar auxílio veterinário^[8].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a confirmação do diagnóstico, colhe-se sangue total ou soro para a realização de diferentes técnicas. O FIV pode ainda ser detectado em órgãos linfoides, nos pulmões, nos rins, no fígado e no plexo coroide^[7].

Referências bibliográficas

1. BARR, M.C. et al. Moléstias virais felinas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-631.
2. DUARTE, A. et al. Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1061-1070, 2002.
3. MIYAZAWA, T. et al. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 108, n. 1-2, p. 131-135, 1989.
4. MURPHY, F.A. et al. Retroviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic Press, 1999, p. 301-326.
5. PARODI, A.L. et al. Histopathological changes in lymph nodes of cats experimentally infected with the feline immunodeficiency virus (FIV). **Journal of Comparative Pathology**, v. 111, n. 2, p. 165-174, 1994.
6. PEDERSEN, N.C. Feline immunodeficiency vírus. In: CASTRO, A.. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**: - a practitioner's guide. St Louis: Mosby year book, 1992. p. 183-186.
7. RAVAZZOLO, A.P.; COSTA, U. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 773-808. Cap. 30.
8. SELLON, R.K.; HARTMANN, K. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier. Cap 14, p. 131-143.

2.6 Leucemia felina

Conceito

A leucemia felina foi descrita inicialmente em 1964 por William Jarrett e colaboradores, que observaram o brotamento de partículas víricas na membrana de linfoblastos de um gato com linfoma. A transmissão experimental da neoplasia linfocítica foi demonstrada, porém a identificação do agente etiológico somente foi realizada anos depois. A infecção pelo FeLV apresenta distribuição mundial, e tem como característica produzir uma gama de manifestações clínicas em felinos^[4].

Etiologia e Patogênese

O vírus da leucemia felina é um membro da família *Retroviridae*, gênero *Gammaretrovirus*. Esse vírus possui duas moléculas idênticas de RNA fita simples como genoma, é envelopado e replica-se em células da medula óssea, da glândula salivar e do epitélio respiratório. Cópias de DNA do genoma chamadas de provírus são inseridas no DNA das células do hospedeiro, permitindo a persistência do vírus no organismo por toda a vida do animal infectado^[4,7]. Embora esse vírus não possua sorotipos, amostras do FeLV são classificadas em subgrupos: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T^[9,10]. Entre esses subgrupos, considera-se que somente o subgrupo A é transmitido entre gatos. Os subgrupos B e C seriam gerados por mutações e recombinação do FeLV-A com genes celulares ou de retrovírus endógenos, presentes no genoma de felinos. Acredita-se, ainda, que o vírus do sarcoma felino (FeSV) seja resultante da recombinação entre o FeLV-A e proto-oncogenes celulares, replicando-se somente na presença do FeLV^[4]. Essa divisão é baseada na variabilidade genética e antigênica desse vírus, e possui implicância no tropismo e na patogenia

dos isolados, bem como no diagnóstico da infecção. A frequência de isolamento do FeLV varia entre 100% dos casos para o subgrupo A, 50% dos gatos com linfoma para o subgrupo B e é rara para o subgrupo C. O subgrupo T recebe esse nome por seu tropismo por linfócitos T. Ele produz imunossupressão, porém dados sobre sua ocorrência são escassos^[4].

Diagnóstico

O desenvolvimento da doença produzida pela infecção com o FeLV varia entre os gatos, dependendo do(s) subgrupo(s) do vírus presente, da patogenicidade da cepa, da carga viral, da idade e da resposta imune do animal^[4]. Alguns animais apresentam remissão, outros desenvolvem infecção latente, outros têm viremia transiente ou ainda viremia contínua, e o desenvolvimento ou não das manifestações clínicas varia conforme fatores inerentes ao vírus e ao hospedeiro.

a) Epidemiologia

A transmissão do FeLV ocorre por contato direto com saliva de gatos infectados, podendo ocorrer ainda por sangue ou contato indireto com objetos contaminados com sangue ou saliva^[1,11]. A principal via de transmissão é o contato com saliva, na qual os títulos virais são maiores do que no plasma de animais infectados^[4]. A transmissão vertical já foi relatada^[11], e o vírus pode ainda ser encontrado no leite, na urina, nas fezes e na lágrima, embora a transmissão seja menos frequente por essas secreções e excreções^[1,4]. Gatos que possuem contato frequente com outros gatos, principalmente em gatis, abrigos, feiras, parques e outros locais, adquirem a infecção com maior frequência^[11].

b) Sinais clínicos

A infecção pelo FeLV pode progredir para a recuperação completa, porém a grande maioria dos gatos apresenta viremia persistente, e as manifestações clínicas associadas à infecção são classificadas como neoplásicas e não neoplásicas. As manifestações não neoplásicas são, em sua maioria, decorrentes da imunossupressão. Gatos infectados podem apresentar anemia hemolítica mediada pelo sistema imune, trombocitopenia, glomerulonefrite e eritroblastopenia, entre outros achados.

O linfoma é a neoplasia mais frequente, sendo a forma multicêntrica observada em vários linfonodos e órgãos como baço, rins e fígado. O trato digestivo e os linfonodos mesentéricos também podem apresentar neoplasias^[1]. Leucemia e síndromes mieloproliferativas também podem estar presentes. Os sinais clínicos variam conforme a apresentação clínica da infecção, porém gatos que apresentam linfomas geralmente possuem linfadenopatia, anorexia, anemia, depressão e emagrecimento^[1,9]. Infecções oportunistas, como gengivite e estomatite crônica, lesões de pele e abscessos cutâneos, doenças respiratórias crônicas e o agravamento de infecções como a peritonite infecciosa e a toxoplasmose podem ser observados em gatos infectados pelo FeLV^[10]. Gatos persistentemente infectados morrem em 3 a 4 anos, em decorrência da infecção^[8]. Glomerulonefrite, desordens reprodutivas, osteocondromas e neuroblastomas olfatórios espontâneos também têm sido relacionados à infecção pelo FeLV^[4].

A infecção latente pelo FeLV também é descrita. Nesse caso, o provírus permanece em uma forma não replicativa em células progenitoras mielomonocíticas, sendo associado a linfoma, leucemia e citopênias^[5].

c) Patologia

Os achados de necropsia dependem da forma clínica apresentada pelo animal, se é neoplásica ou não neoplásica, pois uma grande variedade de manifestações clínicas é associada à infec-

ção pelo FeLV. Lesões podem ser observadas em vários órgãos e sistemas. Entre as formas neoplásicas, linfomas e leucemia são as mais comuns, no entanto outros tumores hematopoiéticos podem ser observados. Mais de 80% dos casos de linfoma e leucemia em felinos são relacionados ao FeLV. Os linfomas são classificados de acordo com a sua localização em mediastínicos (timo), alimentares (intestino) e multicêntricos (vários locais). Mais da metade dos gatos que possuem leucemia não linfoide são FeLV positivos. Mielofibrose resultante da estimulação crônica da medula óssea, fibrossarcomas e melanomas associados ao FeLV e ao FeSV, resultante da recombinação do FeLV com proto-oncogenes, também podem ser observados. Outras neoplasias associadas à infecção pelo FeLV são osteocondromas e neuroblastomas olfatórios^[4].

d) Diagnóstico laboratorial

O isolamento do FeLV raramente é realizado, porém existe um grande número de técnicas disponíveis para o diagnóstico da infecção. Elas são baseadas na detecção de抗ígenos ou material genético do vírus. Para isso, o sangue de animais suspeitos, colhido com anticoagulante, deve ser enviado ao laboratório de diagnóstico^[9]. Existem kits comerciais de ELISA para detecção de proteínas como a p27 do vírus a partir de amostras de sangue^[11]. Outros kits incluem a detecção da gp70 ou do FOCMA - *feline oncorna virus-associated cell membrane antigen*^[11]. Esses kits podem ser utilizados nas clínicas veterinárias, e o resultado é obtido em poucos minutos. A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) é, no entanto, o teste utilizado com maior frequência para a detecção de抗ígenos do FeLV^[10]. Com essa técnica também se obtêm resultados rápidos, porém como esse vírus apresenta grande variabilidade抗igenica, é possível que a presença de抗ígenos virais não seja detectada por IFI ou ELISA. Com essas técnicas existe, portanto, a possibilidade de ocorrência de falsos resultados negativos^[11]. Nesses casos, podem ser aplicadas técnicas de diagnóstico molecular, como a PCR para detecção do provírus do FeLV^[5,2,11]. A RT-PCR também pode ser utilizada^[9], porém são necessários maiores cuidados quando se trabalha com RNA e, ademais, essa técnica é mais trabalhosa do que a PCR convencional.

Técnicas quantitativas como a PCR em tempo real também têm sido desenvolvidas para estudar a carga viral em gatos infectados naturalmente ou experimentalmente^[6]. As técnicas moleculares podem ainda ser aplicadas em tecidos com formações neoplásicas, medula óssea, córnea e em porções de tecidos fixadas em formol, além do sangue periférico^[5].

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos podem ser utilizados para confirmação do diagnóstico clínico, levando-se em consideração o histórico de vacinação. Kits de teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos são muito utilizados^[11].

e) Diagnóstico diferencial

Outras doenças neoplásicas, infecção pelo vírus da imunodeficiência felina, peritonite infecciosa felina, panleucopenia infecciosa felina, hemobartonelose e outras doenças infecciosas devem ser consideradas no diagnóstico diferencial^[3,12].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Porções de tecidos, congelados ou fixados em formol, amostras de soro separado do coágulo e sangue total colhido com anticoagulante e submetido imediatamente ao laboratório são as amostras colhidas e submetidas ao diagnóstico da infecção pelo FeLV.

Referências bibliográficas

1. BARR, M.C. et al. Moléstias virais felinas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-631
2. Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-631.
3. CALDAS, A.P.F. et al. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, p. 20-25, 2000.
4. CARTER, GR.; PAYNE, P.A. **A Concise Guide to Infectious and Parasitic Diseases of Dogs and Cats**. International Veterinary Information Service, Ithaca, NY, 2005. Disponível em: <http://www.ivis.org/signin.asp?url=/special_books/carter/toc.asp>, Acesso em: 10 set. 2009.
5. HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier. p. 131-143
6. HERRING, E.S. et al. Detection of feline leukemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 133-141, 2001.
7. HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Feline Leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1589-1596, 2001.
8. HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKADA, M. et al. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v. 30, p. 113-123, 1992.
9. McCLELLAND, A.J. et al. Prognosis of healthy feline leukemia virus infected cats. In: HARDY, W.D. et al. **Development in Cancer Research**. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 121-126.
10. MURPHY, F.A. et al. Retroviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic Press, 1999, p. 301-326.
11. RAVAZZOLO, A.P.; COSTA, U. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 773-808. Cap. 30.
12. TEIXEIRA, B.M. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 4, 2007.

2.7 Raiva felina

Conceito

Todos os animais de sangue quente são suscetíveis à infecção pelo vírus da raiva. Essa doença é uma zoonose, e o tempo decorrido entre a infecção com o agente e o desenvolvimento da doença depende de fatores como a virulência da variante, o local da mordedura e o título de vírus inoculado^[3,4].

Etiologia e Patogênese

O vírus da raiva pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, possui envelope viral e uma fita simples de RNA de polaridade negativa como genoma (Murphy et al., 1999). Esse vírus é sensível à maioria dos desinfetantes comuns, ao calor e à luz ultravioleta, podendo sobreviver alguns dias em carcaças a 20°C^[1,3].

Diagnóstico

A raiva deve ser suspeitada quando o animal apresenta sinais neurológicos e há histórico recente de contato ou mordedura de animais selvagens suspeitos ou de morcegos. Em casos suspeitos de raiva em cães e gatos, o clínico deve notificar o órgão municipal responsável (Inspeção Veterinária, Secretaria da Agricultura). Somente são realizadas técnicas de diagnóstico em pacientes vivos quando há a suspeita de infecção de humanos, pela detecção do vírus da raiva na saliva ou tecidos adjacentes ao local da mordedura e antígenos em impressões de córnea^[7].

O período de incubação frequentemente é de duas a 12 semanas, porém em alguns casos específicos foram relatados períodos superiores a 1 ano^[8]. A variação no período de incubação da raiva depende do local e da profundidade da mordida, do título de vírus presente na saliva e do trajeto do vírus da musculatura e tecidos adjacentes até as terminações nervosas, atingindo o sistema nervoso central^[5,7].

a) Epidemiologia

A doença apresenta distribuição mundial, porém vários países têm controlado casos da doença pela imunização maciça dos animais domésticos. Nesses países, animais selvagens têm constituído a principal fonte de vírus para humanos e animais domésticos^[7,2]. No Brasil, algumas regiões conseguiram controlar a ocorrência da infecção em cães e gatos pela vacinação frequente e maciça dos animais, que constituem uma fonte importante do vírus para humanos. Um caso de raiva felina foi diagnosticado em 2001 e de raiva canina em 2006, no Rio Grande do Sul^[8]. Em Santa Catarina, foram diagnosticados dois casos em caninos e um caso em felino em 2006^[6]. Nessas Estados, casos de raiva em cães e gatos não eram relatados desde 1981^[8].

A transmissão do vírus da raiva ocorre por saliva de animais contaminados, por meio de mordedura. Para felinos, é comum a transmissão por contato com animais selvagens^[1].

b) Sinais clínicos

Em felinos, três fases da doença clínica podem ser identificadas: a fase prodrômica, com duração de 1 a 2 dias, é caracterizada por sinais inespecíficos como febre, dilatação das pupilas e alterações de comportamento; na fase furiosa são observados sinais neurológicos como irritabilidade, disfagia, salivação, incoordenação, contrações musculares, agressividade ou astenia por 1 a 4 dias e, finalmente, ocorre a fase paralítica, estágio final da doença. No qual há paralisia, coma e morte por parada respiratória^[1]. Clinicamente, a infecção de felinos é muito semelhante à infecção em caninos. Pelo comportamento dos gatos, que possuem hábitos noturnos, a transmissão do vírus pela mordedura de morcegos pode ocorrer mais facilmente do que para caninos.

c) Patologia

Lesões macroscópicas não são detectadas no SNC de animais infectados. Corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos podem ser detectados em neurônios de diferentes regiões do encéfalo. Polinecefalite aguda, neuronofagia, degeneração neuronal e inflamação não supurativa são achados iniciais da infecção pelo vírus da raiva. Outras lesões incluem encefalite necrosante, infiltrado perivasicular de células mononucleares, ganglionite e morte neuronal, que também podem ser observadas^[7,3].

d) Diagnóstico laboratorial

A técnica comumente empregada para o diagnóstico da raiva é a imunofluorescência direta, pela rapidez na obtenção de resultados. Em seguida, realiza-se a prova biológica, pela inoculação intracerebral de camundongos lactentes com suspensões de encéfalo homogeneizado em meio es-

sencial mínimo. Quando inoculados com amostras positivas para o vírus, esses animais desenvolvem sinais neurológicos entre 4 e 23 dias após a inoculação^[8]. Parte do encéfalo pode ser acondicionada em formol a 10% ou formol tamponado para avaliação histológica, detecção dos corpúsculos de Negri ou, ainda, detecção de antígenos do vírus por imuno-histoquímica^[7,8].

Mais descrições de técnicas para a detecção e estudo do vírus da raiva em animais domésticos podem ser encontradas no diagnóstico de infecções virais caninas – seção raiva canina.

e) Diagnóstico diferencial

A raiva felina pode ser confundida com encefalopatia espongiforme, *shunt* portossistêmico, com a infecção pelo vírus da panleucopenia felina, traumas, uremia, encefalite. Comportamento anormal, intoxicações por piretroides, veneno de aranha, chumbo ou mesmo botulismo e desordens do sistema nervoso central de felinos são algumas enfermidades que podem ser confundidas com a raiva felina^[5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Pelo risco de contaminação humana durante a necropsia de casos suspeitos, deve-se colher o encéfalo com o auxílio de equipamentos de proteção individual, vedando-o e acondicionando sob refrigeração durante o envio para o laboratório de virologia ou mesmo para a patologia.

Referências bibliográficas

1. BARR, M.C. et al. Moléstias virais felinas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-631.
2. BELOTTO, A. et al. Review of rabies in the Américas. **Virus Research**, v. 111, p. 5-12, 2005.
3. GREENE, C.E.; RUPPRECHT, C.E. Rabies and other lyssaviruses infections. In: GREENR, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 22, p. 167-183.
4. JACKSON, A.C. Rabies pathogenesis. **Journal of Neurovirology**, v. 8, p. 267-269, 2002.
5. JONAS, D.; HABERKORN, K.; COMMICHAU, C. Differential postmortem diagnosis of rabies in cats. **Tierarztl Prax.**, v. 14, n. 4, p. 527-532, 1986.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde – Relatório de Situação. 3. ed. Brasília: Série C projetos, programas e relatórios, 2007. 24p.
7. MURPHY, F.A. et al. Rhabdoviridae. _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. Califórnia: Academic Press, 1999, p. 429-444.
8. RODRIGUEZ, L.L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007, p. 689-720. Cap. 27.

2.8 Influenza em felinos

Conceito

Nos últimos anos, os vírus influenza tipo A têm-se adaptado a novos hospedeiros e, eventualmente, felinos domésticos e selvagens podem ser infectados por algumas cepas virulentas, produzindo sinais de doença respiratória. Os primeiros relatos de infecção de felinos por vírus da influenza ocorreram entre 1970 e 1980.

Etiologia e Patogênese

Os vírus da influenza são classificados na família *Orthomyxoviridae* e produzem infecções respiratórias em mamíferos. Esses vírus são envelopados, grandes, pleomórficos e possuem oito segmentos lineares de RNA de sentido negativo. São sensíveis a temperaturas elevadas, solventes lipídicos, detergentes e pH ácido (menor que 3).

Estudos têm demonstrado que gatos domésticos podem ser infectados pelas cepas H5N1, altamente patogênica e oriunda de aves; H3N2, de humanos; H7N7, isolado de focas; e H7N3, de perus^[9]. A primeira descrição da infecção de felinos pelo H5N1 ocorreu em 2003, na Tailândia, produzindo elevada taxa de mortalidade. Além daquele país, outros países, como Alemanha, China, Indonésia e Iraque, já relataram a mortalidade de felinos durante surtos de H5N1 aviário (em aves)^[2,4,3,8,9,10]. Essa cepa do vírus não foi descrita no Brasil.

Diagnóstico

A suspeita de casos de influenza em felinos ocorre quando há surtos da infecção em humanos ou aves em uma determinada região geográfica, e é baseada principalmente nos sinais clínicos graves e pelo histórico de contato direto com animais ou pessoas suspeitas.

a) Epidemiologia

A demonstração de infecção de felinos com diferentes cepas do vírus influenza A pode representar que esses animais servem como fonte da transmissão para humanos. A transmissão desse vírus para felinos foi relatada após a ingestão de carne de ave contaminada (H5N1), contato com aves, e ainda existe a possibilidade de transmissão de felino para felino^[1,2,4,8].

b) Sinais clínicos

Os sinais clínicos observados variam em gravidade conforme a cepa. A infecção com H3N2, H7N7 e H7N3 produz hipertermia, e a excreção de vírus foi demonstrada^[2]. Hipertermia, depressão, dificuldade respiratória, descarga nasal serossanguinolenta, que podem evoluir para a morte do animal, são relatadas na infecção pelo H5N1^[4,8]. Alguns felinos podem ainda apresentar convulsões, ataxia e outros sinais neurológicos. A mortalidade é observada após 3 a 5 dias do início dos sinais em felinos infectados pelo H5N1^[4,7,8].

c) Patologia

Na necropsia, podem-se observar lesões como congestão e hemorragia nos pulmões, exsudato serossanguinolento na traqueia e nos brônquios e efusão pleural. Foram relatados, ainda, em felinos domésticos: congestão no encéfalo e nos rins, e hemorragia no intestino. Na microscopia, já foram relatados achados de meningoencefalite não supurativa, gliose, infiltrado mononuclear e vasculite no encéfalo, hepatite necrosante multifocal, edema e hemorragia severa nos pulmões e em outros órgãos. Foram observados também, perda do epitélio alveolar e bronquiolar e infiltrado de neutrófilos e macrófagos, em órgãos como o timo, coração, estômago, intestino e linfonodos^[4,7,8].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da infecção pode ser realizado por isolamento viral, inoculando-se secreção nasal colhida com o auxílio de suabes, ou fragmentos de tecidos macerados em areia estéril e diluídos em MEM (meio essencial mínimo) no saco alantoide de ovos embrionados com 10 dias^[7]. Na necropsia, pode-se colher pulmão, fígado, rins e encéfalo. A detecção do vírus pode ainda ser

realizada por RT-PCR, RT-PCR em tempo real, imuno-histoquímica, hemaglutinação e confirmação com inibição da hemaglutinação em tecidos^[5,6,8].

Testes sorológicos, como microneutralização e inibição da hemaglutinação, podem ser utilizados para detecção de anticorpos no soro de animais. Essas técnicas são úteis para vigilância e estudos de prevalência da infecção.

e) Diagnóstico diferencial

As infecções respiratórias em felinos são produzidas pelos vírus do complexo respiratório felino: o calicivírus felino e o herpesvírus felino 1. Somente se suspeita de infecção por vírus da influenza quando há casos da doença em outras espécies, como as aves, e em felinos com histórico de ingestão de carne suspeita de contaminação ou contato com animais infectados. Outras doenças que produzem hemorragia, sinais neurológicos ou morte súbita em felinos também podem ser suspeitadas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Secreção nasal pode ser colhida com o auxílio de suabes estéreis e acondicionada em meio de transporte. Fragmentos de tecidos colhidos durante a necropsia, bem como amostras de soro separadas do coágulo, também podem ser colhidos e enviados sob refrigeração ou congelados ao laboratório credenciado para diagnóstico.

Referências bibliográficas

1. ENSERINK, M.; KAISER, J. Avian flu finds new mammal hosts. **Science**, v. 305, 2004.
2. FAO. **H5N1 in cats. Animal production and health division.** 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/avian_cats.html>. Acesso em: 20 jun. 2009.
3. INFLUENZA TEAM. H5N1 infection in cats – public health implications. **Eurosurveillance**, v. 11, n. 4, 2006.
4. KEAWCHAROEN, J. et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 12, 2004.
5. PODDAR, S.K. et al. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription polimerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel eletrofóresis. **J. Virol. Methods**, v. 99, p. 63-70, 2002.
6. PAYUNGORN, S. et al. Single step multiplex reverse transcription-polimerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. **Viral Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 588-593, 2004.
7. SONGSERM, T. et al. Avian Influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 4, 2006.
8. THANAWONGNUWECH, R. et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 44, n. 5, 2005.
9. THIRY, E. et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. **Vet. Microbiol.**, v. 122, n. 1-2, 2007.
10. YNGST, SL; SAAD, M. D.; FELT, S.A. Qinghai-like H5N1 from domestic cats, Northern Iraq. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 8, p. 1295-1297, 2006.

2.9 Rotavirose felina

Conceito

A rotavirose é frequentemente associada a quadros de gastroenterite, principalmente em filhotes, da maioria dos mamíferos e algumas espécies de aves^[4]. A infecção pelo rotavírus felino foi descrita inicialmente em 1979, em filhotes com seis a oito semanas de idade apresentando fezes malformadas e líquidas.

Etiologia e Patogênese

O rotavírus felino pertence ao gênero *Rotavirus* da família *Reoviridae*. Os rotavírus são classificados em sorogrupo (de A a G, baseando-se em características genéticas e imunológicas), possuem 11 segmentos de RNA fita dupla como genoma, não são envelopados e o capsídeo (único envoltório desses vírus) é composto por três camadas concêntricas de simetria icosaédrica. Os vírions são estáveis a variações de pH, resistentes a solventes lipídicos, como éter e clorofórmio, e relativamente resistentes a desinfetantes comuns, como formaldeído, derivados fenólicos e peróxido de hidrogênio. Porém, são sensíveis ao hipoclorito de sódio e ao etanol a 95%, além da luz ultravioleta^[1]. Embora a infecção em gatos seja comum, com até 100% de sorologia positiva em populações felinas, a descrição da doença entérica produzida por esse vírus é rara^[2].

Diagnóstico

O diagnóstico da enfermidade é baseado na detecção do vírus nas fezes de gatos, uma vez que, pelos sinais clínicos, a doença pode ser confundida com outras enfermidades entéricas.

a) Epidemiologia

Secreções e excreções são as fontes primárias de vírus, e podem contaminar a água, os alimentos e o ambiente, favorecendo a transmissão do rotavírus felino a animais suscetíveis^[2]. Embora a maioria dos isolados de rotavírus sejam espécie-específicos, a transmissão interespécies não pode ser descartada^[1].

b) Sinais clínicos

Os animais adquirem a infecção pela rota fecal-oral. Filhotes que não ingeriram colostro, bem como animais debilitados, imunossuprimidos³ ou com doenças concomitantes podem desenvolver sinais de anorexia e diarreia quando infectados. Experimentalmente, a inoculação do rotavírus isolado de um felino de seis semanas de idade com anorexia e diarreia em um filhote com 3 dias de idade que não recebeu colostro resultou na reprodução da doença^[2]. Três grupos de felinos livres de patógenos com diferentes idades foram inoculados por via oral com o rotavírus felino. Embora esses animais tenham excretado o vírus nas fezes a partir do dia 1 pós-inoculação, por 10 a 14 dias, permitindo a transmissão para uma fêmea e um filhote controles mantidos em contato com os animais infectados, não foi possível reproduzir a doença entérica produzida pelo rotavírus felino^[3].

c) Patologia

Na histologia, observa-se edema das vilosidades intestinais, leve infiltrado de macrófagos e neutrófilos e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, que podem ser detectados em células epiteliais^[3,2].

³ Imunossuprimidos: Indivíduos com capacidade comprometida de desencadear uma resposta imunológica.

d) Diagnóstico laboratorial

O rotavírus felino pode ser demonstrado nas fezes de animais suspeitos por microscopia eletrônica, eletroforese em gel de poliacrilamida, marcação com prata do RNA extraído a partir das fezes e por RT-PCR. Essa técnica tem sido consideravelmente mais sensível do que outros métodos. Antígenos podem ser detectados nas fezes por imunofluorescência^[3,2]. O isolamento viral pode ser realizado com amostras de fezes e intestino em células das linhagens VERO e MA104. O tratamento do inóculo ou lisado de células com tripsina (10µg/ml, por 1h a 37°C) para a propagação do vírus em células chega a aumentar em 2 logaritmos o título do vírus^[3].

Técnicas como aglutinação em látex e ELISA são úteis para a detecção de rotavírus pertencentes ao grupo A. No entanto, a maioria dos isolados felinos pertence a outros sorogrupos^[2]. Anticorpos podem ser detectados por imunofluorescência indireta, ELISA e soroneutralização, indicando exposição prévia ao agente^[3,1].

e) Diagnóstico diferencial

Infecções por coronavírus felino, parvovírus felino, astrovírus felino, reovírus felino, bactérias e outros agentes infecciosos que produzem diarreia em felinos devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial. A infecção pelo rotavírus felino usualmente é leve e não produz diarreia sanguinolenta, não sendo considerada um patógeno entérico importante de felinos^[3].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Fezes acondicionadas em frascos estéreis, refrigeradas, acondicionadas em caixas isotérmicas podem ser enviadas ao laboratório de virologia para diagnóstico. Amostras de intestino colhidas durante a necropsia podem ser submetidas refrigeradas.

Referências bibliográficas

1. ALFIERI, A.A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. UFSM: Santa Maria. Cap. 30, 2007, p. 775-805.
2. GREENE, C.E. Feline enteric viral infections. In: _____. **Infectious Disease of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier. Cap. 12, p. 103-104.
3. HOSHINO, Y. et al. Isolation and characterization of feline rotavirus **J. Gen. Virol.**, v. 54, n. 2, p. 313-323, 1981.
4. WYATT, R. G. et al. Reovirus-like agents (rotaviruses) associated with diarrheal illness in animals and man. In: **Perspectives in Virology**, v. 10, p. 121-145, 1978.

2.10 Outras infecções virais que acometem felinos

- **Vírus espumoso (ou sincicial) dos felinos**

Esse vírus de felinos tem sido identificado em vários tecidos e órgãos de gatos, porém não há relação com nenhuma enfermidade^[5]. O *feline foamy virus* (FeFV), também conhecido como vírus sincicial felino, é classificado no gênero *Spumavirus* da subfamília *Spumaretrovirinae*, pertencente à família *Retroviridae*. Esses vírus são envelopados e possuem duas cópias idênticas de RNA fita simples como genoma. A prevalência da infecção em populações de gatos é de 40% a 50% e varia conforme a localização geográfica, a idade dos animais e o ambiente onde são criados. A prevalência da infecção é maior em populações de gatos domésticos ou de rua do que em animais de abrigos, gatis e grandes criações. Filhotes que nascem de mães infectadas também po-

dem ser positivos. Poliartrite crônica e progressiva, osteoporose, proliferação do periósteo periaricular, erosões periarticulares, colapso do espaço articular, além de linfoadenomegalia têm sido relatados em animais infectados pelo vírus^[7].

Para o diagnóstico da infecção, pode-se realizar o isolamento do vírus a partir do sangue, da capa flogística, de secreções da orofaringe e de tecidos, em células de linhagem felinas. Como a infecção pelo FeFV é persistente, por toda a vida do animal, sorologia positiva é indicativa de infecção, assim como ocorre para o FIV^[7].

- **Papilomatose felina**

As infecções por papilomavírus em felinos são pouco relatadas, e a confirmação da presença do vírus nas lesões, bem como a existência de uma espécie de papilomavírus felino, ainda não foi completamente elucidada. A maioria dos casos ocorreu em gatos imunossuprimidos, com infecção concomitante pelo vírus da imunodeficiência felina ou ainda com a síndrome Chediak-Higashi, uma doença recessiva autossomal que causa imunodeficiência, tendência a hemorragias e lesões oculares^[13]. Foi também demonstrada a presença de DNA semelhante ao de papilomavírus em fibropapilomas de felinos, sem confirmação da etiologia das lesões^[12].

Os papilomavírus são patógenos do epitélio escamoso estratificado altamente específicos de espécie e localização^[13]. Esses vírus pertencem à família *Papillomaviridae*, são pequenos, não possuem envelope, têm simetria icosaédrica e o genoma consiste em uma fita dupla circular de DNA. Existem relatos de associação de papilomavírus com lesões de pele na cabeça, pescoço, abdome e patas de felinos. A análise da sequência desses fibropapilomas revelou semelhança com o papilomavírus bovino tipo 1, e dos 20 casos analisados, 11 eram em gatos que possuíam histórico de contato com bovinos^[12]. Em outro estudo, pelo menos oito papilomavírus de felinos foram relatados como causadores de infecção na cavidade oral de felinos domésticos e selvagens^[13]. No entanto, tentativas de reprodução experimental pela inoculação de material semelhante a papilomas em felinos não resultaram no desenvolvimento de lesões^[6].

O diagnóstico é realizado em biópsias abrangentes das lesões, que devem ser processadas para o exame por imuno-histoquímica, microscopia eletrônica, histologia ou, ainda, amplificação por PCR e posterior sequenciamento e análise para identificação do vírus^[12,6]. Técnicas de hibridização, como *Southern blot*, também são relatadas^[13].

- **Pseudorraiva felina**

O vírus da pseudorraiva é um alfa-herpesvírus envelopado, que possui uma fita de DNA como genoma. Esse vírus sobrevive no ambiente por longos períodos, porém é inativado por luz ultravioleta, solventes lipídicos e ressecamento. A infecção em suínos é responsável por grandes perdas econômicas nos países onde ocorre, podendo ser transmitido para bovinos, cães e gatos em contato com suínos infectados.

A transmissão geralmente ocorre pela ingestão de restos de aborto e leitegadas contaminadas. O período de incubação é de 3 a 6 dias, e esse vírus replica-se nas tonsilas, é transportado da mucosa oral para as terminações nervosas e destas para a medula oblonga. Os sinais clínicos iniciam com letargia, indiferença, dispneia, vômito, diarreia, hipersalivação, no entanto o principal sinal é o prurido intenso na cabeça, com menor frequência no pescoço e em outras regiões. O prurido produz autoflagelação, e raramente o curso clínico excede a 48 horas, podendo ser observadas convulsões. Outros sinais incluem anisocoria, midriase, ausência de reflexo pupilar, trismo, paresia e paralisia dos músculos faciais, dificuldade de deglutição, alterações na voz, agressividade, hiperestesia, sinais do trato gastrointestinal e paralisia dos membros, que pode ocorrer antes da morte. Anisocoria e voz rouca são mais consistentes nos gatos.

O diagnóstico é realizado pela identificação dos sinais clínicos, verificando se houve o contato com outros animais infectados, e pela inoculação de tecidos infectados (encéfalo, geralmente) na pele de coelhos ou então no encéfalo de camundongos. Em 5 a 6 dias se verifica prurido e morte rápida do animal. Outros métodos mais atuais incluem a detecção de antígenos por imunofluorescência, PCR e isolamento viral^[14].

• Infecção por astrovírus em felinos

Os astrovírus foram relatados inicialmente como agentes de gastroenterite em humanos. Dois casos de infecção natural em felinos foram relatados, caracterizados por diarreia aquosa e esverdeada, anorexia e desidratação^[11]. Outro caso da doença foi relatado em um filhote com 4 meses de idade com diarreia^[8]. Febre, depressão e vômitos também foram observados.

Em um surto em um gatil, a análise das fezes dos animais por microscopia eletrônica revelou que 25% dos animais estavam infectados. A diarreia persistiu por 4 a 14 dias, e além de diarreia os animais apresentaram anorexia, depressão e prolapsos da terceira pálpebra. A doença foi reproduzida pela administração oral de um isolado de astrovírus em filhotes livres de patógenos. Os animais apresentaram febre, diarreia leve por 10 a 12 dias e excretaram o vírus nas fezes. Soroconversão também foi detectada. O diagnóstico é realizado em amostras de fezes, por microscopia eletrônica e imunofluorescência^[7].

• Infecções por poxvírus em felinos

A infecção mais comum por poxvírus em felinos é a varíola, e os felinos são os principais hospedeiros acidentais desse vírus^[3]. Essa doença ocorre na Ásia e na Europa, sendo caracterizada por lesões de pele. Além do vírus da varíola, alguns membros do gênero parapoxvírus também podem infectar felinos. Esses vírus pertencem à família *Poxviridae*, são grandes e complexos, envelopados, com fita dupla e linear de DNA como genoma^[4], e são relativamente estáveis no ambiente, sobrevivendo por longos períodos em crostas, porém são inativados por desinfetantes comuns, solventes lipídicos e hipoclorito de sódio^[9,2,4].

A infecção de felinos pelo vírus da varíola bovina é mais frequente entre gatos da área rural. Os felinos são considerados os hospedeiros acidentais mais frequentes, ocorrendo principalmente no verão e no outono, época em que os animais caçam os roedores, que são reservatórios do vírus da varíola. Felinos infectados com parapoxvírus provenientes de caprinos e ovinos apresentam múltiplas lesões crostosas de pele, que recuperam em poucas semanas^[3]. A transmissão de gato para gato por contato direto também pode ocorrer. As lesões em felinos produzidas pelo vírus da varíola bovina são consideradas mais graves do que aquelas observadas em humanos e bovinos^[9].

Sinais de doença sistêmica são leves e ocorrem durante o período de viremia, caracterizados por pirexia, anorexia, depressão, descarga nasal e diarreia transitória. Conjuntivite e pneumonia também são relatadas^[5]. A revisão de 30 casos da infecção em felinos revelou que a maioria dos animais apresentou somente lesões de pele, caracterizadas por pápulas e vesículas, e mais da metade dos animais apresentaram uma única lesão, na cabeça, no pescoço ou em membro anterior^[2].

O diagnóstico é realizado pela detecção das partículas do vírus por microscopia eletrônica em homogenados das crostas ou biópsias das lesões, por PCR e, ainda, imunofluorescência^[3]. Técnicas sorológicas disponíveis incluem imunofluorescência e ELISA^[5].

- **Vírus da síndrome respiratória aguda severa**

Também conhecido como SCoV, ou vírus da SARS, esse patógeno de humanos produz infecções subclínicas em gatos, sendo detectado nas secreções orofaríngeas e nasais 4 a 6 dias após a infecção^[1]. O SCoV é um novo agente pertencente à família *Coronaviridae*, identificado após um surto mundial de infecção respiratória aguda e severa em humanos, que recebeu o nome de SARS, constituindo-se em um problema para a saúde pública. Esse vírus pode ser transmitido entre humanos e animais^[15].

Referências bibliográficas

1. ADDIE, D.D.; JARRETT, O. Feline Coronavirus Infections. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier. Cap. 11, p. 88-102.
2. BENNET, M. et al. Poxvirus infection in the domestic cat: some clinical and epidemiological observations. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 14, p. 387-390, 1986.
3. BENNET, M.; GASKELL, R.M.; BAXBY, D. Poxvirus Infection. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 19, p. 158-160.
4. CANAL, C.W. Poxviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. Cap. 18, p. 491-511.
5. CARTER, G.R.; PAYNE, P.A. Major Infectious Diseases of Dogs and Cats. In: _____. **A Concise Guide to Infectious and Parasitic Diseases of Dogs and Cats**. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2005.
6. EGBERINK, H.F.; HORZINEK, M.C. Feline viral papillomatosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 20, p. 160-162.
7. GREENE, C.E. Feline foamy (Syncytium-Forming) Virus Infection. In: _____. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 17, p. 154-155.
8. HOSHINO, Y. et al. Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. **Archives of Virology**, v. 70, n. 4, p. 373-376, 1981.
9. MURPHY, F.A. et al. Poxviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap. 16, p. 277-292.
10. RAVAZZOLO, A.P.; COSTA, U. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária**, Santa Maria: UFSM, 2007, p. 773-808. Cap. 30.
11. RICE, M. Detection of astrovirus in the faeces of cats with diarrhoea. **N. Z. Vet. J.**, v. 41, n. 2, p. 96-97, 1993.
12. SCHULMAN, F.Y.; KRAFFT, A.E.; JANCKZEWSKI, T. Feline Cutaneous Fibropapillomas: Clinicopathologic Findings and Association with Papillomavirus Infection. **Vet Pathol.**, v. 38, p. 291-296, 2001.
13. SUNDBERG, J.P. et al., Feline papillomas and papillomaviruses. **Vet Pathol.**, v. 37, n. 1, p. 1-10, 2000.
14. VANDEVELDE, M. Pseudorabies. In: GREENE, C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 23, p. 183-186.
15. ZHENG, B. et al. Potent inhibition of SARS-associated coronavirus (SCoV) infection and replication by type I interferon (IFN α/β) but not by type II interferon (IFN- γ). **Journal of Interferon and cytokine research**, v. 24, p. 388-390, 2004.

3. PRINCIPAIS DOENÇAS MICÓTICAS DOS GATOS

3.1 Candidíase

Conceito

É a infecção pelo fungo oportunista *Candida albicans*, que acomete, principalmente, os animais imunossuprimidos ou debilitados, causando lesões ulcerativas crônicas^[7].

Etiologia e Patogênese

A *Candida albicans* é uma levedura do trato intestinal de mamíferos e aves considerada normal. Quando o animal está saudável, é raro encontrá-la na pele, porém a baixa da imunidade favorece seu desenvolvimento^[4]. Infecções por *Candida albicans* são incomuns^[5] e oportunistas em gatos que estão imunossuprimidos e debilitados^[7]. As leveduras isoladas compreendem espécies diferentes de *Candida*. A infecção por *Candida sp.* pode também estar associada às desordens neoplásicas e ao uso prolongado de corticoides e antibióticos^[1,6].

Diagnóstico

Deve-se levar em consideração a história e o exame clínico, apoiado pelos exames microscópico de raspados e citológico de pele^[5].

a) Epidemiologia

Candida albicans, apesar ser parte integrante da microbiota normal do trato intestinal, também se comporta como oportunista das regiões mucocutâneas do trato digestório e genital de mamíferos e aves, podendo causar micoses na pele, nas unhas e no trato respiratório, além de desencadear fungemias^[3]. Doenças que diminuem a imunidade, tais como as infecções víricas, predispõem a candidoses.

b) Sinais clínicos

Pelo fato de os animais estarem imunossuprimidos ou debilitados, ocorre predisposição às lesões ulcerativas crônicas e às lesões mucoides, normalmente acinzentadas e fétidas, e quando os gatos são acometidos por candidíase sistêmica e intestinal, estas causam diarreia crônica^[7].

c) Patologia

A candidíase pode afetar membranas mucosas, junções mucocutâneas e diferentes partes da pele^[6]. Causa lesões ulcerativas crônicas que não cicatrizam, como, por exemplo, otites externas crônicas.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é feito por observação microscópica de microrganismos levedurais em esfregaço corado, de lesões e espécimes de biópsia ou colônias de isolamento em ágar abouraud^[7].

Amostras de pele, exsudato e crostas, pelos, mucosa bucal e anal devem ser cultivadas a fim de fazer o isolamento do agente. Deve-se investigar uma possível infecção pelo vírus da leucemia infecciosa felina, visto que a infecção por esse vírus tem sido associada à infecção por *Candida albicans*^[2,4]. Para a realização desse exame, pode-se enviar sangue para avaliação^[4]. É prudente realizar o cultivo bacteriológico das respectivas amostras clínicas como forma de proceder ao diagnóstico diferencial de dermatites bacterianas.

e) Diagnóstico diferencial

Apesar de ser bastante característico o quadro de candidíase, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial as dermatites e otites por outras micoses e infecções bacterianas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Amostras de pele, exsudato, crostas, pelos e esfregaço de mucosa bucal e anal devem ser encaminhadas ao laboratório^[2]. As amostras de pelos podem ser obtidas com carpete estéril, que deve ser friccionado no corpo do animal. Dos suaves obtidos da musoca bucal devem-se fazer cultivos.

Referências bibliográficas

1. CLEFF, M.B.; SILVA, G.M.; MEINERZ, A.R.M. Infecção cutânea em cães por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**. v. 14, n. 2, p. 164-168, 2007.
2. FERREIRO, L. et al, Associações entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV), tratamentos com corticóides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 30, n. 3, p. 170-183, 2002.
3. KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E., Epidemiology. In: _____. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992, p. 35-43.
4. MOREIRA JÚNIOR, J.P.R. Estudo da associação entre o isolamento de *Candida albicans* e a detecção do vírus da leucose felina (FeLV) em gatos da região da Grande Porto Alegre. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 30, v. 1, p. 76-77, 2002.
5. WILKINSON, G.; HARVEY, R.G. Doenças cutâneas fúngicas. In: _____. **Atlas Colorido de Dermatologia dos Pequenos Animais**. Cap. 7. 2. ed. São Paulo: Manole Ltda., 1996, p. 115-132.
6. WILLEMSE, T. **Dermatologia Clínica de Cães e Gatos**. 2. ed., São Paulo: Manole Ltda., 1998, 143p.
7. WILLOUGHBY, K.; BENNETT, M. Outras infecções. In: CHANDLER, E.A.; GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006, cap. 30, p. 590.

3.2 Criptococose

Conceito

A criptococose é uma micose sistêmica, oportunista, causada por *Cryptococcus neoformans*, levedura capsulada, que acomete principalmente indivíduos imunocompetentes^[9,10], podendo ser subaguda ou crônica^[11].

Etiologia e Patogênese

A espécie está subdividida em três variedades e cinco sorotipos: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Essas variedades diferem quanto a apresentação clínica, habitat e características epidemiológicas^[5]. Os felinos são os mais comumente afetados, e ambas as variedades já foram isoladas (*neoformans* e *gattii*) nessa espécie^[6]. É considerada a micose sistêmica mais comum dos gatos, sem predileção por sexo, raça ou idade^[5]. A porta de entrada é a via respiratória e essa infecção ocorre pela inalação de microrganismos^[3,10,12].

A criptococose nasal é a apresentação clínica mais comum de micose sistêmica. Já as formas cutânea, respiratória, ocular e neurológica também podem ser encontradas, porém com menor frequência^[8]. Em 80% dos gatos com criptococose, são observadas lesões do trato respiratório superior^[5]. Ela acomete homens e outras espécies animais, principalmente os gatos^[10]. A primeira vez que essa doença foi descrita em gatos domésticos no Brasil foi em 1971, como relataram Sant'ana e colaboradores (1999). O *Cryptococcus neoformans* é um fungo leveduriforme, sapófrita que está associado a gotículas de sujidades acumuladas em poleiros de pombos^[14]. A variedade *neoformans* é encontrada na excreta de aves, como os pombos, e a variedade *gattii* em árvores, como eucaliptos, e em material vegetal em decomposição^[2].

Diagnóstico

Muitas vezes a anamnese e o exame físico não revelam nada a respeito do diagnóstico, levando o clínico a tratamento errôneo por meio do uso de antibióticos, não resolvendo o problema. A análise citológica e histopatológica revela o diagnóstico.

a) Epidemiologia

O *Cryptococcus neoformans* está presente no solo e nos excrementos do pombo. É uma micose sistêmica mais comum em gatos e ocorre em regiões geográficas de climas quentes e úmidos^[15].

b) Sinais clínicos

Para estabelecer a infecção e a disseminação da doença, ela deverá estar diretamente relacionada com a diminuição da imunidade do hospedeiro^[11]. Essa enfermidade quase sempre se associa às infecções pelo vírus da leucemia felina (FeLV), ou da imunodeficiência felina (FIV)^[14]. Poderá ser encontrada uma variedade de sinais clínicos devida ao comprometimento de diversos órgãos e sistemas, o que dificulta o diagnóstico clínico^[10]. Sinais clínicos, quando relacionados ao sistema respiratório, são espirros, descarga nasal serosa ou sanguinolenta, deformidade ou oclusões nasais, rinite, sinusite^[7], dificuldade respiratória, tumoração das fossas próximo das narinas, anorexia^[13], lacrimejamento^[6]. Tecido avermelhado e esponjoso na narina também foi observado^[11].

c) Patologia

A cavidade nasal e os seios nasais são os tecidos mais afetados, podendo muitas vezes ocorrer formação de pólipos ou massas firmes e duras de tecido subcutâneo sobre o nasal deformando a narina, sendo denominado de “nariz de palhaço”^[5]. Quando ocorre envolvimento cutâneo, que é bastante comum, ocorrendo em 40% a 50% dos casos relatados^[5], o paciente apresentará pústulas, nódulos, úlceras e abscessos^[7]. Ao atingir o sistema nervoso central, ele apresentará convulsões, paresia, depressão, ataxia^[7], perda de consciência^[4], andar em círculo, paralisia, mudança de comportamento, perda de olfato^[5], rinite e cegueira quando existe envolvimento ocular^[7]. Com menor frequência, outros órgãos podem estar envolvidos, como ossos, rins e linfonodos periféricos^[5]. O sistema geniturinário pode estar acometido, causando pielonefrite, no entanto essa forma é rara. Nesses casos, indica-se a cultura de urina^[9]. A criptococose tem emergido como um sério problema de saúde pública, estando relacionada aos pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^[10].

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é feito por exame direto, cultura, sorologia, histopatologia e técnicas moleculares^[9]. O isolamento da levedura em cultura é feito em meios isentos de ciclo-hexamida, incu-

bados a 30 a 32°C, sendo a identificação feita por meio de provas morfológicas, produção de uréases e fenol-oixidase em meios diferenciais (L-dopa, sementes de girassol, ou alpiste).

O diagnóstico definitivo é feito por meio do cultivo e isolamento do agente e caracterização morfotintorial. As amostras destinadas ao cultivo deverão ser semeadas em ágar semente de níger (ASN) ou Ágar Saboraud Dextrose (ASD), isentos de ciclo-hexamida com cloranfenicol. Os meios devem ser incubados a 32 a 37°C por 5 dias^[11]. As colônias esbranquiçadas, cremosas, mucoides em ASD^[11] e colônias lisas, brilhantes e de coloração marrom-escura em ASN^[6]. A caracterização é realizada por meio do estudo morfotintorial, provas morfológicas, produção de uréases, e fenol-oixidase em meios diferenciais.

O diagnóstico sorológico tem como base a presença do antígeno no soro ou liquor mediante técnica de aglutinação com partículas de látex^[9].

O exame direto revela leveduras arredondadas encapsuladas, o que sugere *C. neoformans*^[6]. Os espécimes de biópsias obtidos dos tecidos lesados podem ser corados com corantes histológicos de rotina, como hematoxilina e eosina. O corante mucicarmim de Mayer, que é especial para fungos, é muito utilizado, pois produz intensa coloração róseo-avermelhada da cápsula em um fundo azul^[5]. O exame citológico tem vantagens tais como rapidez e facilidade de execução^[10]. As amostras são submetidas à impressão em lâmina e, depois, serão coradas por Wright, azul de metileno ou coloração de Gram. Quando corados com Gram, visualizamos os organismos violeta e a cápsula fica com tonalidade suave de rosa. Ao ser negativo o exame citológico, não se deve desconsiderar a possibilidade de infecção por *Cryptococcus* spp., e outros exames devem ser realizados para estabelecer o diagnóstico definitivo^[5].

e) Diagnóstico diferencial

Rinites, rinotraqueíte infecciosa felina, infecções respiratórias bacterianas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

As amostras que podem ser enviadas ao laboratório são: liquor, urina, lavado broncoalveolar, raspados de lesões cutâneas e fragmentos de tecidos^[9], depois de o paciente estar anestesiado^[1]. A punção aspirativa pode ser realizada com uma seringa de insulina para a pesquisa citológica, utilizando a técnica de contraste com tinta da China (nanquin)^[11]. Pode-se, ainda, colher uma amostra por meio de um suave nasal para a realização de exame citológico^[6].

As amostras de tecido encaminhadas para exame histopatológico e isolamento fúngico devem ser fixadas em formol a 10% e processadas rotineiramente para exame histológico.

A colheita de material da cavidade nasal com suave pode ser realizada e ele deve ser encaminhado para cultura fúngica. Esse pode ser um método de controle quando o paciente retornar após o tratamento, com a finalidade de controle^[11].

Para o teste sorológico, os materiais enviados ao laboratório são: soro, urina e líquido cerebroespinhal. Os testes são feitos por meio de *kits* comerciais, em que o mais comum é o teste da aglutinação pelo látex^[5].

Referências bibliográficas

1. BEMIS, D.A.; KRAHWINKEL, D.J.; BOWMAN, L.A., et al. Temperature sensitive strain of cryptococcus noeformans producing hyphal elements in a feline nasal granuloma – relato de caso. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 2, p. 926-928, 2000.
2. CABANA, Â. L.; FARIA, R.; ANTUNES, T. Á.; et al. **Relato de caso: criptococose em feline.** In: XVII CIC. XI ENPOS. UFPEL, Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFPEL. Pelotas, 2008, 4p.

3. FERREIRA, R.R. et al. Infecções fúngicas do trato respiratório de cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 35, 285-288, 2007.
4. FOSTER, S.F. et al. Cerebral cryptococcal granuloma in a cat. Relato de caso. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, p. 201-206, 2000.
5. JACOBS, G.J.; MEDLEAU, L. Criptococcose. In: GREENE C.E. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2. ed. Philadelphia. WB. Saunders Company, 1998, p. 383-390.
6. JULIANO, R.S.; SOUZA, A.I.; SCHEIDE, R. Criptococose felina. Relato de caso. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35., n. 1, p. 65-70, 2006.
7. KERL, M.E. Update on canine and feline fungal disease. **Veterinary Clinical Small Animal Practice**, v. 33, p. 721-747, 2003.
8. LORETTI, A.P. et al. Criptococose cutânea em felinos no Rio Grande do Sul: Relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETRINÁRIA, 10, 2001. Pirassununga, SP. **Resumos...** Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2001. 117p.
9. PEDROSO, R.S.; CANDIDO, R.C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. **NewsLab**. 77. ed., 2006.
10. PEREIRA, A.P.C.; COUTINHO, S.D. Criptococose em cães e gatos – revisão. **Clínica Veterinária**, n. 45, p. 24-30, 2003.
11. PINTO FILHO, S.T.L. et al. **Criptococose nasal e cutânea em felino. Relato de caso**. Disponível em: <<http://pucrs.campus2.br>>. Acesso em: 15 mar. 2008.
12. OLIVEIRA, I.A.; NOBRE, M.O.; FERREIRO, L. Pesquisa de criptococose em cães atendidos no hospital de clínicas veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 253-258, 2005.
13. SANT'ANA, F.J.F. et al. Criptococose em felino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 4, p. 333-334, 1999.
14. SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Doenças fúngicas da pele. In: MILLER & KIRK, **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. Cap. 5, p. 301-359.
15. TON WILEMSE, Candidíase. In: MILLER & KIRK, **Dermatologia clínica de cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. 143p.

3.3 Dermatofitose – micoses superficiais

Conceito

A dermatofitose é uma infecção fúngica que acomete as camadas superficiais da pele e áreas corneificadas da pele e unhas.

Etiologia e Patogênese

As doenças cutâneas, tanto as bacterianas quanto as fúngicas, no ser humano e nos animais ficam favorecidas pelo clima nos países tropicais e subtropicais^[1]. Em cerca de 95% dos gatos acometidos por dermatofitoses, os agentes causadores são o *Microsporum canis* e o *Thicophyton mentagrophytes*^[3,4]. As infecções causadas pela *Malassezia pachydermatis* e pela *Candida albicans* são incomuns^[3].

Diagnóstico

Para se chegar ao diagnóstico de dermatofitose é importante fazer o teste de fluorescência pela luz de Wood, exames microscópicos, bem como culturas fúngicas.

a) Epidemiologia

A dermatofitose é uma enfermidade extremamente contagiosa entre os animais e dos animais para o homem. O modo de transmissão é por meio do contato direto com os artróporos e as hifas. Os organismos podem estar presentes nos animais, no ambiente (pelos), e escovas e pentes e na cama do animal, podendo permanecer, por vários anos, se em condições secas. De 5% a 35% dos gatos são portadores de *M. canis*^[3].

b) Sinais clínicos

Os aspectos clínicos de uma infecção dermatofítica variam muito^[4]. Os gatos de pelos longos têm maior probabilidade de sofrer infecção sintomática, comparados aos de pelo curto^[2]. Os sinais clínicos consistem de lesões alopecicas e escamosas, crescimento centrífugo, podendo ter várias configurações^[1]. Os locais mais comumente afetados são a cabeça e as extremidades^[2]. Em gatos persas ocorre o envolvimento nodular da pele e subcutâneo adjacente. A manifestação clínica mais comum é uma área alopecica maculosa (com um aspecto “comido de traça”), com os pelos partidos com aspecto de “barba curta”. Podem-se observar, ainda, lesões mínimas, caspa esparsa e eritema.

Os fatores de risco para desenvolver essa doença são: imunossupressão, desnutrição, más condições sanitárias, principalmente em ambientes onde vivem muitos gatos e onde não se realiza quarentena para os novos gatos^[2]. O teste de fluorescência pela lâmpada de Wood poderá ser feito, ligando-se a lâmpada por cinco minutos antes do exame. Os pelos suspeitos devem ficar expostos por cinco minutos, em uma sala escura. Em casos positivos, o fungo ficará fluorescente verde-maçã. Poderão ocorrer muitos falso-positivos e falso-negativos (50%), principalmente se houver resquício de certos tipos de xampus, portanto esse teste deve ser utilizado apenas como instrumento de triagem^[2].

c) Patologia

As lesões do *Microsporum canis* em gatos são coleções focais de material descamativo denominado “cinza de cigarro”^[3]. Eles podem apresentar ocasionalmente dermatite miliar com muitas crostas de pequenas dimensões, ou otite ceruminosa^[4].

d) Diagnóstico laboratorial

Os pelos devem ser analisados no exame microscópico, preparando a amostra com hidróxido de potássio (KOH). Biópsia de pele pode ser realizada quando existir suspeita de outra doença cutânea^[2].

e) Diagnóstico diferencial

Leishmaniose, dermatites e sarna.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material destinado ao cultivo (pelos) deve ser coletado na periferia da lesão, ou aqueles que tenham tido fluorescência com a lâmpada de Wood. A remoção pode ser feita com o auxílio de pinça. Também devem ser colhidos pelos para cultura fúngica e identificação^[3].

Referências bibliográficas

1. MACIEL, A.S. Dermatofitose em cães e gatos. Uma revisão - Primeira parte. **Clínica Veterinária**, n. 56, p. 48-56, 2005.

2. NORSWORTHY, G.D. Dermatofitose. In: NORSWORTHY, G.D. et. al. **O paciente Felino**. São Paulo: Manole. 2004, 815p.
3. WILKINSON, G.T.; HARVEY R.G. **Atlas Colorido de Dermatologia dos Pequenos Animais**. Guia para Diagnóstico. 2. ed., São Paulo: Manole, 1996, cap. 7, 304p.
4. WILLENSE, T. Doenças fúngicas. In: WILLENSE, T. **Dermatologia Clínica de Cães e Gatos**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998, cap. 3, 143p.

3.4 Esporotricose

Conceito

A esporotricose é uma micose subcutânea piogranulomatosa causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenkii*^[6,7], que acomete vários animais, inclusive o homem^[8]. Pode apresentar-se em diversas formas, entre elas a cutânea, localizada ou disseminada, a linfocutânea e a sistêmica^[7]. Hoje é considerado um importante patógeno de felinos domésticos. Tem distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais^[8].

Etiologia e Patogênese

O fungo *Sporothrix schenkii* é um fungo geófilo, que se apresenta na forma micelial, vive em locais com temperaturas variando entre 25 e 30°C, e é considerado sapróbio de cascas de árvores e de solos ricos em matéria orgânica e vegetação. Cresce principalmente em locais quentes e úmidos. Quando está em sua forma parasita, passa a levedura (37°C), crescendo em lesões dermoepidérmicas, viscerais e ósseas^[4].

Diagnóstico

Para se chegar ao diagnóstico de esporotricose são importantes os dados da anamnese, os sinais clínicos e os exames complementares, que incluem a avaliação das lesões e o isolamento do agente (padrão ouro) ou detecção pelo exame direto.

a) Epidemiologia

A transmissão da doença ocorre pela inoculação direta do agente, por meio de espinhos de plantas, farpas e arranhões, tendo o gato um papel importante na epidemiologia dessa enfermidade. Frequentemente essa doença é adquirida por meio de trauma na derme ou contaminação de feridas, provocando lesões ulceradas com exsudato serossanguinolento^[8]. Os gatos contraem a doença geralmente durante o acasalamento ou disputando território.

Existem cada vez mais relatos zoonóticos de gatos que se infectam pelo *Sporothrix*, tanto na forma sintomática quanto na forma assintomática, podendo transmitir o agente para outros animais e para o homem^[5]. Os gatos têm um grande número de organismos em lesões cutâneas, o que pode caracterizar um potencial zoonótico da esporotricose. Ele elimina o fungo através das fezes e exsudatos, o que pode levar ao desenvolvimento da doença em deprimidos imunologicamente^[2]. A esporotricose felina é considerada rara, porém é transmissível por mordeduras, arranhaduras, ou pelo contato da pele ou mucosa com o exsudato de lesões^[9]. Os gatos machos não castrados estão mais predispostos a se infectarem com o *S. schenkii* devido ao hábito de cavar buracos e afiar as garras em troncos de árvores contaminadas pelo fungo^[10].

b) Sinais clínicos

Nos felinos, a forma cutânea é a mais frequente^[3]. Manifesta-se por meio de lesões na pele que se apresentam exsudativas e crostosas. Elas podem estar disseminadas pela cabeça, pela cauda e pelos membros, além de se observar hipertermia, deformação do espelho nasal e secreção nasal purulenta bilateral^[3,7,11]. Os sinais clínicos e os insucessos com os tratamentos à base de antibióticos podem levar à suspeita de esporotricose.

c) Patologia

As lesões incluem elevações cutâneas circulares, exsudativas, castanho-avermelhadas e formação de crostas localizadas principalmente na cabeça, na cauda e nos membros^[3,7,11]. No exame histopatológico os achados incluem intensa reação histiocitária epitelioid e plasmocitária e, algumas vezes, granulomas.

d) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo pode ser obtido pelo cultivo de amostras clínicas. Por meio do exame microscópio direto pode-se realizar a pesquisa do agente em amostras de pus ou de crosta, amostras de suave oral e ocular, e cortes histológicos de pele. Para a melhor observação do agente, pode-se clarificar a amostra com potassa, podendo, ainda, ser realizadas as colorações com Gram ou Giensa^[1]. Testes sorológicos podem ser realizados por meio da colheita de sangue sem anticoagulante, pois os testes de aglutinação são os mais sensíveis.

Indica-se também a colheita de sangue para a realização de hemograma e cultivo micológico e teste diagnóstico para FIV-FeLV. Em amostras diretas podem ser observadas células leveduriformes com formato oval. Quando a 25°C, apresentam-se enegrecidas e enrugadas, e na microscopia mostram hifas finas, hialinas e segmentadas. No cultivo a 37°C, as colônias em microscopia apresentam células leveduriformes, alongadas e com broto único^[8].

e) Diagnóstico diferencial

Dermatofitoses e dermatites.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Em casos de suspeita, indica-se a realização de tricotomia, limpeza local e colheita de pele e pelos da região afetada para exame micológico e realização de citologia por *imprint* em lâmina^[3].

Pode-se enviar ainda pus, exsudato, material de curetagem ou suave de lesões abertas, e aspirado com seringa de nódulos cutâneos. Esse aspirado pode ser facilitado injetando-se 0,1ml de solução salina estéril, seguida de aspiração, podendo-se utilizar esse material para cultivo.

Referências bibliográficas

1. CONANT, N.F.; SMITH, D.T.; BAKER, R.D.; CALLAWAY, J.L. **Micología**. 3ed. Philadelphia: Interamericana, 1971. 592p.
2. DUNSTAN, R.W. et al. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. **J Am Acad Dermatol**, v. 15 n. 1, p. 34-45, 1986.
3. JESUS, J.R.; MARQUES, S.M.T. Esporotricose cutânea em gatos – relato de caso. **Clínica Veterinária**, n. 65, p. 72-74, 2006.
4. KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Sporotrichosis. In: JOHN WILLARD RIPPON. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Fibeger, 1992. p. 707-729.

5. LARSSON, C.E., et al. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 5, p. 351-358, 1989.
6. MADRID, I.M., et al. Esporotricose óssea e cutânea em canino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 441-443, 2007.
7. MATTEI, A.S. et al. **Esporotricose felina: contribuição para o estudo de características epidemiológicas e prognósticos da enfermidade**. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.http://www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CA_00906.rtf>. Acesso em: 11 jul. 2008.
8. MEINERS, A.R.M. et al. Felino doméstico como transmissor da esporotricose em trabalhador rural – relato de caso. Comunicação científica. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, p. 149-151, 2007.
9. SHUBACH, T.M.; SHUBACH, A. de O. Esporotricose em gatos e cães – revisão. **Clínica Veterinária**, n. 29, p. 21-23, 2000.
10. SHUBACH, T.M.P. et al. *Sporothrix schenkii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Mycopathologia**, v. 153, p. 83-86, 2001.
11. XAVIER, M.O. et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1961-1963, 2004.

3.5 Histoplasmose

Conceito

A histoplasmose é uma zoonose causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum var. capsulatum*, que infecta os hospedeiros através da inalação do conídeos, passa para fase leve-duriforme na temperatura do corpo, ao serem fagocitados são distribuídos de forma sistêmica para os diferentes órgão e tecidos, formando processos inflamatórios granulomatosos e necrose^[3,6,7,13].

Etiologia e Patogênese

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico que prefere as condições de solos úmidos ou molhados enriquecidos de compostos nitrogenados, derivados de matéria orgânica em decomposição, ou excremento de aves e morcegos, podendo sobreviver em ampla gama de temperaturas ambientais (de -18 a 37°C). O estágio micelial no solo (fase saprofítica) produz microaleuriosporos e macroaleuriosporos, que são a fonte de infecção para os mamíferos^[2]. Existem duas espécies representantes desse gênero, *H. capsulatum*, que causam a histoplasmose, e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, que causa linfangite enzoótica em equinos.

A infecção pelo *H. capsulatum* está associada a um quadro que interfere principalmente no sistema reticuloendotelial e possui duas formas: uma benigna, que envolve os pulmões, e outra disseminada, que abrange vários órgãos^[1]. Os fungos penetram por via respiratória e fazem um quadro semelhante ao da tuberculose, formando um foco primário de linfadenite e linfagite, com posterior cicatrização^[5]. Podem aparecer sintomas pulmonares no homem, com linfoadenopatia, porém a transmissão zoonótica direta de animais infectados é improvável, pelo fato de a fase leve-duriforme não ser tão infecciosa quanto a fase micélica^[8].

A disseminação linfo-hémática secundária pode ocorrer, acarretando lesões no fígado, pulmão, cérebro, rins, articulações e na pele dos felinos^[5]. Após a infecção dos pulmões pelo *H. capsulatum*, ocorre um período de incubação, que é em torno de 12 a 16 dias. As microconídeas convertem-se à forma infectante nos pulmões e são fagocitadas pelos macrófagos, ocorrendo uma disseminação sistêmica por meio dos linfonodos regionais^[10].

Diagnóstico

O diagnóstico é um desafio, pois muitas vezes as queixas dos proprietários são vagas, tais como febre, perda de peso, depressão e anorexia, e menos de 50% dos gatos infectados demonstram disfunção específica de órgão^[6]. Sendo assim, o diagnóstico definitivo é realizado por meio da identificação de microrganismos levedurais em preparos citológicos ou pela histologia ou isolamento do agente a partir de amostras clínicas^[12].

a) Epidemiologia

A histoplasmose é uma doença não contagiosa, cuja infecção primária se dá pela inalação de microconídios presentes nas fezes de aves e morcegos^[7,13]. O *H. capsulatum* normalmente está presente no solo, em terrenos contaminados por excrementos de pássaros e morcegos, servindo de fonte de infecção para o homem e os animais^[3,8,11]. O acúmulo de fezes de morcegos pode criar um ambiente favorável para a proliferação de fungos^[4]. Gatos que vivem dentro de casa também podem apresentar histoplasmose, pois a terra dos vasos de plantas pode ser a origem da infecção^[6]. Não existem relatos da transmissão direta entre o homem e os animais^[3].

b) Sinais clínicos

Quando a doença ocorre a forma sistêmica, os animais podem apresentar sinais como diarreia, pneumonia granulomatosa com tosse crônica e dispneia, granulomas generalizados, hepatomegalia, linfoadenopatia. As lesões ósseas, cutâneas e oculares são menos frequentes^[13]. Em um relato de caso clínico de um gato foram descritos estes sinais clínicos: crescimento de aspecto esponjoso, sanguinolento, com secreção purulenta na região nasal, com evolução de 2 meses, não responsivo a antibioticoterapia^[2].

Em avaliações radiográficas do tórax de gatos com pneumonia fúngica, frequentemente se observa um padrão intersticial ou nodular intersticial.

c) Patologia

Os achados macroscópicos são inespecíficos, podendo incluir quadros de pneumonia granulomatosa, hepatomegalia e linfoadenopatia. Na histologia, frequentemente são observadas reações granulomatosas com a presença de células gigantes e blastoconídios intracelulares compatíveis com *Histoplasma capsulatum* nos diferentes órgãos.

No exame citológico os achados incluem formas redondas, algumas ovais, pequenas, de coloração discretamente azulada, compatível com o *H. capsulatum*, sendo encontrados tanto na forma intracelular como extracelular nos macrófagos^[2].

d) Diagnóstico laboratorial

O exame sorológico tem uma alta porcentagem de falso-negativos em gatos, por isso não é o teste mais confiável disponível atualmente. Exames hematológicos, perfil bioquímico e exame radiográfico também são citados, no entanto o cultivo fúngico é que possibilita o diagnóstico definitivo^[9]. Comumente, observa-se anemia em gatos com infecção crônica. Ocassionalmente, o fungo pode ser observado na corrente sanguínea em células mononucleares e eosinófilas.

A soromicologia pode ser realizada por meio da imunodifusão radial dupla com抗ígenos padronizados e soros controles. Podem ser feitos, ainda, esfregaços e cultura fúngica. Quando é encaminhado material para cultura fúngica, pode-se demorar até 17 dias para isolar o patógeno^[3].

e) Diagnóstico diferencial

Sinais de neoplasia e micose sistêmica são semelhantes, pois ambas ocorrem pela invasão e proliferação de células eucarióticas. A histoplasmose e outras micoses tendem a ser mais frequentes em animais jovens do que em gatos com neoplasias. Outras doenças que fazem parte do diagnóstico diferencial são a tuberculose, a nocardiose e outras infecções bacterianas crônicas.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Deve-se enviar sangue para a realização de hemograma e *imprint* da lesão para exame citológico. No hemograma, normalmente, não há evidência de grandes alterações. No entanto, frequentemente se observa eosinofilia em decorrência das lesões de pele. Pode-se enviar ao laboratório exsudato, amostras colhidas por punção por agulha fina dos nódulos e linfonodos, liquor e lavado broncoalveolar para a realização de exame citológico. Também pode ser enviado ao laboratório soro, amostra de lavado broncoalveolar, sangue e biópsia de tecido acometido.

Referências bibliográficas

1. BENNETT, D. Sistema musculoesquelético. In: **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed., São Paulo: Roca, cap. 8, 2006, 590p.
2. CARNEIRO, R.A., LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B. Histoplasmose cutânea em gato: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**. v. 57, p. 158-161, 2005.
3. FERNANDES, C.G.N.; MOURA, S.T.; AVILA, M. Histoplasmose em cão na área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: relato de caso. **Clínica Veterinária**, n. 46, p. 44-46, 2003.
4. GALVÃO DIAS, M.A., et al. Pesquisa de *Histoplasma Capsulatum* em morcegos no estado de São Paulo, Brasil. COMBRAVET, Anais... [online]. Disponível em: <www.sovergs.com.br/combravet2008/anais>. Acesso em: dez. 2008.
5. GUIDA, N. Contribución al conocimiento de la histoplasmosis, coccidioidomicosis y aspergillosis aviar, em animales domésticos de la República Argentina. **Revista Argentina de Micología**. v. 22, p. 4-28, 1999.
6. GRACE, S.F. Histoplasmose. In: **O Paciente Felino**. 2. ed., São Paulo: Manole, cap. 72, 2004, 815p.
7. KROHNE, S.G. Canine systemic fungal infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 30, n. 5, p. 1084-1090, 2000.
8. NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanaba Koogam, 2001, 1084p.
9. SHERDING, R.G. Systemic Mycoses. **Saunders manual of small animal practice**. Columbus: W.B. Saunders, p. 133-140, 1999.
10. TYLER, R.D.; COWELL, R.L.; MEINKOTH, J.H. Cutaneous and Subcutaneous: masses, cysts, ulcers and fistulous tracts. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Diagnostic Cytology of the Dog and Cat**. California: American Veterinary Publications, 1993, p. 21-46.
11. UNIS, G.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Histoplasmose Disseminada no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n. 37, v. 6, p. 463-468, 2004.
12. WILLOUGHBY, K.; BENNETT, M. Outras infecções. In: **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed., São Paulo: Roca, cap. 30, 2006, 590p.
13. WOLF, A.M. Histoplasmose. In: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 378-383, 1998.

4. PRINCIPAIS DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS GATOS

4.1 Ancilostomose

Conceito

É a infestação por *Ancylostoma brasiliense* e *Ancylostoma tubaeforme* que ocorre tanto em cães como em gatos, é uma zoonose, cursa com diarréia e fezes escurecidas.

Etiologia e epidemiologia

Ambos os agentes, quando adultos, vivem no intestino delgado, cursando com diarréia.

Ancylostoma brasiliense possui grande importância para a saúde pública, pois é uma zoonose que dá origem à larva *migrans cutanea*. Os gatos são infectados quando ingerem as fezes contaminadas ou quando a larva penetra pela pele. Os ratos podem atuar como hospedeiro de transporte^[1]. A transmissão de *Ancylostoma brasiliense* depende de fatores como a eliminação de ovos nas fezes por cães infectados, amostras fecais deixadas em local úmido por 2 a 8 dias, e um hospedeiro suscetível que ingira as larvas ou que uma larva ativa infecte através da pele^[2].

Características morfológicas: *A. brasiliensis* e *A. tubaeforme* apresentam dois e três pares de dentes em cada lado da cáspula bucal, respectivamente. O verme adulto possui, em média, 10mm. Os machos apresentam uma bolsa copuladora e dois espículos de tamanho médio. As fêmeas terminam afiladamente e apresentam abertura vulvar no meio do corpo. Os ovos medem de 12 a 15mm.

Em um estudo realizado, avaliando a frequência de helmintos em gatos “necropsiados”, evidenciou-se uma incidência elevada de *A. brasiliense* e de *A. tubaeforme*, com 38% e 14%, respectivamente^[4]. O *Ancylostoma* spp. desenvolve-se mais em climas quentes e úmidos, e é provável que essa seja a causa da alta incidência desse parasita no Brasil.

Diagnóstico

Pelo fato de não ser possível observar macroscopicamente o agente parasitário infectante, na maioria das vezes, além de estar presente uma infecção mista, em muitos casos recomenda-se sempre realizar teste específico antes de se instituir a terapia.

a) Características clínico-patológicas

A infecção cursa com diarreia do intestino delgado, e a infecção por *A. tubaeforme* leva à ocorrência de fezes escuras, pelo fato de esse parasita ser hematófago. Alguns filhotes apresentam deficiência de desenvolvimento corporal. Ocassionalmente, podem apresentar anemia por deficiência de ferro, melena e hematoquesia.

Gatos filhotes são infectados por via transmamária ou ingestão dos ovos^[3]. Outras vias de transmissão são a percutânea e a transplacentária, embora alguns autores, como Urquhart (1996), citem que não existe evidência de transmissão transmamária nem transplacentária. *A. brasiliense* leva a hipoalbuminemia pelo extravasamento intestinal de plasma, mas pelo fato de não ser hematófago, tem pouca importância patogênica, provocando apenas discretos distúrbios digestivos e diarreia ocasional^[5]. Uma proporção das L₃ que atingem o pulmão migra para os músculos esqueléticos, onde permanecem latentes, podendo recomeçar a migração meses ou anos mais tarde, amadurecendo no intestino do hospedeiro. Estresse, doenças graves e corticoterapia podem precipitar essas infecções^[5]. O sangue ingerido não é metabolizado e sim reabsorvido no duodeno, fazendo com que as fezes fiquem escuras.

b) Diagnóstico laboratorial

Devido à grande quantidade de liberação de ovos através das fezes, facilmente se detecta a infecção severa por meio do teste de flutuação fecal^[3] e de esfregaço direto em salina. *A. tubae-forme* é moderadamente hematófago, podendo ser evidenciada anemia microcítica hipocrômica. Indica-se a realização de hemograma e as mensurações séricas de proteína total e albumina para avaliar o grau de anemia e hipoalbuminemia.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Os materiais a ser enviados ao laboratório de parasitologia são fezes colhidas do ambiente ou da ampola retal. Caso o exame não seja realizado imediatamente, indica-se mantê-lo sob refrigeração.

Referências bibliográficas

1. GUNN-MOORE, D.; MILLER, J.B. The cat with weight loss and a good appetite. In: RAND, J. **Problem-based feline medicine**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007, cap. 7, p. 301-329.
2. LABARTHE, N. et al. A survey of gastrointestinal helminths in cats of the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 133-139, 2004.
3. MARKS, S.L.; WILLARD, M.D. Diarrhea in kittens. In: AUGUST, J.R. **Feline internal medicine**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, v. 5, cap. 15, p. 133-144.
4. MUNDIM, T.C.D. et al. Freqüência de helmintos em gatos de Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56 n. 4, p. 562-563, 2004.
5. Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1996.

4.2 Infecção por cestódeos

Conceito

A infecção por cestódeos em gatos ocorre principalmente pelos agentes *Dipylidium caninum* e *Taenia taeniaeformis*.

Etiologia e epidemiologia

Os cestódeos são parasitas do intestino delgado e tanto o *D. caninum* quanto o *T. taeniaeformis* requerem um hospedeiro intermediário para completar seu ciclo de vida^[1]. Proglotes grávidas podem romper-se dentro do intestino ou permanecer intactas, sendo observadas nas fezes ou ao redor do ânus do gato^[1]. As proglotes grávidas são disseminadas nas fezes a partir do reto, contaminando os pelos perianais e a cama. A maioria dos gatos remove essa contaminação perineal pela lambadura, mas segmentos ressecados podem ser encontrados em raças de pelo longo^[2].

- *Características morfológicas:* As proglotes possuem 1cm de comprimento e tem, coloração creme com um centro marrom-avermelhado. Quando ficam completamente ressecadas, tornam-se flocos quebradiços de 3 a 4mm, com coloração âmbar^[2]. O *D. caninum* apresenta proglotes com lateral dilatada.

- *Ciclo biológico:* Os hospedeiros intermediários do *D. caninum* são a pulga (*Ctenocephalides felis*)^[1] e o piolho picador (*Felicola subrostratus*)^[2], e dos *T. taeniaeformis* são os roedores^[1].

As larvas das pulgas ingerem os ovos do *D. caninum* e as larvas infectantes dos cestoides ficam encistadas na pulga. O gato se infecta ao se coçar e se lamber, ingerindo accidentalmente a pulga. No intestino delgado a pulga é digerida, liberando a forma larvar cisticeroide. O escólex se evagina e se desenvolve, e mais tarde as proglotes grávidas saem nas fezes.

Diagnóstico

a) Características clínico-patológicas

Os sinais clínicos das grandes infestações por cestódeos são prurido anal, vômito, diarreia, perda de peso e, ocasionalmente, obstrução intestinal. Em infestações mais brandas os gatos são assintomáticos^[1]. Os cestódeos são um dos únicos parasitas intestinais que podem ser vistos macroscopicamente nas fezes^[1].

Na infecção por *T. taeniaeformis* o rato se infecta pela ingestão de ovos. Os embriões hexacantos penetram na mucosa intestinal, caem na corrente circulatória e se localizam no fígado, onde crescem e se tornam infectantes em aproximadamente 2 meses. O gato, ao caçar o rato, acaba ingerindo o fígado deste com a forma larvar encistada, tornando-se infectado também^[2].

As infecções parasitárias nem sempre causam alterações hematológicas, mas em alguns casos pode ser observada eosinofilia, e em casos severos comumente se observam baixas concentrações de proteína sérica.

Quando o único sinal clínico apresentado pelo animal é a perda de peso, deve-se suspeitar de nutrição inadequada ou alterações endócrinas, tais como a diabetes *melitus* e o hipertireoidismo, ou outras doenças sistêmicas, tal como insuficiência renal crônica^[3]. Em casos de animais com sinais clínicos digestivos, deve-se incluir no diagnóstico diferencial hipertireoidismo, linfosarcoma alimentar, enterite linfo-histoplasmocitária (doença inflamatória intestinal) e insuficiência pancreática exócrina.

b) Diagnóstico laboratorial

O proprietário comumente observa as proglotes nas fezes ou aderidas ao pelo na região perineal dos felinos, especialmente aqueles que possuem pelos longos. O diagnóstico é baseado na visualização de ovos e de proglotes nas fezes por meio do exame direto ou de flutuação fecal. O diagnóstico definitivo do parasita é feito por meio da característica morfológica da proglótide.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O material a ser colhido para exame de flutuação fecal são as fezes, que deverão ser enviadas conservadas sob refrigeração.

Referências bibliográficas

1. GUNN-MOORE, D.; MILLER, J.B. The cat with weight loss and a good appetite. In: RAND, J. **Problem-based feline medicine**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007, cap. 17, p. 301-329.
2. NASCIMENTO, E. *Taenia taeniaeformis*: aspectos da relação hospedeiro-parasita. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 3, p. 319-323, 1982.
3. TRESS, A.J. Endoparasitas. In: CHANDLER, E.A. et al. **Clínica e terapêutica em felinos**. São Paulo: Roca, 1996, cap. 31, p. 568-577.

4.3 Criptosporidiose

Conceito

É a infecção pelo protozoário *Cryptosporidium parvum*, que ocorre em diversas espécies de vertebrados, tais como peixes, répteis, mamíferos e pássaros.

Etiologia e epidemiologia

O *C. parvum* se replica na microvilosidade intestinal e no epitélio respiratório de vertebrados^[4]. Na maioria das vezes, é um parasita do intestino delgado que libera os oocistos, que podem romper-se liberando esporozoítos dentro do intestino, resultando numa infestação crônica, ou podem ser liberados no ambiente, onde permanecem viáveis por muitos meses.

Características morfológicas: apresenta um oocisto muito pequeno (4 a 4,6µm) com formato esférico a subesférico, dificultando sua visualização no microscópio, principalmente quando as fezes apresentam uma pequena quantidade de oocistos.

Ciclo biológico: o ciclo de vida do *Cryptosporidium* ocorre inteiramente dentro de somente um hospedeiro^[7]. A criptosporidiose tem sido relatada em gatos com imunidade ineficiente ou com doenças mediadas pelo sistema imunes, tais como FeLV, doença inflamatória intestinal e linfossarcoma intestinal^[7]. A infecção por esse agente tem sido diagnosticada em associação com infiltrados celulares intestinais, indistinguíveis daqueles vistos na doença inflamatória intestinal em gatos^[2].

Diagnóstico

Apesar da alta taxa de soroprevalência por *C. parvum* em gatos, seu diagnóstico laboratorial em gatos espontaneamente infectados é difícil devido a sua liberação intermitente e à característica morfológica do oocisto desse protozoário. A detecção por microscopia normalmente ocorre quando os felinos estão apresentando sinais clínicos da doença e quando o número de oocistos é relativamente alto^[4].

a) Características clínico-patológicas

As infecções normalmente são subclínicas, no entanto, podem ocorrer sinais de diarreia^[5,6] do intestino delgado, podendo ser aguda ou crônica ou resultar em duodenite linfocítica plasmocitária. Em filhotes severamente infectados poderá ocorrer perda de peso, anorexia e desidratação. Esses protozoários podem ser patógenos comensais, dependendo da circunstância. A criptosporidiose poderá, em gatos imunocompetentes, desenvolver infecções somente no TGI. No entanto, quando imunossuprimidos, poderão ocorrer também no fígado, no pâncreas, na vesícula biliar e no trato respiratório^[7]. A infecção por *C. parvum* em filhotes e gatos imunossuprimidos pode ser desde assintomática até apresentar diarreia média a transitória, ou até mesmo uma diarreia severa apresentando síndrome da má absorção^[2,4].

Nos casos em que o quadro clínico é evidente, os principais sinais observados são: diarreia profusa e líquida e infarto dos linfonodos mesentéricos devidos à hipersecreção intestinal e à má absorção^[7].

Uma coloração especial com Kinyoun's Carbofuchsin pode ser usada ou um microscópio com contraste de fase para identificar o *Cryptosporidium*^[7]. Seu cisto é tão pequeno que é difícil identificar sem uma coloração especial ou técnicas avançadas de microscopia^[7]. A observação do oocisto do *Cryptosporidium* é difícil pelo fato de ele ser muito pequeno e sua liberação ser intermitente nas fezes.

b) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é realizado por meio do esfregaço fecal e corado com Giemsa, técnica modificada de Ziehl-Neelsen, técnica modificada de Kinyoun acid-fast ou uso de imunofluorescência^[1,3]. As técnicas de microscopia detectam facilmente quando os sinais clínicos estão presentes e os números de oocistos são relativamente altos. Quando os sinais clínicos são brandos ou inexistentes, os testes deverão ser processados repetidas vezes, com múltiplas amostras fecais para serem detectados^[1]. Em um estudo foram comparadas as técnicas de Ziehl-Neelsen, técnica de imunofluorescência direta e três testes ELISA, e foi observado que o teste proSpecT microplat⁴ ELISA foi o mais sensível para o *Cryptosporidium*^[3].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico da criptosporidiose, devem-se encaminhar as fezes para avaliação em flutuação em sulfato de zinco ou solução hipersaturada de açúcar. Exames de fezes submetidos ao laboratório, com suspeita de *Cryptosporidium*, deverão estar preservados em formalina para minimizar o risco de infecção humana. Outros métodos de identificação incluem o teste de ELISA, no entanto ainda não foi comprovada sua eficiência na espécie felina. Poderá ser utilizado também o teste de PCR ou microscopia eletrônica de espécimes intestinais.

Referências bibliográficas

1. GARCIA, L.S.; BREWER, T.C.; BRUCKNER, D.A. Fluorescent detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 119-121, 1987.
2. LAPPIN N.R. et al., Cryptosporidiosis and inflammatory bowel disease in a cat. **Feline practice**. v. 25 p. 10-13, 1997.
3. MARKS, S.L.; HANSON, T.E.; MELLI, A.C. Comparison of direct immunofluorescence, modified acid-fast staining, and enzyme immunoassay techniques for detection of *Cryptosporidium* sp. in naturally exposed kittens. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 225, p. 1549-1553, 2004.
4. MARKS, S.L., WILLARD, M.D. Diarrhea in kittens. In: AUGUST, J.R. **Feline Internal Medicine**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, v. 5, cap. 15, p. 133-144.
5. ROBERTSON, I.D. et al. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonosis. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 1369-1377, 2000.
6. TZANNES, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium*, Giardia and Isospora species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 10, p. 1-8, 2008.
7. ZORAN, D.L. The cat with signs of acute small bowel diarrhea. In: RAND, J. **Problem-based feline medicine**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007, cap. 32, p. 697-733.

4.4 Giardíase

Conceito

A giardíase é uma frequente causa de enterite em humanos e animais. Em gatos pode causar diarréia por má absorção dos alimentos e aumento da mortalidade^[5,7].

⁴ Remel proSpecT microplat, Lenexa, KS.

Etiologia e epidemiologia

A *Giardia lamblia*, também conhecida por *Giardia duodenalis*, parasita o jejuno, o íleo e o intestino grosso, sendo a responsável pela giardíase^[1].

Características morfológicas: os oocistos são de 9 a 13µm de tamanho. Os trofozoítos são ligeiramente maiores, em formato de gota, possuem quatro pares de flagelos e são binucleados^[7].

Ciclo biológico: cistos resistentes são liberados para o meio ambiente através das fezes contaminando água e comida, podendo ser ingeridos por outros gatos. A giárdia pode ocorrer na forma cística, que é eliminada nas fezes, podendo sobreviver durante meses no ambiente e infestar outros animais, e uma forma trofozoíta que se desenvolve no intestino delgado por meio dos cistos que foram ingeridos causando sinais clínicos^[1]. Não existe hospedeiro específico para a giárdia, tendo uma grande distribuição mundial em áreas tropicais e temperadas. Os cistos são sensíveis à dessecação, mas podem sobreviver meses em ambientes frios e úmidos.

Os relatos de prevalência de criptosporidiose e giardíase em gatos são variáveis, porém ainda frequentemente elevados. Estudos mostram uma prevalência superior a 12% e 80%, respectivamente^[3]. Essa variabilidade ocorre parcialmente devido à técnica usada para detecção, mostrando uma maior incidência nos casos diagnosticados por PCR para detectar *Giardia duodenalis*^[6].

Diagnóstico

O diagnóstico da *Giardia* sp. poderá ser feito por meio da identificação dos trofozoítos ou dos cistos nas fezes^[2].

a) Características clínico-patológicas

A patogênese da infecção por *Giardia* sp. ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que envolva a má absorção, distúrbios de função enzimática nas vilosidades intestinais e, possivelmente, a produção de enterotoxina. Os animais infectados por *Giardia* sp. liberam os cistos mesmo após o tratamento. Não existe infecção extraintestinal nem ocorre infecção transplacentária ou transmamária^[1].

As infecções podem ser subclínicas ou causar episódios agudos ou crônicos de diarreia de intestino delgado, onde a má absorção intestinal podendo causar fezes pastosas fétidas e com muco. Os sinais clínicos da giardíase variam de diarreia do intestino delgado ao grosso, esteatorreia, borborigmo e perda de peso. Raramente a infecção é grave; ela causa principalmente desidratação, letargia e anorexia^[1]. Diarreia líquida a pastosa, e aumento da frequência e da quantidade da defecação são os sinais clínicos mais comuns^[5,7].

Infecções por *Cryptosporidium* sp., *Isospora felis* e *Toxoplasma gondii* apresentam sinais clínicos semelhantes à giardíase. Tanto a *Giardia* sp. quanto a *Isospora felis* são mais comuns em gatos com menos de 6 meses de idade, e *Cryptosporidium* sp. e *I. felis* são prevalentes nas épocas frias do ano, como o final do outono e o início do inverno^[6].

b) Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico de giardíase, o hemograma pode revelar eosinofilia, e em casos severos, hipoproteinemia. A flutuação em solução supersaturada de açúcar provocará a distorção dos cistos, tornando-os irreconhecíveis para diagnosticar giardíase^[1]. O método de flutuação fecal em sulfato de zinco é o teste de escolha quando existe suspeita de infecção por *Giardia lamblia*^[4], uma vez que é o teste mais prático e acurado que existe. Esse teste deverá ser realizado em três amostras, colhidas ao longo de 5 dias^[4], identificando 95% dos animais infectados. Em um estudo, comparando-se o teste de flutuação fecal e o teste ELISA, evidenciou-se uma baixa sensibilidade

da flutuação fecal identificando somente metade dos animais infectados e dando como falso-negativo acima de 25% dos animais^[2]. O teste ELISA pode detectar a infecção mesmo na ausência de cistos detectáveis^[2].

A infecção por *Giardia duodenalis* pode não ser diagnosticada por métodos convencionais de microscopia. O diagnóstico microscópico da *Giardia* sp. nem sempre é possível porque os cistos são liberados intermitentemente nas fezes, além de serem muito delicados. Ademais, muitos artefatos podem mimetizar a morfologia dos cistos da *Giardia* sp.^[2]. O teste ELISA, específico para cães e gatos, é um teste de imunoensaio enzimático rápido que pode ser realizado em fezes frescas, fezes previamente congeladas, ou fezes armazenadas em 2 a 7°C por até 7 dias^[2]. A vantagem desse teste é que ele é simples e rápido (8min)^[2].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para o diagnóstico da doença devem ser enviadas ao laboratório de parasitologia fezes para exame de flutuação fecal e esfregaço direto em salina. As fezes podem ser colhidas frescas ou obtidas pelo aspirado duodenal, no qual se devem instilar 10ml de solução salina no duodeno através da sonda introduzida pelo canal de biópsia, nos casos de endoscopia, ou por agulha e seringa durante a laparotomia exploratória, e aspirar pelo menos 3ml de material para a centrifugação imediata e exame microscópico do *pellet* em busca do trofozoíta.

Referências bibliográficas

1. CRYSTAL, M.A. Giardíase. In: NORSWORTHY, G.D. et al. **O Paciente Felino**. 2. ed., São Paulo: Manole, 2004, 815p.
2. MARKS, S.L.; WILLARD, M.D. Diarrhea in kittens. In: AUGUST, J.R. **Feline Internal Medicine**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, v. 5, cap. 15, p. 133-144.
3. NASH, A.S.; MTAMBO, M.M.; GIBBS, H.A. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area, **Veterinary Record**, v. 133, p. 576-577, 1993.
4. PAPASOULIOTIS, K.; GRUFFYDD-JONES, T. Practical Approach to Diarrhea in the Cat. **In Practice**. v. 18, p. 206-214, 1996.
5. TATON-ALLEN, G.; CHENEY, J. Parasitos gastrointestinais. In: LAPPIN, M.R. **Segredos em Medicina Veterinária**. São Paulo: Artmed, 2004, 560p.
6. TZANNES, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. **Journal of Feline Medicine & Surgery**. v. 10, p. 1-8, 2008.
7. ZORAN, D.L. The cat with signs of acute small bowel diarrhea. In: Rand, J. **Problem-based Feline Medicine**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007, cap. 32, p. 697-733.

4.5 Leishmaniose felina

Conceito

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica grave que afeta primariamente os seres humanos (LVH) e cães (LVC) causada pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, no caso das Américas, *L. (L.) chagasi*. A Leishmaniose em gatos domésticos (*Felis catus*) tem sido relatada esporadicamente em várias partes do mundo, entretanto, as observações sugerem que o gato é um hospedeiro accidental e o verdadeiro papel desta espécie como reservatório da doença não é definido.

Embora a leishmaniose felina (LF) seja de ocorrência rara, vem existindo um aumento no número dos casos relatados no mundo^[15], e no Brasil, até 2009, foram relatados sete casos da doença em gatos^[5,7,12-14,16]. O primeiro relato de leishmaniose felina no mundo foi em 1927, e desde então tanto a forma cutânea quanto a forma visceral dessa doença esporadicamente estão se modificando em muitos países^[2,3]. O primeiro relato do diagnóstico de leishmaniose felina no Brasil foi no estado do Pará no ano de 1939 com a visualização de formas amastigotas no exame citológico^[5]. A forma cutânea (*L. viannia braziliensis*) foi encontrada em dois gatos no estado do Rio de Janeiro, e o diagnóstico foi feito por meio de isolado em cultura^[13].

Etiologia e epidemiologia

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida e à família *Trypanosomatidae*, que é composta por dois grandes grupos: o das leishmâncias tegumentares e o das leishmâncias viscerais. O grupo das leishmâncias viscerais é composto por leishmâncias do complexo *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, tendo esta última já sido encontrada no Brasil^[11]. As formas tegumentares, que são as formas encontradas em gatos, são a *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. braziliensis*.

Características morfológicas: Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos (heteróxenos) e apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos. As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 mm e flagelo livre. As amastigotas têm corpo ovoide, medem entre 2,1 e 3,2mm e possuem flagelo interno^[8].

Ciclo biológico: As leishmâncias são protozoários endêmicos na América Central e na América do Sul. Sua transmissão se dá pela picada do mosquito-pólvora (*Phebotomus*), sugador de sangue^[2,10]. Esse vetor mede em torno de 2 a 3mm e tem hábito peridoméstico e intradomiciliar. Seu ciclo larval não é na água, e seu criadouro é em matéria orgânica úmida, dificultando seu combate^[11]. Quando o flebótomo pica um indivíduo infectado, o hospedeiro reservatório aspira macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou mesmo em tecidos. As amastigotas, ao atingir o intestino médio do inseto, se transformam em promastigotas. Essas formas flageladas, após rápida multiplicação, se convertem nos promastigotas infectantes e migratórias. Do intestino anterior são regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto toma uma nova refeição de sangue. Sabe-se que o cão é o principal reservatório da doença, no entanto ainda não se sabe qual o papel do felino no ciclo da doença.

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo se baseia na visualização do microrganismo por meio do exame citológico ou histológico^[10] ou por meio de PCR.

a) Características clínico-patológicas

Os achados clínicos não são patognomônicos e a confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral deve basear-se em métodos parasitológicos, sorológicos ou moleculares^[4]. Hervas et al. (1999) descrevem que a apresentação clínica das leishmanioses felinas é conforme o parásita envolvido. Segundo esses autores, na leishmaniose visceral os sinais clínicos mais frequentes são febre, perda de peso, icterícia, vômitos, alopecia na cabeça e no abdome, descamação difusa, ulcerações nas saliências ósseas, edema na borda das orelhas, linfoadenopatia, úlcera de córnea e uveíte. Os animais podem apresentar ainda estomatites ulcerativas, baço aumentado e úlcera nodular no olho^[9].

As lesões cutâneas das pinas apresentam-se na forma nodular; já a forma visceral da doença é extremamente rara em felinos^[10]. Na forma cutânea podem ser encontradas áreas alopécicas

arredondadas, nódulos e lesões ulceradas no nariz, nos lábios e nas orelhas, e lesões nas áreas interdigitais e plantares^[1].

Os sinais clínicos e as lesões podem ser confundidos comumente com os sinais encontrados em gatos com criptocose e esporotricose, dificultando o diagnóstico clínico^[16].

b) Diagnóstico laboratorial

Os exames complementares que podem auxiliar o médico veterinário são exames parasitológicos, imunológicos^[11] e moleculares. Dos exames parasitológicos podem-se realizar os exames diretos de esfregaço de material, aspirado esplênico e de medula óssea, biópsia de linfonodos ou hepática, fixados em álcool etílico e corados pelo Giemsa. Por meio de esfregaços podem ser observadas as formas amastigotas do parasita quando corados com Giemsa e Panótipo^[4]. Pode-se ainda isolar em meio de cultura mediante diluição do material aspirado em solução salina (NaCl a 0,9%) e inoculação de 0,1ml dessa solução em tubo de cultivo contendo meio NNN. Em seguida, deve-se enviar ao laboratório para serem mantidas em estufas e, depois, serem observadas em microscópio óptico. Outra forma é o isolamento em animais suscetíveis (*hamster*) mediante inoculação intraperitoneal do material previamente aspirado diluído em salina. No entanto, esse método é pouco prático, pois necessita de um período longo de observação (3 meses).

Dos exames imunológicos destacam-se as técnicas de fixação de complemento (FC), ELISA e imunofluorescência indireta (IFI). Para a IFI colhe-se amostra de sangue da orelha do animal em papel-filtro tipo “Klabin nº 25” ou “Whaltman nº 1”. O sangue deverá embeber igualmente a frente e o verso do papel e cobrir uma área com diâmetro de 3 x 5cm. O exame parasitológico deve ser realizado após o teste de ELISA ou a imunofluorescência positivos, pois está condicionado ao encontro do parasita, passando a ser influenciado pela prática de quem faz a leitura. Os testes imunológicos são muito mais sensíveis, porém menos específicos do que o exame parasitológico. O teste molecular (PCR) é o teste mais confiável por sua alta sensibilidade e especificidade, no entanto possui custo bem mais elevado do que os outros testes.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

O animal poderá ser sedado ou uma anestesia local ser realizada para colher material por meio de biópsia feita com *punch* de 3mm para avaliação de cultivo parasitológico, micológico, histopatológico e citopatológico^[2].

Para a realização de ELISA ou imunofluorescência, pode ser enviado sangue refrigerado ou soro congelado. Para o teste parasitológico, pode ser encaminhado um *imprint* da lesão, ou uma punção por agulha fina dos linfonodos ou da medula óssea para a realização de exame citológico^[6,9]. O linfonodo poplíteo é uma boa opção de escolha, devendo-se evitar os linfonodos da cabeça.

Outra opção é enviar uma biópsia de pele ou de linfonodo para a realização de exame histopatológico^[6]. Para avaliação molecular (PCR) pode ser enviada ao laboratório biópsia da lesão ou de linfonodos, sangue ou soro, e punção por agulha fina do linfonodo ou da medula óssea. Para esse teste, o material com o menor risco de obter falso-negativo é a biópsia cutânea do local lesado.

Referências bibliográficas

1. BARNES, J.C.; STANLEY, O.; CRAIG, T.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 202, n. 3, p. 416-418, 1993.
2. FIGUEIREDO, F.B. et al. Leishmaniose tegumentar americana em felino doméstico no município do Rio de Janeiro, Brasil: relato de caso. *Clínica Veterinária*, n. 74, p. 58-60, 2008.

3. HERVAS, J. et al. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 1, n. 2, p. 101-105, 1999.
4. IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 34-36, 2007.
5. MELLO, G.B. verificação da infecção natural de um gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil médico**, v. 54, n. 12, p. 180, 1940.
6. OZON, C. et al. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, n. 75, p. 273-277, 1998.
7. PASSOS, V.M. et al. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 10-20, 1996.
8. PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872p.
9. POLLI, A. et al. Feline Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, n. 106, p. 181-191, 2002.
10. SADEK, T.P. Zoonoses por exposição a vetores. In: LAPPIN, M.R. **Segredos em Medicina Interna de Felinos**. São Paulo: Artmed, 2004, 560p.
11. SANTA ROSA, I.C. de A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, n. 11, p. 24-28, 1997.
12. SAVANI, E.S. et al. The first Record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 120, n. 3, p. 2229-233, 2004.
13. SCHUBACH, T.M. et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165-167, 2004.
14. SERRANO, A.C.M. et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP: relato de caso. **Clínica Veterinária**, n. 76, p. 36-38, 2008.
15. SIMÕES-MATTOS, L. et al. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Clínicas Veterinárias**, n. 99, p. 79-87, 2004.
16. SOUZA, A.I. et al. Feline Leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato grosso do Sul state, Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

4.6 Toxoplasmose

Conceito

A toxoplasmose é a zoonose mais comum associada a pequenos animais. Em torno de 30% a 40% dos seres humanos adultos no mundo são soropositivos^[2]. Ela ocorre em animais de produção e de estimação, como aves, bovinos, suínos, caprinos, gatos, cães, e em animais selvagens^[5].

Etiologia e epidemiologia

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídeo, parasita intracelular obrigatório. Os membros da família *Felidae* (domésticos e selvagens) são os únicos hospedeiros definitivos do *Toxoplasma gondii*^[3,8]. Existem três estágios infecciosos: 1- taquizoítos, de rápida replicação, que se localizam em tecidos do corpo; 2- bradizoítos, de lenta replicação, que se localizam em cistos teciduais; 3- oocistos, que são excretados pelas fezes.

Os gatos ficam infectados quando ingerem bradizoítos que estão encistados em hospedeiros intermediários, que na maioria das vezes são roedores^[5]. O ciclo biológico inicia-se após a ingestão dos cistos pelos gatos. Esses cistos são digeridos, liberando os bradizoítos, que penetram na parede do intestino delgado^[5]. Ocorre uma série de replicações assexuadas e são seguidas por um ciclo sexuado, gerando os oocistos que serão expulsos nas fezes^[3]. Esses só se tornaram infeciosos quando na presença de oxigênio, forma na qual esporulam. O ciclo biológico inteiro pode completar-se em 3 dias a partir da ingestão dos cistos teciduais^[5]. Os oocistos não esporulados necessitam de 1 a 5 dias para esporular no ambiente, tornando-se infectivos, e podem sobreviver no ambiente por 2 anos^[8]. Esses cistos são resistentes a desinfetantes, no entanto são destruídos a 70°C em 10 minutos.

Os oocistos podem infectar o homem de diversas maneiras, entre elas, por meio da ingestão de carnes malcozidas ou cruas contendo cistos de toxoplasma. Outra forma é por mãos contaminadas por fezes, ou ainda por meio de alimentos ou água^[3,4]. O gato está envolvido nessa zoonose, pois está relacionado com a produção de oocistos e a perpetuação da doença no meio ambiente. Aproximadamente 1% da população felina excreta oocistos em determinado momento de sua vida^[8]. Os gatos com depressão imunológica ou tratados com corticoides podem causar nova excreção de oocistos.

A análise sorológica poderá ser negativa em gatos, mesmo que estejam eliminando oocistos. A maioria dos gatos soropositivos completa o período de eliminação dos oocistos, não repetindo esse episódio, e a maioria dos gatos soronegativos elimina os microrganismos nas fezes caso eles estejam infectados^[2,5].

Os gatos defecam e enterram na areia ou na terra as fezes, podendo permanecer viável nesse ambiente por meses. A menos que o gato esteja doente, pouco ou nenhum resíduo fecal permanece aderido à região perineal, devido aos hábitos de limpeza inerentes a essa espécie; portanto, o ato de acariciar ou tocar um gato é considerado impossível na transmissão da doença^[8]. A maioria dos gatos infectados com *Toxoplasma gondii* não apresenta sinais clínicos.

Após a penetração na parede do intestino delgado, o microrganismo pode disseminar-se para os linfonodos ou outros órgãos através da linfa ou do sangue. Quando ocorre necrose focal em algum órgão-alvo, o gato desenvolverá os sinais clínicos do órgão atingido. Os órgãos mais comumente afetados são os pulmões, os olhos e o fígado^[5]. Gatos com uveíte são comumente soropositivos para *T. gondii* e para outras patologias oculares, assim como para o vírus da leucemia felina (FeLV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), e a peritonite infecciosa (FIP), sendo difícil o diagnóstico sorológico^[3].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da toxoplasmose clínica felina requer a demonstração do organismo no tecido em associação com inflamação. Isso é normalmente obtido na necropsia em gatos com replicação disseminada de taquizoítos^[3]. Ocasionalmente, o diagnóstico definitivo é feito *ante mortem* pela demonstração de bradizoítos e taquizoítos em tecidos ou efusões. Uma vez que anticorpos específicos para *T. gondii* podem ser detectados no soro e no liquor e humor aquoso de animais saudáveis, não se pode fazer o diagnóstico clínico de toxoplasmose baseando-se somente em sorologia. No entanto, o diagnóstico presuntivo poderá ser feito com base na combinação de outros testes e sinais, tais como sinais clínicos, sorologia, resposta positiva ao tratamento específico para o agente, exclusão de outras doenças do diagnóstico diferencial, entre outros.

a) Características clínico-patológicas

Os sinais clínicos que podem ser observados em qualquer idade são febre, dispneia, icterícia, uveíte (anterior e posterior), coriorretinite, sinais neurológicos, febre intermitente, letargia, depressão, hiperestesia muscular e ataxia. Luxação de lente secundária a glaucoma é uma consequência comum^[3,5]. Alguns gatos poderão desenvolver diarreia do intestino delgado como reação da replicação enteroepitelial do organismo^[3]. Ocasionalmente, esse agente poderá induzir a doença inflamatória intestinal^[6].

Pode-se observar necrose com infiltrado de macrófagos no pulmão, fígado, músculo cardíaco, sistema nervoso central e tecidos renal, ocular e ad-renais^[3]. Outras alterações comumente observadas são a presença de efusão pleural, hepatomegalia, linfadenopatia, pancreatite e massas intestinais.

As doenças que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial são aquelas que causam prostração, anorexia e febre, as quais, em gatos, normalmente são doenças infecciosas, tais como as infecções pelo vírus da peritonite infecciosa felina, o vírus da imunodeficiência felina e o vírus da leucemia felina.

Em casos de gatos com hepatopatia, linfadenopatia mesentérica e ascite, as doenças que incluem o diagnóstico diferencial referem-se a doença inflamatória intestinal, pancreatite, linfoma alimentar, PIF, tuberculose e outras infecções fúngicas sistêmicas. Em animais com sinais neurológicos, a PIF e a meningoencefalite não supurativa devem ser incluídas no diagnóstico diferencial^[7].

b) Diagnóstico laboratorial

Em casos de toxoplasmose, os exames clínicos laboratoriais evidenciarão anemia não regenerativa, leucocitose neutrofílica, linfocitose, hiperbilirrubinemia, hiperproteinemia, proteinúria e bilirrubinúria. Ocorrerá elevação de ALT e FA em casos de comprometimento hepático. Os exames radiográficos podem ser realizados quando os pulmões estão acometidos, sendo possível observar áreas disseminadas com padrão alveolar e intersticial^[3].

A avaliação citológica evidenciará a presença de taquizoítos na amostra, e raramente eles serão observados no liquor ou em outros líquidos corporais^[7]. No exame do liquor serão evidenciadas dissociação albuminocitológica ($> 1\text{g/L}$) e ligeira elevação dos leucócitos ($< 50/\mu\text{l}$)^[7].

No exame de flutuação fecal, oocistos de 10 a 12 μm de tamanho poderão ser demonstrados nas fezes. Oocistos de um coccídeo não patogênico (*Hammondia hammondi* e *Besnoitia darlingi*) não poderão ser distinguidos microscopicamente dos oocistos de *T. gondii*^[3]. Para se obter o diagnóstico definitivo é necessário que se faça a inoculação em animais de laboratório. Pelo fato de animais com toxoplasmose clínica terem completado o período de liberação de oocistos, esse teste é limitado^[3]. Sua maior utilidade é nos casos de sinais clínicos digestivos da doença.

Exames sorológicos, tais como ELISA, imunofluorescência, *Western blot* e ensaio de aglutinação em látex, auxiliam no diagnóstico. O teste ELISA tem a sensibilidade de 80% para a detecção de IgM duas a quatro semanas após a inoculação; e após 16 semanas, geralmente se tornam negativos novamente. O anticorpo IgG poderá ser detectado até 6 anos após a infecção e, por isso, o anticorpo IgM está mais relacionado com a doença clínica do que o IgG^[3,5].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para realização de exame citológico pode-se aspirar com agulha fina o tecido comprometido^[5], ou enviar efusões, tais como liquor, humor aquoso e lavado broncoalveolar^[1]. Para a realização de biópsias deverão ser enviados fragmentos dos órgãos afetados. E sangue sem anticoagulante para titulação em testes sorológicos^[2]. Em casos de diarreia, deverão ser enviadas as fezes mantidas sob refrigeração.

Referências bibliográficas

1. BROWNLEE, L.; SELLON, R.K. Diagnosis of naturally occurring toxoplasmosis by bronchoalveolar lavage in a cat. **Journal of the American animal hospital association.** v. 37, p. 251-254, 2001.
2. LAPPIN, M.R. Zoonoses entéricas. In: _____. **Segredos em medicina interna de felinos.** São Paulo: Artmed, 2004, 559p.
3. LAPPIN, M. Feline toxoplasmosis. **In Practice**, nov.dec, p. 578-588, 1999.
4. MALTEZ, D.S. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água. Toxoplasma gondii. Toxoplasmose.** Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: maio 2008.
5. NORSWORTHY, G.D. Toxoplasmose. In: NORSWORTHY, G.D. et al. **O paciente felino.** São Paulo: Manole, 2004, 815p.
6. PETERSON, J.L. et al. Toxoplasmosis in two cats with inflammatory intestinal disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, p. 473-476, 1991.
7. QUESNEL, A.D.; PARENT, J.M. The cat with seizures, circling and/or changed behavior. In: RAND, J. **Problem-based feline medicine**, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007, cap. 36, p. 815-816.
8. SOUZA, H.J.M. Zoonoses felinas: mitos e verdades. In: _____. **Coletâneas em medicina e cirurgia felina.** Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2003, 475p.

4.7 Sarna notoédrica

Conceito

A sarna notoédrica, ou sarna felina, é uma dermatose caudada pelo ácaro *Notoedris cati*, que, muito ocasionalmente, também pode infectar cães e pessoas que mantenham contato com felinos^[4]. É altamente contagiosa, e sua transmissão ocorre quase sempre por contato direto, acometendo toda a ninhada^[3].

Etiologia e epidemiologia

Notoedris cati é um ácaro que resiste alguns dias no meio ambiente fora do hospedeiro. Sendo assim, as camas e os utensílios de limpeza (escova, pentes, máquinas de tosa) podem ser fontes de infecção^[1].

O ácaro-fêmea cava a epiderme entre os folículos pilosos, onde deposita os ovos. Essas escavações são evidenciadas na superfície cutânea como centros de pápulas diminutas^[4].

Características morfológicas: A característica do corpo é semelhante à sarna *Sarcoptes*, medindo cerca de 225µm as fêmeas e 150µm os machos. Possui o ânus no dorso, pernas curtas e grossas e tarsos com longos pré-tarsos nas pernas I e II, e as pernas III e IV terminam em uma longa cerda em forma de chicote.

Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se na distribuição das lesões, presença de prurido, e observação do ácaro no raspado de pele.

a) Características clínico-patológicas

A pele fica alopecica, espessada, enrugada e pregueada, e mais tarde fica revestida por crostas cinzentas, densas e firmemente aderentes. Como ocorre prurido intenso e com frequência, as

escoriações produzidas pelo ato de coçar e por atritamento tornam-se secundariamente infectadas. As lesões frequentemente são bilaterais, surgindo primeiro na base da borda de corte das pinas, estendendo-se para o restante da orelha, seguindo para a parte superior da cabeça^[4]. As lesões podem estar presentes nas patas e no períneo devido ao hábito de dormir em posição enrodilhada. Raramente ocorre disseminação envolvendo toda a superfície cutânea, a não ser que o gato esteja debilitado ou com a imunidade comprometida. Os ácaros são abundantes e de fácil demonstração^[3]. Os filhotes podem apresentar grave dermatite úmida no abdome ventral, na região perineal e nos membros. Se não tratada, a sarna notoédrica, também conhecida como escabiose felina, pode ser fatal^[4].

A infecção ocorre por *Otodectes* sp., atopia, queiletelose, hipersensibilidade alimentar, pênfigo foliáceo ou eritematoso e lúpus eritematoso sistêmico^[3].

b) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio de raspado cutâneo da região afetada, no qual facilmente se visualiza o ácaro, mesmo quando o raspado é superficial.

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

A região de eleição para raspar é a cabeça, a face ou as orelhas, nas áreas com crostas e pápulas^[3]. O diagnóstico se dá pela demonstração do ácaro e seus ovos e *pellets* fecais nos raspados superficiais de pele^[1,4]. Os ácaros geralmente são encontrados com facilidade no exame microscópico desses raspados^[2].

Referências bibliográficas

1. GRACE, S.F. Parasitas de pele In: NORSWORTHY, G.D. et al. **O paciente felino**. São Paulo: Manole, 2004, cap. 125, p. 815.
2. LAPPIN, M.R.; SADEK, T.P. Zoonoses cutâneas e por exposição a exsudatos. In: _____. **Segredos em Medicina Interna de Felinos**. São Paulo: Artmed. 2004, cap. 87, p. 560.
3. SCOTT, D.W.; MILLER JR., W.H.; GRIFFIN, C.E. Métodos de diagnóstico. In: _____. **Dermatologia de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, cap. 2, p. 1130.
4. WILKINSON, G.T.; HARVEY, R. **Atlas Colorido de Dermatologia dos Pequenos Animais – Guia para Diagnóstico**. 2. ed., São Paulo: Manole, 1996, cap. 4, p. 304.

4.8 Otoacariase

Conceito

A infestação com o ácaro *Otodectes cynotis* é comum no ouvido de gatos, sendo encontrado em torno de 50% dos casos de otite externa em felinos^[1].

Etiologia e Patogênese

Otodectes cynotis é um ácaro psoroptídeo que não se esconde; vive na superfície da pele^[3]. É altamente contagioso e especialmente prevalente em jovens.

Características morfológicas: os ácaros adultos são grandes e brancos, e movimentam-se livremente^[3].

Ciclo biológico: os filhotes são infestados pela mãe ou por outros gatinhos. O ovo é posto com um cimento que se gruda ao substrato. Após uma incubação de 4 dias, eclode e produz uma larva de seis patas, e após 3 a 10 dias eclode a protoninfa, que possui oito patas. Os ácaros vivem

na superfície da pele e alimentam-se de fragmentos epidérmicos e fluidos teciduais de epiderme superficial. À medida que o ácaro se alimenta do epitélio do conduto auditivo, este fica irritado e o canal se enche de cerume, sangue e exsudato do ácaro. Essa secreção tem aspecto clássico de borra de café^[1,3].

Diagnóstico

O diagnóstico é feito pela observação do ácaro ou de seus ovos no material enviado. Pelo fato de os sinais clínicos de dermatopatias em felinos serem muitas vezes semelhantes, é imprescindível que exames específicos sejam realizados com o intuito de se chegar ao diagnóstico definitivo.

a) Características clínico-patológicas

Os gatos apresentam prurido localizado, principalmente ao redor das orelhas, da cabeça e do pescoço, e raras vezes é generalizado^[2]. Crostas espessas, vermelho-acastanhadas ou negras, frequentemente são observadas na orelha externa. A infestação por esse ácaro pode levar a uma reação de hipersensibilidade do tipo I, gerando prurido intenso^[4]. Podem estar presentes encrostações no pescoço e escamas na cauda e na região glútea. Frequentemente existem escoriações na superfície convexa das orelhas devido ao grande prurido. Quando ocorrem manifestações de forma aguda, o gato apresenta agitação da cabeça e escoriações^[4].

Em alguns casos em que os felinos apresentam dermatite pruriginosa, poderão ser observadas lesões que se assemelham à hipersensibilidade alimentar e à picada de pulga. Outras condições que podem levar a um quadro semelhante são as de infestações por pediculose e por *No-toedres cati*^[3].

b) Diagnóstico laboratorial

Por meio do exame otoscópico encontra-se o ácaro. São observados ácaros brancos movimentando-se em resposta ao calor do otoscópio^[1]. Raspados de pele profundos e o exame microscópico subsequente são essenciais para estabelecer o diagnóstico^[4], quando ocorre infestação generalizada. Suaves de orelha imersos em óleo mineral são eficientes para a identificação do ácaro por meio de análise microscópica^[2].

Colheita e remessa de amostras clínicas para exames laboratoriais

Para a realização do exame citológico é necessário o auxílio de um cotonete. O resíduo retirado do canal auditivo deve ser “rolado” na superfície da lâmina de microscopia. Depois disso, aplicam-se duas a três gotas de óleo mineral sobre essa lâmina, e por meio de uma objetiva de varredura (quatro vezes) ou de 10 vezes, podem-se observar os ácaros nadando no óleo. Mesmo sem a presença dos ácaros adultos, poderão ser detectados seus ovos^[1].

Referências bibliográficas

1. GRACE, S.F. Ácaros da orelha. In: NORSWORTHY, G.D. et al. **O Paciente Felino**. São Paulo: Manole, 2004, cap. 53, p. 815.
2. KUHL, K.A.; GREEK, J.S. Ácaros de orelha. In: RHODES, K.H. **Dermatologia de Pequenos Animais: consulta em 5 minutos**. Revinter: Rio de Janeiro, 2005, cap. 27, p. 702.
3. SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Doenças parasitárias de pele. In: _____. **Dermatologia de Pequenos Animais**. São Paulo: Interlagos, 1996, cap. 6, p. 1130.
4. WILLEMS, T. Doenças parasitárias. In: _____. **Dermatologia Clínica de Cães e Gatos**. 2. ed., São Paulo: Manole, 1998, cap. 4, p. 143.

SOBRE OS ORGANIZADORES E AUTRES

ORGANIZADORES

Dr. Álvaro Menin

Médico Veterinário - CAV / UDESC, Doutor em imunopatologia e biologia molecular - UFSC, Pós-doutorado em Medicina Veterinária preventiva, professor da Disciplina de Doenças Infecto-contagiosas dos animais, na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

E-mail: alvaro.menin@ufsc.br

Dra. Carolina Reck

Médica Veterinária - CAV / UDESC, doutora em biologia molecular - CAV / UDESC. Diretora do VERTÁ - Laboratório de Diagnóstico Veterinário
E-mail: carolina@verta.vet.br

Dr. Vagner Miranda Portes

Médico Veterinário - CAV / UDESC, Doutorado em biologia molecular - UFSC, Pesquisador na área de sanidade animal na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri. Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar - CEPAF.
E-mail: vagnerportes@epagri.sc.gov.br

BIOGRAFIA DOS AUTORES

Dr. Álvaro Menin

Médico Veterinário - CAV / UDESC, Doutor em imunopatologia e biologia molecular - UFSC, Pós-doutorado em Medicina Veterinária preventiva, professor da Disciplina de Doenças Infecto-contagiosas dos animais, na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

E-mail: alvaro.menin@ufsc.br

Dr. Carlos José Raupp Ramos

Médico Veterinário - CAV / UDESC, Doutorando em Ciência Animal - CAV / UDESC, Mestre em Ciências Veterinárias - CAV / UDESC, Especialista em Saúde Comunitária - ULBRA / RS, Professor de microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS / Campus Laranjeiras do Sul - PR.

E-mail: carlos.ramos@uffs.edu.br

Dra. Carolina Reck

Médica Veterinária - CAV / UDESC, doutora em biologia molecular - CAV / UDESC.

Diretora do VERTÁ - Laboratório de Diagnóstico Veterinário

E-mail: carolina@verta.vet.br

Dra. Caroline Antoniazzi Wolf

Médica Veterinária - UFSM, Auditora Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Mestrado: Medicina Veterinária - UFSM, Doutorado em Ciências Veterinárias - PPGMV / UFRGS, Pós-doutorado em Medicina Veterinária / Reprodução Animal - Universidade de Wisconsin-Madison, EUA.

E-mail: caroline.wolf@agricultura.gov.br

MSc. Catia Silene Klein

Pesquisadora na área de Microbiologia, com ênfase em bacteriologia de suínos e otimização de técnicas para diagnóstico laboratorial.

Embrapa Suínos e Aves

E-mail: catia.klein@embrapa.br

Dr. Celso Pilati

Médico Veterinário - CAV / UDESC, Doutor em patologia Animal - Universidade Livre de Berlin, Alemanha, Professor titular na Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV / UDESC.

E-mail: celso.pilati@cav.udesc.br

Dra. Débora Cristina Olsson

Médica Veterinária - CAV / UDESC, doutora em Cirurgia Veterinária - UFSM, Pós-doutorado em Biologia Genética do Desenvolvimento - UFSC. Professora de Técnica Cirúrgica e de Cirurgia Veterinária no Instituto Federal Catarinense - IFSC / Campus de Concórdia, SC.

E-mail: debora.olsson@ifc.edu.br

MSc. Iara Maria Trevisol

Médica Veterinária, mestrado em Ciências Veterinárias, Pesquisadora na área de Virologia da Embrapa Suínos e Aves - Concórdia-SC.

E-mail: iara.trevisol@embrapa.br

Dra. Josaine Cristina da Silva Rappeti

Doutorado em Medicina Veterinária, concentração em cirurgia - UFSM, Professora da disciplina de Clínica Cirúrgica na Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

E-mail: josainerappeti@yahoo.com.br

Dr. Luizinho Caron

Médico Veterinário, Doutorado na área de Microbiologia, Subárea de Virologia - Universidade Estadual de Campinas & PIADC / ARS / USDA. Pesquisador na Embrapa Suínos e Aves - Concórdia-SC.

E-mail: luizinho.caron@embrapa.br

Dra. Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha

Médica Veterinária - UFSM, Pesquisadora na Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica, Doutorado em cirurgia veterinária - UFSM / Katholieke Universiteit Leuven, KU Leuven, Bélgica, Pós-doutorado em tratamentos utilizando células tronco na Katholieke Universiteit Leuven, KU Leuven, Bélgica.

E-mail: bibiamori@yahoo.com.br

Dr. Matheus Pedrotti de Cesaro

Médico veterinário - CAV / UDESC, Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução Animal - UFSM, Doutor em Sanidade e Reprodução Animal - UFSM / McGill University - Canadá. Professor do curso de medicina veterinária da IMED campus Passo Fundo - RS.

E-mail: vematheus.pdc@gmail.com

Dr. Paulo Francisco Domingues

Médico veterinário, Especialista em Saúde Animal, Professor Adjunto da disciplina de Higiene Zootécnica do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu.

E-mail: paulo.domingues@unesp.br

Dra. Renata Dezengrini Slhessarenko

Professora associada, virologista, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Medicina na Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

E-mail: renatadezengrini@yahoo.com.br

Dra. Sabrina Leaes Gomez

Médica Veterinária - UFRGS, Mestre em Ciências Veterinárias (área de clínica e reprodução de equinos) - UFRGS. Atua na área de clínica e reprodução de equinos - Chile.

E-mail: leaes.gomez@gmail.com

Dr. Silverio Bunn

Médico Veterinário - UFSM, Mestrado em Ciência Animal - CAV / UDESC, Atua na área de clínica e cirurgia de grandes animais - Brasil.

E-mail: silveriovet@yahoo.com.br

Dr. Ubirajara Maciel da Costa

Médico Veterinário - UFRGS, Doutor em Virologia - UFRGS, Professor das disciplinas de Doenças infecciosas e Virologia na Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

E-mail: ubirajara.costa@udesc.br

Dr. Wagner Miranda Portes

Médico Veterinário - CAV / UDESC, Doutorado em biologia molecular - UFSC, Pesquisador na área de sanidade animal na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri. Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar - CEPAF.

E-mail: vagnerportes@epagri.sc.gov.br

