



**PRISCILA FARIA ROSA LOPES**

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-  
HISTOQUÍMICO E MOLECULAR DE CASOS  
FATAIS DE DIARREIA BOVINA NA  
MICRORREGIÃO DE LAVRAS, MINAS GERAIS**

**LAVRAS – MG  
2013**

**PRISCILA FARIA ROSA LOPES**

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E  
MOLECULAR DE CASOS FATAIS DE DIARREIA BOVINA NA  
MICRORREGIÃO DE LAVRAS, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior

Coorientadora

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Lopes, Priscila Faria Rosa.

Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e molecular de casos fatais de diarreia bovina na Microrregião de Lavras, Minas Gerais / Priscila Faria Rosa Lopes. – Lavras : UFLA, 2013.

105 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Pedro Soares Bezerra Júnior.

Bibliografia.

1. *Salmoella* spp. 2. BVDV. 3. Coronavírus bovino. 4. Enterite infecciosa. 5. Enteropatógenos. I. Universidade Federal de Lavras.

II. Título.

CDD – 636.208963427

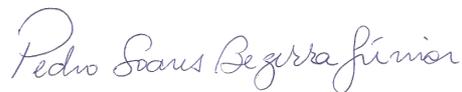
**PRISCILA FARIA ROSA LOPES**

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E  
MOLECULAR DE CASOS FATAIS DE DIARREIA BOVINA NA  
MICRORREGIÃO DE LAVRAS, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013

Dra. Mary Suzan Varaschin	UFLA
Dr. Djeison Lutier Raymundo	UFLA
Dra. Jankerle Neves Boeloni	UFMG



Prof. Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

*“Em todo começo reside uma magia que nos protege e ajuda a vencer”*

Hermann Hesse

*Aos meus pais, Nelson e Dete, pelo amor incondicional e por serem os alicerces da minha vida,*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo, sou grata a Deus, pela oportunidade de mais uma conquista, por sempre me guiar pelos caminhos de luz.

Ao meu pai, Nelson e à minha mãe, Dete, pelo apoio incondicional e por ser meu espelho, exemplo de vida, amor e respeito.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na pessoa do seu coordenador, professor Márcio Gilberto Zangeronimo, pela oportunidade de integrar o corpo discente.

Ao meu orientador, professor Pedro Soares Bezerra Júnior, por incentivar aconselhar em todos os momentos, principalmente naqueles de dúvida, de desânimo e apoiar em todas as etapas que findaram neste trabalho.

Aos professores Adriana de Souza Coutinho, Djeison Lutier Raymundo, Jankerle Neves Boeloni, Josilene Nascimento Seixas e Mary Suzan Varaschin, pelo exemplo de profissionalismo e competência, e, mais importante, pelo grande apoio e amizade desenvolvidos ao longo da graduação e do mestrado.

Aos colegas da Patologia (Camila, Clayton, Débora, Joana, Karen, Leonardo e Rafael) que contribuíram para a minha formação e, sem dúvida alguma, pelas boas amizades que surgiram; a todos os estagiários, que sempre se mostraram dispostos a ajudar e aos amigos cultivados durante a vida acadêmica, que sempre torceram pelo meu sucesso profissional (Fábio, Letícia e Yasmin).

À UFLA e seus funcionários, por tornarem agradável cada dia desses quase oito anos de convívio, especialmente ao Berin, Welson, Reginaldo, Neide e Maurício.

À CAPES/REUNI, pelo auxílio financeiro, por meio da bolsa de pesquisa.

## RESUMO

A diarreia é uma síndrome de etiologia complexa que afeta diversas espécies animais. Entre os agentes infecciosos frequentemente associados estão o coronavírus bovino (BCoV), rotavírus, vírus da diarreia viral bovina (BVDV), *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Cryptosporidium* spp., dentre outros. Na primeira parte deste estudo, descreveu-se um surto de disenteria de inverno em vacas adultas, durante o verão. Foram avaliadas as alterações clínicas e patológicas dos bovinos acometidos, sendo realizada a *nested* RT-PCR e imuno-histoquímica (IHQ) para a confirmação do envolvimento do coronavírus bovino no surto. De 30 bovinos, 15 vacas apresentaram diarreia e, dentre estas, uma veio a óbito. Na necropsia, a principal alteração foi observada na alça espiral do cólon ascendente, caracterizada por erosões e hemorragia na mucosa e grande quantidade de sangue no lúmen, e, na histopatologia, observou-se necrose das criptas intestinais nesta área. Os achados foram compatíveis com a infecção pelo BCoV, o que foi confirmado pela presença de antígenos do vírus nas lesões e o material genético deste nas fezes. A *nested* RT-PCR foi também positiva em quatro amostras fecais de vacas diarreicas co-habitantes. Todas as amostras testadas na sorologia pareada para o vírus da diarreia viral bovina resultaram negativas e a IHQ para *Salmonella* spp. na vaca necropsiada também foi negativa. Ressaltam-se, neste surto de coronavirose em bovinos adultos, a ocorrência em estação quente e o envolvimento simultâneo do vírus nos sistemas respiratório e gastrointestinal. Na segunda parte deste trabalho, realizou-se um estudo morfológico, imuno-histoquímico e molecular de casos fatais de diarreia espontânea em bovinos, no período de 2007 a 2012, na região sul de Minas Gerais. Nesta pesquisa foram avaliados 32 bovinos de diferentes idades e a enterite/colite necrotizante aguda a subaguda foi o diagnóstico morfológico predominante nos bovinos diarreicos (17/32). Houve imunomarcagem para *Salmonella* spp. e BVDV em 9,4% (3/32) e 6,25% (2/32) dos casos, respectivamente. A *nested* RT-PCR para o BCoV resultou positiva em quatro amostras (4/9). Os resultados deste trabalho ressaltam que a diarreia é uma síndrome de etiologia complexa e que a pesquisa de casos fatais deste distúrbio, por meio de métodos morfológicos, imuno-histoquímicos e moleculares, pode trazer informações importantes para o diagnóstico, o tratamento e o controle da enfermidade.

Palavras-chave: BVDV. Coronavírus bovino. Enterite infecciosa. Enteropatógenos. *Salmonella* spp.

## ABSTRACT

Diarrhea is a syndrome of complex etiology that affects several animal species. The infectious agents that are often associated are bovine coronavirus (BCoV), rotavirus, Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV), *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* spp., among others. In the first part of this study, an outbreak of winter dysentery in adult cows during the summer was presented. Clinical and pathological features of affected cattle were disclosed and a nested RT-PCR and immunohistochemistry was performed to confirm the involvement of bovine coronavirus in the outbreak. Out of 30 bovine, 15 cows presented diarrhea and, among these, one died. At necropsy, the main change was observed in the spiral loop of the ascending colon, characterized by mucosal erosions and haemorrhage in the mucosa and a large amount of blood in the lumen and, in histopathology, necrosis of intestinal crypts in this area. The findings were consistent with BCoV infection, as confirmed by the presence of viral antigens in lesions and genetic material in faecal sample. The nested RT-PCR was also positive in four faecal samples from co-inhabitants diarrheic cows. All samples tested in paired serology for BVDV and in immunohistochemistry for *Salmonella* spp. of the necropsied cow were negative. It is highlighted in this coronavirus outbreak in adult cattle the occurrence in the warmer season and the simultaneous involvement of the virus in the respiratory and gastrointestinal tracts. In the second part of this work, was performed a morphological, immunohistochemical and molecular investigation of spontaneous fatal cases of bovine diarrhea, from 2007 to 2012, in the Southern region of Minas Gerais. In this research were evaluated 32 animals of different ages and an acute to sub-acute necrotizing enteritis/colitis was the predominant morphologic diagnosis in bovine diarrhea (17/32). There was positive immunostaining for *Salmonella* spp. and BVDV in 9.4% (3/32) and 6.25% (2/32) of cases, respectively. The nested RT-PCR for BCoV resulted positive in four samples (4/9). The present results emphasize that diarrhea is a syndrome of complex etiology and that the research of fatal cases of this disorder through morphological, immunohistochemical and molecular techniques can provide important informations for diarrhea diagnosis, treatment and control.

**Keywords:** Bovine coronavirus. BVDV. Enteropathogens. Infectious enteritis. *Salmonella* spp.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

- Figura 1 Coronavirose bovina em vacas. Alça espiral do cólon ascendente. Hiperemia difusa, hemorragia e erosões irregulares na mucosa (setas) com arranjo predominantemente linear, grande coágulo sanguíneo e conteúdo líquido sanguinolento no lúmen..... 72
- Figura 2 Coronavirose bovina em vacas. Traqueia e brônquios. Secreção catarral amarelada em moderada quantidade, observada na porção final da traqueia e no início dos brônquios..... 72
- Figura 3 Coronavirose bovina em vacas. Alça espiral do cólon ascendente. Imuno-histoquímica para coronavírus bovino. Intensa marcação no citoplasma de enterócitos de criptas (cabeça de seta). Notar cripta com revestimento cuboidal e pavimentoso (seta) e infiltrado mononuclear na lâmina própria. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector® NovaRED®. Barra = 50µm..... 73
- Figura 4 Coronavirose bovina em vacas. Corneto nasal. Imuno-histoquímica para coronavírus bovino. Intensa marcação no citoplasma do epitélio respiratório. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector® NovaRED®. Barra = 20µm ..... 73

#### ARTIGO 2

- Figura 1 Bovino 10. Coronavirose. Alça espiral do cólon ascendente apresentando grande quantidade de conteúdo sanguinolento no lúmen..... 100
- Figura 2 Bovino 30. Mucosa do íleo com áreas de ulceração coalescentes recobertas por material friável amarelo-acinzentado..... 100
- Figura 3 Bovino 28. Intestino delgado apresentando distensão gasosa, serosa avermelhada e exsudato fibrinoso aderido à

	superfície.....	101
Figura 4	Bovino 22. Intestino grosso com moderado número de criptas dilatadas, revestidas por células cuboidais ou pavimentosas e preenchidas por debris necróticos. Barra = 50 µm.....	101
Figura 5	Bovino 1. Marcação positiva de <i>Salmonella</i> spp. na superfície da mucosa do cólon. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector® NovaRED®. Barra = 50 µm.....	102
Figura 6	Bovino 27. Fígado com áreas multifocais de necrose com infiltrado inflamatório misto com células mononucleares e polimorfonucleares. Ausência de marcação imunohistoquímica para <i>Salmonella</i> spp. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector® NovaRED®. Barra = 50 µm .....	102
Figura 7	Bovino 1. Marcação positiva do Vírus da Diarreia Viral Bovina em células mononucleares no linfonodo mesentérico. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector® NovaRED®. Barra = 50 µm.....	103
Figura 8	Bovino 3. Cólon apresentando acentuada depleção linfóide folicular associada a infiltrado histiocitário nos aglomerados linfóides da submucosa. Barra = 50 µm.....	103
Figura 9	Eletroforese do gel de agarose da <i>nested</i> RT-PCR para detecção do Coronavirus bovino (BCoV). O fragmento amplificado corresponde a 136pb. L = DNA ladder de 100pb; 1-9 = amostras de conteúdo intestinal dos Bovinos 2, 3, 8, 9, 10, 13, 14, 22 e 27; P = controle positivo; N = controle negativo (água ultra-pura tratada DEPC).....	104

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Tabela1	Valores médios das variáveis hematológicas avaliadas em bovinos, durante um surto de coronavirose no sul do estado de Minas Gerais, Brasil.....	74
---------	---	----

#### ARTIGO 2

Tabela 1	Sumário do diagnóstico histopatológico, provável etiologia e grau de autólise observada no intestino delgado e cólon de 32 casos fatais de diarreia bovina na região sul de Minas Gerais, Brasil.....	105
----------	---	-----

## LISTA DE SIGLAS

**BCoV** – Coronavírus bovino  
**BVD** – Diarreia viral bovina  
**BVDV** – Vírus da diarreia viral bovina  
**CHCM** – Concentração da hemoglobina corpuscular média  
**CWA** – Clima tropical de altitude  
**DI** – Disenteria de inverno  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**DPEC** – Dietilpirocarbonato  
**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (imunoensaio enzimático)  
**ETEC** – *Escherichia coli* enterotoxigênica  
**GMPc** – Monofosfato cíclico de guanosina  
**HCM** – Hemoglobina corpuscular média  
**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa  
**IHQ** – Imuno-histoquímica  
**LT** – Termolábil  
**OPG** – Ovos por grama de fezes  
**OOPG** – Oocistos por grama de fezes  
**PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida  
**PBS** – Tampão fosfato salino  
**PCR** – Reação pela polimerase em cadeia  
**PI** – Persistentemente infectado  
**RNA** – Ácido ribonucleico  
**RT** – Transcrição reversa  
**SPV** – Setor de Patologia Veterinária  
**ST** – Termoestável  
**UFLA** – Universidade Federal de Lavras  
**VCM** – Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos Gerais.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Tipos de Diarreia.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Principais enteropatógenos associados à diarreia em bovinos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Rotavirose.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Coronavirose.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Diarreia Viral Bovina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Salmonelose.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Colibacilose.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Criptosporidiose.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Eimeriose e giardíase.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
	<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS</b>	
	<b>ARTIGO 1 “SURTO DE CORONAVIROSE BOVINA EM VACAS LEITEIRAS EM ESTAÇÃO QUENTE NO BRASIL”.....</b>	<b>55</b>
	<b>Abstract.....</b>	<b>55</b>
	<b>Resumo.....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ARTIGO 2 “ENTEROPATÓGENOS ASSOCIADOS A CASOS FATAIS DE DIARREIA BOVINA NO SUL DE MINAS GERAIS: UM ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO”.....</b>	<b>75</b>
	<b>Abstract.....</b>	<b>75</b>
	<b>Resumo.....</b>	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>77</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>

**PRIMEIRA PARTE**  
**REFERENCIAL TEÓRICO DA ETIOLOGIA DAS DIARREIAS EM BOVINOS**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária bovina é de extrema importância na economia mundial. Contudo, uma ampla gama de enfermidades agudas e crônicas afeta, direta ou indiretamente, a produção animal, o bem-estar e a sanidade do rebanho (WILSON et al., 2005). Uma dessas afecções de grande impacto na criação de bovinos é a diarreia, doença de etiologia multifatorial que afeta tanto o gado leiteiro quanto de corte e que, ainda nos dias atuais, permanece como um grande desafio aos sistemas de produção (FERREIRA, 2009; FOSTER; SMITH, 2009).

Existem várias estimativas econômicas que atestam a importância das doenças relacionadas à diarreia no mundo e no Brasil. Nos Estados Unidos, a estimativa de prejuízos relativos à diarreia é de cerca de 95 milhões de dólares por ano. Em âmbito mundial, a estimativa de perdas é de 1,7 bilhão de dólares (BRANDÃO et al., 2007a; DAR; KAPIL; GOYAL, 1998). Infecções causadas pelo coronavírus e pelo rotavírus resultam em perdas médias anuais de 16,7 a 28,4 milhões de dólares e 3,1 a 8,7 milhões de dólares, respectivamente (CALDOW; MUNRO, 1995).

Em Minas Gerais, a estimativa da taxa de mortalidade geral em bovinos jovens é de 14%. As afecções com maior participação nestas mortes são a diarreia, a tristeza parasitária e as pneumonias (FERREIRA, 2009; FROIS; MODENA; VIEGAS, 1994). Tendo estes números como parâmetro e considerando a grande importância econômica da pecuária bovina no estado de Minas Gerais, tem-se uma ideia do impacto que os enteropatógenos podem ter na economia desta região.

O presente trabalho foi realizado com objetivo de realizar um estudo, retrospectivo e prospectivo, das doenças relacionadas às mortes de bovinos associadas à diarreia, diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Pretendeu-se, ainda, descrever as

lesões encontradas na histopatologia, correlacionando-as com a presença de antígenos bacterianos (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*) e/ou virais (coronavírus bovino e vírus da diarreia viral bovina), bem como pesquisar o material genético do coronavírus e do rotavírus bovino em amostras de conteúdo intestinal congeladas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Aspectos gerais**

As infecções intestinais constituem uma importante síndrome em várias espécies de animais domésticos. Particularmente nos bovinos, é importante causa de perda econômica para a cadeia produtiva, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (ASANO et al., 2010; BUZINARO et al., 2003; DINTER; MOREIN, 1990; EL-ATTAR et al., 2001; FUENTE et al., 1998; GONZALEZ et al., 2010; WHITLOCK, 1992). A etiologia da diarreia em bovinos é complexa, representada por uma série de agentes infecciosos, como vírus, bactérias, protozoários e metazoários, além de sofrer influência de diversos fatores não infecciosos predisponentes (ASANO et al., 2010; BARTELS et al., 2010; BUZINARO et al., 2003; CHO et al., 2001; HALL et al., 1988; RYCKE et al., 1986).

O reconhecimento clínico da diarreia não é difícil, baseado nos sinais de diminuição da consistência das fezes e aumento da frequência de defecação, associados à desidratação, fraqueza e perda de peso (WHITLOCK, 1992). Entretanto, a determinação do agente etiológico não é evidente a partir dessas observações, já que estes sinais clínicos são comuns em doenças causadas por diversos enteropatógenos e, além disso, a ocorrência de coinfeções não é incomum. As lesões provocadas por diferentes microrganismos também podem se apresentar indiferenciáveis, muitas vezes, mesmo no exame histopatológico (DINTER; MOREIN, 1990; MORRIS et al., 2011). Por esta e por outras razões, em todo o mundo, pesquisadores vêm tentando estudar as relações causais de diversos agentes na patogenia da diarreia em bovinos (FERREIRA, 2009; MORRIS et al., 2011).

Existem diversos patógenos entéricos responsáveis pelas alterações no equilíbrio dinâmico hidroeletrolítico intestinal, que podem cursar com diarreia (BROWN; BAKER; BARKER, 2007). Entre eles destacam-se a *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, vírus da diarreia viral bovina (BVDV), rotavírus tipo A, coronavírus bovino, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., helmintos gastrintestinais e, menos frequentemente, *Clostridium difficile* (BARTELS et al., 2010; BRANDÃO et al., 2007a; BROWN; BAKER; BARKER, 2007; CALDOW; MUNRO, 1995; FERREIRA, 2009; FUENTE et al., 1998; HALL et al., 1988; HAMMITT et al., 2008; MORRIS et al., 2011; TURNER, 2009; WHITLOCK, 1992).

Entre os fatores não infecciosos relacionados à ocorrência de diarreia, a falha de transferência de imunidade passiva para animais jovens constitui um dos mais relevantes fatores que predis põem ao desenvolvimento de diarreia (FUENTE et al., 1998; WHITLOCK, 1992).

Existem ainda outras condições importantes, como a idade do animal, a condição imunológica materna, as situações de estresse, a exposição a outros animais contactantes, o fornecimento de alimentação excessiva de leite ou sucedâneos a indivíduos não adaptados e o uso preventivo de antimicrobianos orais (FERREIRA, 2009; MARTELLA et al., 2010; SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992).

Dentre os fatores externos, a grande variação na amplitude térmica, a exposição a chuvas e ventos, e a superlotação associada à cama úmida podem afetar negativamente a homeostase e facilitar o contato e a infecção pelos enteropatógenos (SCOTT et al., 2008).

## 2.2 Tipos de diarreia

A diarreia é, primariamente, o resultado de um transporte anormal de fluidos e/ou íons pela mucosa do intestino delgado ou grosso, agravado por uma motilidade exacerbada (SCOTT et al., 2008). As diarreias associadas ao intestino delgado são classificadas em secretórias, malabsortivas e efusivas, embora estes mecanismos não sejam mutuamente excludentes (BROWN; BAKER; BARKER, 2007). Na diarreia secretória, os enterócitos, em resposta à colonização por bactérias produtoras de enterotoxinas, apresentam hipersecreção de eletrólitos, resultando em aumento na quantidade de fluido no lúmen. Por outro lado, as diarreias malabsortivas resultam da atrofia das vilosidades produzidas por agentes virais, bactérias e parasitas, provocando perda massiva de fluidos intestinais, sem envolver a hipersecreção. Já nas diarreias efusivas, a perda de fluido e/ou solutos está relacionada, geralmente, ao aumento da pressão hidrostática ou da permeabilidade de vasos da mucosa intestinal, além de obstrução de vasos linfáticos (ARGENZIO, 1992; BROWN; BAKER; BARKER, 2007; FERREIRA, 2009).

A absorção de água no intestino grosso também pode ser afetada em algumas enfermidades, como na infecção por *Cryptosporidium* spp., coronavírus e *Escherichia coli* entero-hemorrágica (SCOTT et al., 2008). A diarreia no cólon é caracterizada pela frequente eliminação de pequena quantidade de fezes fluidas, podendo conter muco e sangue (BROWN; BAKER; BARKER, 2007).

## **2.3 Principais enteropatógenos associados à diarreia em bovinos**

### **2.3.1 Rotavirose**

O rotavírus é considerado um importante agente etiológico da gastroenterite viral aguda em animais jovens e em crianças, em todo o mundo, principalmente no período do inverno (ASANO et al., 2010, 2011; BASERA et al., 2010; BUZINARO et al., 2003; GONZALEZ et al., 2010; MARTELLA et al., 2010; WHITLOCK, 1992). Estes vírus pertencem ao gênero *Rotavirus*, da família *Reoviridae* e são classificados, sorologicamente, em sete grupos distintos (A ao G), em função da proteína estrutural VP6 (ASANO et al., 2011; BUZINARO et al., 2003; CHO et al., 2001; EL-ATTAR et al., 2001; GONZALEZ et al., 2010).

O grupo sorológico A é o mais frequentemente encontrado nas diarreias de humanos e animais, apresentando alta variabilidade e complexidade dentro do mesmo grupo, o que dificulta a implementação de medidas de controle e profilaxia dessa infecção (ASANO et al., 2011; MARTELLA et al., 2010; PARK et al., 2007b). Buzinaro et al. (2003) encontraram prevalência de 41,7% a 82,4%, em fezes de bezerros de corte com diarreia neonatal. Embora o quadro associado ao rotavírus seja estudado mais intensivamente em animais jovens, principalmente na primeira semana de vida, devido à gravidade e à frequência da enfermidade, a infecção pode ocorrer em todas as idades, incluindo animais adultos (ASANO et al., 2009; BASERA et al., 2010; BUZINARO et al., 2003; FERREIRA, 2009; PARK et al., 2007a ; PARRENO et al., 2010). Mais de 50% dos bovinos neonatos infectados pelo rotavírus possuem lesões relativamente extensas no intestino delgado, mas não desenvolvem diarreia (WHITLOCK, 1992). Os casos fatais, em geral, ocorrem em bezerros com cerca de três dias de idade (VAN KRUININGEN, 1998).

Por meio da infecção por via oral, o rotavírus replica nas células epiteliais maduras das vilosidades intestinais, com consequente substituição desses enterócitos por outros imaturos das criptas do intestino delgado (ARNOLD; PATTON, 2009; CASHMAN et al., 2009; CHO et al., 2001; EL-ATTAR et al., 2001; FERREIRA, 2009; PARK et al., 2007a; PARRENO et al., 2010; TURNER, 2009). A infecção se inicia com a replicação nas células epiteliais e, à medida que a multiplicação progride, as células absortivas são eliminadas e as células imaturas das criptas cobrem a superfície da vilosidade, gerando uma mudança brusca na relação entre absorção e secreção, que resulta em uma diarreia malabsortiva, com acúmulo de fluidos no lúmen intestinal (ARNOLD; PATTON, 2009; BASERA et al., 2010; CIARLET et al., 2002; DHAMA et al., 2009; FERREIRA, 2009). Há evidências de que a infecção concomitante pelo *Cryptosporidium* spp. agrava o quadro de diarreia causada pelo rotavírus (HALL et al., 1998; SCOTT et al., 2008). Segundo Whitlock (1992), a infecção pelo rotavírus predispõe à colonização pela *Escherichia coli* enterotoxigênica, levando à infecção mista de um mesmo enterócito.

As lesões observadas na histopatologia são encurtamento e fusão de vilosidades, com epitélio cuboidal nas porções proximal e média do jejuno. Estas lesões são indiferenciáveis das observadas na coronavirose (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; WHITLOCK, 1992).

Em bezerras, a diarreia provoca consideráveis prejuízos devido ao atraso no crescimento, ao tempo e ao peso inadequado ao abate e, em alguns casos, até a morte dos animais infectados (GONZALEZ et al., 2010; KIM et al., 2011). Vacinas ainda não estão disponíveis comercialmente, faltando evidências de sua efetividade no rebanho (GONZALEZ et al., 2010).

O diagnóstico da doença baseia-se na detecção do vírus, do material genético ou do antígeno viral em material fecal, uma vez que o isolamento do vírus em cultivo celular é demorado e laborioso (DHAMAS et al., 2009; KIM et

al., 2011). Anticorpos monoclonais têm sido empregados para a identificação e o diagnóstico da rotavirose humana em fezes, permitindo estudos epidemiológicos, ou como ferramenta para a detecção do rotavírus bovino (BECK et al., 2007; EL-ATTAR et al., 2001). Tanto a PAGE quanto a RT-PCR, a microscopia eletrônica, a imuno-histoquímica e o ELISA são descritos na literatura como métodos de diagnóstico eficazes (BRANDÃO et al., 2007a; SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992; ZHU et al., 2011).

### **2.3.2 Coronavirose**

Na família Coronaviridae, os vírus importantes para bovinos são o coronavírus bovino, o torovírus e o bredavírus. Os outros membros da família, embora com menor frequência, também podem estar associados à diarreia nesta espécie (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

O coronavírus, diferente do rotavírus, não é um patógeno exclusivo do trato gastrointestinal, já que está frequentemente associado a outras condições patológicas, incluindo hepatite, nefrite, pneumonia, peritonite e encefalite, em uma ampla variedade de espécies animais (ASANO et al., 2010; WHITLOCK, 1992; ZHANG et al., 1997; ZHU et al., 2011).

O BCoV é um agente causador de diarreia em bezerros, da disenteria de inverno em vacas adultas e de doença do trato respiratório em bezerros e bovinos adultos (BEZERRA JÚNIOR et al., 2009; DINTER; MOREIN, 1990; FERREIRA, 2009; HAN et al., 2006; HICK et al., 2012; SOUZA, 2008). A mesma cepa viral pode ser responsável pelo aparecimento simultâneo de doença entérica e respiratória nos mesmos animais (DECARO et al., 2008; HAN et al., 2006; NIKUNEN et al., 2007; PARK et al., 2007b). Embora considerados extremamente espécie e tecido-específicos, há descrições de transmissão de coronavírus entre espécies e em novos sítios (ASANO et al., 2011; HAN et al.,

2006). A doença causada pelo coronavírus tem sido associada a outros agentes, como torovírus, rotavírus, vírus da diarreia viral bovina, *Salmonella* sp., *Cryptosporidium parvum* e *Eimeria bovis* (ASANO et al., 2009; CHO et al., 2001; PARK et al., 2007b).

A coronavirose é caracterizada por baixa mortalidade, gerando grandes perdas econômicas decorrentes, principalmente, da redução na produção, como a observada na produção leiteira na disenteria de inverno (DECARO et al., 2008; GELINAS et al., 2001). Nestes casos, a morbidade da doença no rebanho é geralmente alta, variando de 15% a 63,6%, com surtos reportados em várias regiões do mundo (FERREIRA, 2009). O pico de incidência no inverno tem sido relacionado à maior estabilidade do vírus no ambiente nesta estação, embora, recentemente, alguns surtos sejam também observados em estações quentes (PARK et al., 2006).

O BCoV replica nas células absortivas das vilosidades do intestino delgado e nas células não diferenciadas das criptas do cólon, resultando em descamação, encurtamento e fusão das vilosidades, dilatação de criptas e diarreia malabsortiva ( BRANDÃO et al., 2007a; BROWN; BAKER; BARKER, 2007; COLOGNA; HOGUE, 2000; VAN KRUININGEN et al., 1987). A fusão das vilosidades ocorre, possivelmente, devido à adesão da lâmina própria adjacente, mas, à medida que as células epiteliais se regeneram, essa lesão pode regredir (BROWN; BAKER; BARKER, 2007). Acredita-se que os mecanismos das lesões intestinais causadas pelo BCoV sejam os mesmos descritos para o rotavírus (SCOTT et al., 2008). No entanto, ele afeta tanto o intestino delgado quanto o grosso e, na coronavirose, a diarreia começa quando o antígeno viral está presente nas células absortivas, antes mesmo das alterações morfológicas detectadas na microscopia (WHITLOCK, 1992).

Surtos podem durar mais de 10 dias, com os sinais clínicos aparecendo durante os meses de inverno, inicialmente em um pequeno número de animais.

No caso da disenteria de inverno, em poucos dias, até 100% do rebanho pode ser afetado pela diarreia, por vezes hemorrágica, com perda do escure corporal, desidratação e diminuição da produção de leite (BEZERRA JÚNIOR et al., 2009; BRANDÃO et al., 2007b, 2007c; DECARO et al., 2008; SOUZA, 2008).

O coronavírus respiratório bovino é frequentemente detectado por meio de ELISA e isolado da cavidade nasal através de amostras de *swab*. Pode haver diferenças ou não entre as cepas do trato respiratório e entérico (DECARO et al., 2008, 2010; GELINAS et al., 2001). Um método simples de detecção direta do BCoV é a inibição de hemaglutinação (GELINAS et al., 2001; HAN et al., 2006).

O ELISA, com anticorpos monoclonais ou policlonais, o isolamento viral, a microscopia eletrônica, a imunofluorescência direta e a imunohistoquímica podem ser utilizados como métodos de detecção diretos do BCoV (ASANO et al., 2010; CHO et al., 2001; DAR; KAPIL; GOYAL, 1998; HAN et al., 2006; MEBUS et al., 1973; PAVARINI et al., 2008; VAN KRUININGEN et al., 1987; ZHANG et al., 1997). Vários protocolos utilizando reações de RT-PCR têm sido descritos na literatura, para a detecção do material genético do vírus (ASANO et al., 2009; BRANDÃO et al., 2005, 2007a, 2007c; CHO et al., 2001; KLEIN et al., 2009; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; PARK et al., 2007a, 2007b; SOUZA, 2008; ZHU et al., 2011).

Segundo Cho et al. (2001), em amostras fecais, a RT-PCR, comparada ao ELISA, apresentou sensibilidade de 81% e especificidade de 96,6%, enquanto a sensibilidade e a especificidade da *nested* PCR foram de 100% e 66,6%, respectivamente.

Asano et al. (2009) padronizaram uma nova técnica de RT-PCR *multiplex seminested* com *primers* depositados no *GenBank*, representando um método econômico e acurado para o diagnóstico simultâneo de BCoV e rotavírus bovino.

### 2.3.3 Diarreia viral bovina

A primeira descrição do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) ocorreu em 1946 (VAN KRUININGEN, 1998). O agente foi isolado de surtos de diarreia e lesões erosivas no trato digestivo de bovinos nos Estados Unidos (WHITLOCK, 1992). Atualmente, o vírus é reconhecido como sendo responsável por diversas manifestações clínicas e perdas econômicas importantes, em rebanhos de bovinos de corte e leite em todo o mundo, com prevalência de 50% a 90% de bovinos soropositivos em rebanhos afetados (CORNISH et al., 2005; DINTER; MOREIN, 1990; FULTON et al., 2009; SANTOS et al., 2011; VAN KRUININGEN, 1998; WHITLOCK, 1992). O BVDV também causa doença clínica em caprinos, ovinos, bisões e uma variedade de cervídeos (DINTER; MOREIN, 1990; SINGH et al., 2011). Além disso, pode infectar suínos, pelo uso de vacinas contaminadas (WENSVOORT; TERPSTRA, 1988).

O BVDV pertence à família Flaviviridae, gênero Pestivirus, e é classificado em dois tipos virais, o BVDV tipo 1 e o BVDV tipo 2, e em duas cepas diferentes, a citopatogênica (CP) e a não citopatogênica (NCP) (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; BEDEKOVIC et al., 2011; LIEBLER-TENORIO, 2005; SANTOS et al., 2011).

A maioria das infecções pelo BVDV em bovinos imunocompetentes é subclínica ou resulta em sinais clínicos discretos, raramente causando manifestação clínica em bovinos com idade inferior a seis meses, afetando, com maior frequência, animais da faixa etária dos 6 aos 24 meses (DINTER; MOREIN, 1990; SANTOS et al., 2011).

O vírus tem afinidade por células em divisão e, por isso, o feto em crescimento é afetado de modo importante pela replicação viral. O resultado da infecção fetal depende, basicamente, da fase de gestação e do biotipo viral

(BROWN; BAKER; BARKER, 2007; DINTER; MOREIN, 1990; LIEBLER-TENORIO, 2005).

A infecção de vacas gestantes soronegativas pode promover falhas reprodutivas, tais como aborto e morte embrionária, defeitos congênitos e nascimento de animais fracos ou nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) (CORNISH et al., 2005; DRISKELL; RINDAPATH, 2006; FULTON et al., 2009). Estes animais PI podem ser gerados pela infecção de fêmeas gestantes, entre os dias 40 e 120 de gestação, por amostras não citopatogênicas do BVDV e eliminam continuamente o vírus em altos títulos nas secreções e excreções, constituindo a principal fonte de manutenção e transmissão da infecção nos rebanhos (EDMONDSON et al., 2007; FULTON et al., 2009; LIEBLER-TENORIO, 2005). Estes bezerros PI, ao se infectarem por amostras citopatogênicas, invariavelmente desenvolverão a chamada doença das mucosas (BEDEKOVIC et al., 2011; DINTER; MOREIN, 1990; DRISKELL; RINDAPATH, 2006; EDMONDSON et al., 2007; FULTON et al., 2009; LIEBLER-TENORIO, 2005).

A infecção pós-natal de bovinos soronegativos de outras categorias pode resultar também em enfermidade respiratória, entérica, hemorrágica ou infertilidade temporária (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; DINTER; MOREIN, 1990; DRISKELL; RINDAPATH, 2006).

Na doença das mucosas, os sinais clínicos mais comuns incluem anorexia, depressão, diarreia profusa, diminuição da produção de leite, febre, atonia ruminal, salivação, lacrimejamento, secreção nasal mucopurulenta, erosões e úlceras no focinho e na cavidade oral, fezes fétidas, podendo conter muco e quantidades variáveis de sangue (SCOTT et al., 2008; VAN KRUININGEN, 1998). Na histopatologia, os achados variam consideravelmente, principalmente nos casos agudos da doença das mucosas. As principais lesões observadas são a depleção linfóide em tonsilas, linfonodos,

baço, placas de Peyer e aglomerados linfóides associados à mucosa, erosões e úlceras na banda coronária dos cascos, cavidade oral, esôfago, retículo, omaso, abomaso e células apoptóticas na superfície das criptas dos intestinos delgado e grosso. Ocasionalmente, pode haver congestão difusa no intestino delgado, com destruição do epitélio das criptas e degeneração hialina e necrose fibrinoide de vasos da submucosa e de arteríolas mesentéricas (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; LIEBLER-TENORIO, 2005).

O diagnóstico é realizado por meio da observação dos sinais clínicos, do histórico do rebanho, dos achados macroscópicos e microscópicos e do isolamento viral (EDMONDSON et al., 2007). Entretanto, vários métodos rápidos e precisos, como teste ELISA, imunofluorescência direta, virusneutralização, RT-PCR e imuno-histoquímica, têm sido descritos (ANDRADE et al., 2005; BEDEKOVIC et al., 2011; CORNISH et al., 2005; DRISKELL; RIDPATH, 2006; FULTON et al., 2009; SINGH et al., 2011).

A escolha das estratégias mais adequadas para a profilaxia e o controle da infecção pelo BVDV depende, basicamente, das condições específicas de cada rebanho. Em geral, o foco principal consiste na eliminação dos animais PI das unidades produtivas, além da utilização de vacinas (BEDEKOVIC et al., 2011; CORNISH et al., 2005; EDMONDSON et al., 2007; SANTOS et al., 2011; SCOTT et al., 2008).

#### **2.3.4 Salmonelose**

A salmonelose é uma doença infectocontagiosa, causadora de importante morbidade e mortalidade em bovinos, além de várias outras espécies animais. A doença resulta em significativas perdas econômicas (BALOWS et al., 1995; SCHAUSER; OLSEN; LARSSON, 2004; SELEIM et al., 2002; WATANABE et al., 2011; WRAY; DAVIES, 2000) e apresenta relevante

potencial zoonótico, sendo veiculada, principalmente, pelo consumo de derivados lácteos e cárneos (BETANCOR et al., 2012; HOUSE; SMITH; KAMIYA, 2001; MOUSSA et al., 2012; WRAY; DAVIES, 2000).

A bactéria pertence à Família Enterobacteriaceae, é gram-negativa, intracelular facultativa, não formadora de esporos, aeróbia ou anaeróbia facultativa e, geralmente, móvel. O gênero é formado por apenas uma espécie, a *Salmonella enterica*, que tem 7 subespécies e, aproximadamente, 2.200 sorotipos (NIELSEN; KUDAHL; OSTERGAARD, 2012). O agente contém três tipos de antígenos que são: somático (O), associado à parede celular e composto por lipopolissacarídeos; flagelar (H), de natureza proteica e capsular (Vi), encontrado somente em alguns sorotipos de *Salmonella*.

Apesar de vários sorotipos já terem sido encontrados em bovinos, os mais frequentemente observados são *S. typhimurium* e *S. dublin* (SILVA et al., 2008). Este último provoca, no bovino adulto, um estado de portador, característica de extrema importância para a manutenção da enfermidade no rebanho e como reservatório para infecções em humanos (BALOWS et al., 1995; BETANCOR et al., 2012; BROWN; BAKER; BARKER, 2007; SCOTT et al., 2008; TURNER, 2009; WRAY; DAVIES, 2000).

Geralmente, a salmonelose acomete animais com idades superiores a sete dias, ao contrário do que é observado na colibacilose, que ocorre em neonatos (BROWN; BAKER; BARKER, 2007). Os bezerros jovens são mais suscetíveis à infecção pela *Salmonella* sp. que bovinos adultos, devido à imaturidade do seu sistema imunológico, à inadequada microbiota gastrointestinal e à exposição contínua aos fatores estressantes do ambiente (SELEIM et al., 2002).

A rota de infecção da *Salmonella* spp. em bovinos é, predominantemente, pela via oral e, embora possa infectar virtualmente qualquer lugar do trato gastrointestinal, o local clássico de invasão é a placa de Peyer,

principalmente por meio da entrada em células M (DESMIDT; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1998; NIELSEN; KUDAHL; OSTERGAARD, 2012; SCHAUSER; OLSEN; LARSSON, 2004; SRINIVASAN; MCSORLEY, 2006). Dependendo da virulência e da resposta do hospedeiro, a bactéria pode se multiplicar em macrófagos e neutrófilos e alcançar a circulação sanguínea, os tecidos linfáticos e órgãos, como baço e fígado (BALOWS et al., 1995; SILVA et al., 2008; TURNER, 2009).

Os principais sinais clínicos observados são resultantes de uma combinação dos mecanismos de diarreia dos intestinos delgado e grosso, aguda ou subaguda, acompanhada de febre, desidratação e septicemia. Ocasionalmente, os animais podem abortar ou manifestar um quadro de diarreia crônica, especialmente quando são relatados casos esporádicos em indivíduos adultos (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; CARRIQUE-MAS et al., 2010; SCOTT et al., 2008; WRAY; DAVIES, 2000).

No exame macroscópico, as alterações visualizadas nas fases iniciais da enfermidade são mais acentuadas no íleo, jejuno e cólon, em ordem decrescente de intensidade. Observam-se aumento dos linfonodos mesentéricos, com áreas de hemorragia, petéquias nas serosas dos intestinos e enterite catarral ou fibrinosa, associada à peritonite fibrinosa. Na microscopia, as lesões mais marcantes são necrose extensiva e ulceração da mucosa, atrofia e edema de vilosidades, com exsudato fibrinoso e neutrofílico em áreas ulceradas (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; WRAY; DAVIES, 2000). Lesões características, denominadas nódulos paratifoídes, também são observadas, principalmente no fígado e no baço, embora possam ser encontradas também nos rins, nos linfonodos e na medula óssea (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; SRINIVASA; MCSORLEY, 2006; WRAY; DAVIES, 2000).

O diagnóstico pode ser realizado pelo isolamento bacteriológico a partir de conteúdo fecal, semeando as amostras em meios de seletividade baixa ou

intermediária (BALOWS et al., 1995; SCOTT et al., 2008). Entretanto, como o estado de portador é possível, o isolamento a partir de amostras fecais não constitui prova inequívoca de relação com a doença (PARSONS et al., 1984). Em vários estudos tem sido demonstrada a utilização de técnicas imunológicas e moleculares, como a imuno-histoquímica, a microscopia eletrônica, ELISA, teste de aglutinação e PCR, para a detecção do agente em bovinos, suínos, ovinos, aves e humanos (BETANCOR et al., 2012; DESMIDT; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1998; HOUSE; SMITH; KAMIYA, 2001; MOUSSA et al., 2012; SELEIM et al., 2000; WATANABE et al., 2011; WRAY; DAVIES, 2000).

### 2.3.5 Colibacilose

A bactéria *Escherichia coli* é o agente etiológico envolvido nessa afecção típica de animais jovens. Em bovinos, as cepas enterotoxigênica, enteropatogênica e entero-hemorrágica são, reconhecidamente, causadoras de diarreia, porém, a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) constitui a cepa de maior importância epidemiológica, clínica e patológica (BALOWS et al., 1995; CALLAWAY et al., 2009; FOSTER; SMITH, 2009; MULLANEY; FRANCIS; WILLGOS, 1991; OK et al., 2009; SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992). A colibacilose tem grande impacto econômico na pecuária mundial e nacional, representando uma das principais causas de mortalidade entre bezerros leiteiros (DE VERDIER; OHAGEN; ALENIUS, 2003; FERREIRA, 2009; RADOSTITS et al., 2000; RIGOBELLO et al., 2006).

A *E. coli* é um bacilo gram-negativo, não formador de esporos, móvel e é frequentemente capsulado. Está presente na flora normal de intestinos de humanos e animais (PIÉRARD et al., 2012). A bactéria é classificada em sorogrupos e sorotipos, de acordo com a sua constituição antigênica. Os vários

sorotipos podem ser identificados a partir de quatro antígenos que são: somático (O), flagelares (H), capsulares (K) e fimbriais (F) (BALOWS et al., 1995; EWING; TUCKER, 2009; FERREIRA, 2009; TURNER, 2009).

A forma septicêmica da colibacilose é mais comum em indivíduos com até quatro dias de idade, associado à falha na absorção ou na ingestão do colostro ou quando uma cepa altamente patogênica está presente na cadeia epidemiológica da afecção (EWING; TUCKER, 2009; RADOSTITS et al., 2000;). Uma vez na corrente sanguínea, a bactéria pode provocar uma série de alterações, que incluem poliartrite, poliserosite, meningite, pielonefrite, pneumonia e uveíte (WHITLOCK, 1992).

A ETEC tem alta capacidade de adesão à superfície mucosa dos enterócitos, através de fímbrias, e produz toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST), que vão culminar na hipersecreção intestinal (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; EWING; TUCKER, 2009; OK et al., 2009; SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992). Essa adesão fimbrial é mediada pelos antígenos K99 (F5) e F41, que se ligam à superfície das células do intestino delgado por meio de receptores que são expressos no hospedeiro somente nos primeiros dois a três dias de vida (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; CHENEY; BOEDEKER, 1984; DE VERDIER; OHAGEN; ALENIUS, 2003; DOBBINS, 1984; PIÉRARD et al., 2012; RADOSTITS et al., 2000; RIGOBELLO et al., 2006; SCOTT et al., 2008). Além disso, a produção da toxina ST estimula a atividade do GMPC, inibindo a absorção pelos enterócitos (DE VERDIER; OHAGEN; ALENIUS, 2003; FOSTER; SMITH, 2009; RADOSTITS et al., 2000).

A perda de fluidos e de eletrólitos leva, rapidamente, o animal à desidratação, fraqueza, coma, acidose, colapso circulatório, hipercalemia e hipoglicemia, resultando na morte, caso medidas terapêuticas não sejam

realizadas a tempo (RADOSTITS et al., 2000; RIGOBELLO et al., 2006; SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992).

As lesões macroscópicas, quando presentes, são pouco evidentes e específicas. Entretanto, no exame histopatológico, observam-se bactérias aderidas na superfície das vilosidades e pode haver, ainda, atrofia e fusão leves das vilosidades no jejuno e íleo (RADOSTITS et al., 2000; BROWN; BAKER; BARKER, 2007). A diarreia produzida pela ETEC promove pouca inflamação e alterações na mucosa intestinal, quando comparada às outras cepas (BROWN; BAKER; BARKER, 2007).

A *E. coli* pode ser isolada por meio de cultura bacteriana, porém, a base do diagnóstico está na detecção dos antígenos de adesão (adesinas). Outros testes, como ELISA, soroglutinação, imunofluorescência indireta, PAGE, PCR e imuno-histoquímica, também têm sido descritos na literatura (DE VERDIER; OHAGEN; ALENIUS, 2003; FERREIRA, 2009; ISLING et al., 2011; OK et al., 2009; THORNS et al., 1989).

### **2.3.6 Criptosporidiose**

O *Cryptosporidium* spp., parasito do filo Apicomplexa, encontra-se frequentemente associado a quadros de diarreias em bovinos com uma a duas semanas de idade. É uma zoonose que afeta todas as classes de vertebrados, com uma aparente falta de especificidade (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; FAYER; XIAO, 2007). Das dez espécies reportadas em bovinos, as de maior importância são o *Cryptosporidium parvum* e o *Cryptosporidium andersoni* (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; FAYER; XIAO, 2007; FOSTER; SMITH, 2009; FUENTE et al., 1999; SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992).

O *Cryptosporidium* spp. pode ser encontrado tanto no trato gastrointestinal quanto no respiratório de mamíferos, aves, répteis e peixes

(BROWN; BAKER; BARKER, 2007; DUBEY; SPEER; FAYER, 1990). Em bezerros leiteiros, a infecção entérica é mais comum, afetando tipicamente o íleo, e a prevalência da infecção pelo *Cryptosporidium parvum* pode chegar a 100% (BRANDÃO et al., 2007a; FOSTER; SMITH, 2009). A ingestão de oocistos infectantes leva à multiplicação do parasito nos enterócitos do hospedeiro, em três estágios - merogonia, gamogonia e esporogonia- e à eliminação de novos oocistos nas fezes, sem a necessidade de maturação fora do hospedeiro (SCOTT et al., 2008).

Sabe-se que nem todos os animais infectados manifestam o quadro de diarreia e que, muitas vezes, a doença clínica está associada à coinfeção com outros patógenos, como *Escherichia coli*, coronavírus e rotavírus (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; DUBEY; SPEER; FAYER, 1990; FUENTE et al., 1999) . Os sinais clínicos observados incluem apatia, anorexia e perda de peso, decorrentes da diarreia malabsortiva e secretória, aquosa, profusa, de coloração esverdeada a amarelada, que se instala (SCOTT et al., 2008; WHITLOCK, 1992). As lesões observadas são congestão da mucosa, atrofia leve a moderada das vilosidades do íleo, dilatação das criptas preenchidas por células descamativas e neutrófilos, acompanhada da alteração do formato dos enterócitos, que se tornam cuboidais ou pavimentosos. Os parasitos também são frequentemente encontrados na superfície das vilosidades (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; DUBEY; SPEER; FAYER, 1990; SCOTT et al., 2008; TURNER, 2009).

O diagnóstico pode ser realizado por ELISA, imunofluorescência direta, “Western blot”, “dot blot” e métodos de coloração especiais dos esfregaços de amostras fecais ou de cortes histológicos. As colorações mais empregadas são Giemsa e Ziehl-Neelsen modificado (FAYER; XIAO, 2007; FUENTE et al., 1999; SCOTT et al., 2008).

### 2.3.7 Eimeriose e giardíase

A eimeriose, ou coccidiose, é uma enfermidade causada por protozoários coccídeos do gênero *Eimeria* spp. As espécies *Eimeria bovis* e *Eimeria zuernii* são as mais comuns em bovinos jovens. A eimeriose gera perdas econômicas para a cadeia produtiva, em virtude do quadro de perda de peso e emaciação progressivas, causadas pela diarreia aquosa acentuada e, por vezes, com presença de sangue, principalmente nos animais de três a seis meses de idade. Macroscopicamente, observam-se hiperemia das serosas e distensão das alças intestinais por líquido. As lesões se caracterizam pela presença de necrose de vilosidades e criptas, que resulta em atrofia pela perda das células epiteliais, associada à congestão e infiltrado inflamatório tipicamente mononuclear, embora, também, possam ser visualizados eosinófilos. O método diagnóstico mais utilizado para a detecção da *Eimeria* spp. é a contagem de oocistos nas fezes, embora não permita a diferenciação entre espécies (BROWN; BAKER; BARKER, 2007; VAN KRUININGEN, 1998).

A giardíase é uma afecção causada pelo protozoário flagelado *Giardia* spp., que acomete o intestino delgado, particularmente duodeno, de várias espécies de mamíferos e aves (TURNER, 2009; VAN KRUININGEN, 1998). A enfermidade está relacionada a episódios de diarreia aquosa, acompanhada de perda de peso e apatia, porém o impacto econômico e a importância epidemiológica da giardíase nos sistemas de produção ainda são pouco conhecidos. A doença só se manifesta quando há uma infecção maciça ou o animal tem algum tipo de imunossupressão. A presença da *Giardia* spp. no intestino inibe a absorção de açúcares, provocando diarreia osmótica (TURNER, 2009).

No exame histopatológico, a *Giardia* spp. pode ser vista aderida aos enterócitos das vilosidades (VAN KRUININGEN, 1998). O diagnóstico da

giardíase, geralmente, é realizado por meio da centrifugação-flutuação em sulfato de zinco (REY, 2008).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados e as observações do presente trabalho trouxeram contribuições para o conhecimento acerca da etiopatogenia da diarreia e indicam que esta pode ser uma causa importante de morte de bovinos na região sul de Minas Gerais. A doença foi responsável por quase 10% das mortes em bovinos necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras, de 2007 a 2012. O reconhecimento adequado dos diversos enteropatógenos nas lesões encontradas nos tecidos permitiu uma associação clara entre o agente e a doença instalada no bovino.

As lesões evidenciadas na histopatologia ajudam a direcionar a pesquisa do(s) agente(s) relacionado(s) à infecção no intestino de diversos bovinos do presente estudo. Uma das interferências importantes neste aspecto do estudo foram as alterações *post mortem*, o que demonstra a necessidade da coleta de material com a maior brevidade possível após o óbito.

A necropsia e a histopatologia em tecidos bem preservados, associadas à imuno-histoquímica e a *nested* RT-PCR, podem auxiliar na determinação do papel de vírus, bactérias e protozoários no desenvolvimento da diarreia, em infecções isoladas ou mistas, gerando dados para a tomada de decisão e a prevenção da doença nos rebanhos.

Em alguns casos nos quais a histopatologia e a imuno-histoquímica não permitem o diagnóstico, a *nested* RT-PCR pode ser útil no diagnóstico do coronavírus bovino.

O surto de coronavirose em vacas (disenteria de inverno), durante o verão, descrito neste estudo, demonstrou que, como em outros países da Europa e da Ásia, no Brasil essa enfermidade também pode ocorrer em estação quente. O coronavírus bovino associado a este surto demonstrou tropismo concomitante pelo trato digestivo e respiratório. Com o desenvolvimento deste trabalho,

pretende-se implementar a linha de pesquisa relacionada aos enteropatógenos de bovinos, aumentando os serviços de extensão oferecidos pelo Setor de Patologia da UFLA à comunidade.

**REFERÊNCIAS**

ANDRADE, G. I. et al. Padronização da técnica imunoistoquímica para o diagnóstico etiológico de rotina da diarreia bovina a vírus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 710-714, out. 2005.

ARGENZIO, R. A. Pathophysiology of diarrhea. In: ANDERSON, N. V. **Veterinary gastroenterology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. chap. 10, p. 163-172.

ARNOLD, M. M.; PATTON, J. T. Rotavirus antagonism of the innate immune response. **Viruses-Basel**, Basel, v. 1, n. 3, p. 1035-1056, Nov. 2009.

ASANO, K. M. et al. Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. **Avian Diseases**, Athens, v. 55, n. 4, p. 697-700, Dec. 2011.

ASANO, K. M. et al. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 375-379, Nov. 2010.

ASANO, K. M. et al. Rapid detection of bovine coronavirus by a semi-nested RT-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 869-873, Nov. 2009.

BALOWS, A. et al. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1995. 1464 p.

BARTELS, C. J. M. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 93, n. 2/3, p. 162-169, Feb. 2010.

BASERA, S. S. et al. Detection of rotavirusinfection in bovine calves by RNA-PAGE and RT-PCR. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 21, n. 2, p. 144-147, Oct. 2010.

BECK, P. A. et al. Characterization of monoclonal antibodies against bovine rotavirus and their diagnostic applications. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 551-557, June 2007.

BEDKOVIC, T. et al. Implementation of immunohistochemistry on frozen ear notch tissue samples in diagnostic of bovine viral diarrhea virus in persistently infected cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 53, n. 1, p. 65-68, Dec. 2011.

BETANCOR, L. et al. Genomic comparison of the closely related *Salmonellaenterica* Serovars *Enteritidis* and *Dublin*. **The Open Microbiology Journal**, Gainesville, v. 6, p. 5-13, Feb. 2012.

BEZERRA JUNIOR, P. S. et al. Outbreak of diarrhea in cows from a dairy herd in the southern region of Minas Gerais State: detection of bovine coronavirus in the feces. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 992-995, Aug. 2009.

BRANDÃO, P. E. et al. A nested polymerase chain reaction to bovine coronavirus diagnosis. **Virus Review & Research**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 45-49, Abr. 2005.

BRANDÃO, P. E. et al. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus and cryptosporidium parvum in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 33-34, Jan./Mar. 2007a.

BRANDÃO, P. E. et al. On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 398-402, Oct. 2007b.

BRANDÃO, P. E. et al. Winter dysentery in cows associated with bovine coronavirus (BCoV). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 1074-1076, June 2007c.

BROWN, C. C.; BAKER, D. C.; BARKER, I. K. Alimentary system. In: MAXIE, M. G. **Pathology of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2007. v. 2, chap. 1, p. 1-296.

BUZINARO, M. G. et al. Prevalence of group a rotavirus in diarrheic feces of beef calves in semi-intensive production system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 266-270, June 2003.

CALDOW, G. L.; MUNRO, R. Necrotising enteritis in suckled calves. **Veterinary Record**, London, v. 137, n. 13, p. 307-311, Sept. 1995.

CALLAWAY, T. R. et al. Diet, *Escherichia coli* 0157:H7, and cattle: a review after 10 years. **Current Issues in Molecular Biology**, London, v. 11, n. 2, p. 67-80, Feb. 2009.

CARRIQUE-MAS, J. J. et al. *Salmonella* infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. **Veterinary Record**, London, v. 167, n. 15, p. 560-565, Oct. 2010.

CASHMAN, O. et al. Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 3/4, p. 238-244, Dec. 2010.

CHENEY, C. P.; BOEDEKER, E. C. Appearance of host intestinal receptors for pathogenic *E. coli* with age. In: BOEDEKER, E. C. **Attachment of organisms to the gut mucosa**. Boca Raton: CRC Press, 1984. v. 2, chap. 16, p. 157-176.

CHO, K. O. et al. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of Virology**, Wien, v. 146, n. 12, p. 2401-2419, Dec. 2001.

CIARLET, M. et al. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 1, p. 41-57, Jan. 2002.

COLOGNA, R.; HOGUE, B. G. Identification of a bovine coronavirus ackaging signal. **Journal of Virology**, Washington, v.74, n. 1, p. 580-583, Jan. 2000.

CORNISH, T. E. et al. Comparision of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine diarrhea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 17, n. 2, p. 110-117, Mar. 2005.

DAR, A. M.; KAPIL, S.; GOYAL, S. M. Comparision of mmunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 10, n. 2, p. 152-157, Apr. 1998.

DECARO, N. et al. Characterization of bubaline coronavirus strains associated with gastroenteritis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 3/4, p. 245-251, Oct. 2010.

DECARO, N. et al. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1/3, p. 30-39, June 2008.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella enteritidis* phage type four. **Poultry Science**, Savoy, v. 77, n. 1, p. 73-74, Jan. 1998.

DE VERDIER, K.; OHAGEN, P.; ALENIUS, S. No effect of a homeopathic preparation on neonatal calf diarrhoea in a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 44, n. 2, p. 97-101, June 2003.

DHAMA, K. et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 1-23, Jan. 2009.

DINTER, Z.; MOREIN, B. **Virus infections of ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science, 1990. 592 p.

DOBBINS, W. O. Alterations in intestinal structure associated with microorganisms. In: BOEDEKER, E. C. **Attachment of organisms to the gut mucosa**. Boca Raton: CRC Press, 1984. v. 1, chap. 13, p. 161-188.

DRISKELL, E. A.; RIDPATH, J. F. A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 18, n. 6, p. 600-605, Nov. 2006.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 208 p.

EDMONDSON, M. A. et al. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 19, n. 4, p. 376-381, July 2007.

EL-ATTAR, L. et al. Rotavirus cross-species pathogenicity: molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. **Virology**, San Diego, v. 291, n. 1, p. 172-182, Dec. 2001.

EWING, W. N.; TUCKER, L. A. **The living gut**. 2<sup>nd</sup> ed. Nottingham: Nottingham University, 2009. 168 p.

FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 576 p.

FERREIRA, M. G. **Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi-intensivas de duas bacias leiteiras do Estado de Minas Gerais**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhoea in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 13-36, Mar. 2009.

FROIS, M. C. M.; MODENA, C. M.; VIEGAS, D. M. Tendência histórica dos coeficientes de mortalidade de bezerros em Minas Gerais, 1960 a 1985. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 46, n. 6, p. 741-747, dez. 1994.

FUENTE, R. de la et al. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrhoeic dairy calves in central Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 179-185, Jan. 1999.

FUENTE, R. de la et al. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 145-152, Aug. 1998.

FULTON, R. W. et al. Multiply diagnostic tests to identify cattle with bovine viral diarrhea virus and duration of positive tests results in persistently infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 73, n. 4, p. 117-124, Oct. 2009.

GELINAS, A. M. et al. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus Research**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 43-57, July 2001.

GONZALEZ, D. D. et al. Evaluation of a bovine rotavirus VP6 vaccine efficacy in the calf model of infection and disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 155-160, Sept. 2010.

HALL, G. A. et al. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 240-250, Sept. 1988.

HAMMITT, M. C. et al. A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3/4, p. 343-352, Mar. 2008.

HAN, M. G. et al. Cross-protection against a human enteric coronavirus and a virulent bovine enteric coronavirus in gnotobiotic calves. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 24, p. 12350-12356, Sept. 2006.

HICK, P. M. et al. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. **Australian Veterinary Journal**, Hoboken, v. 90, n. 10, p. 381-386, Oct. 2012.

HOUSE, J. K.; SMITH, B. P.; KAMIYA, B. Serological distinction of bovine *Salmonella* carriers from vaccinated and acutely infected cows. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 13, n. 6, p. 483-488, Nov. 2001.

ISLING, L. K. et al. Host response to porcine strains of *Escherichia coli* in a novel pielonephritis model. **Journal of Comparative Pathology**, Oxford, v. 144, n. 4, p. 257-268, May 2011.

KIM, H. J. et al. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 3/4, p. 291-303, Sept. 2011.

KLEIN, D. et al. Evaluation of rapid assays for the detection of bovine coronavirus, rotavirus A and *Cryptosporidium* in faecal samples of calves. **Veterinary Journal**, Oxford v. 182, n. 3, p. 484-486, Dec. 2009.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell, 2005. chap. 7, p.121-143.

LOVATO, L. T.; DEZENGRINI, R. Orthomyxoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. cap. 24, p. 723-754.

MARTELLA, V. et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3/4, p. 246-255, Jan. 2010.

MEBUS, C. A. et al. Pathology of neonatal calf diarrhoea induced by a coronavirus-like agent. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 10, p. 45-64, Jan. 1973.

MORRIS, W. E. et al. Necrotic enteritis in young calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 23, n. 3, p. 254-259, Mar. 2011.

MOUSSA, I. M. et al. Rapid detection and characterization of *Salmonella enterica* serovars by multiplex polymerase chain reaction assay. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 11, n. 14, p. 3452-3458, Feb. 2012.

MULLANEY, C. D.; FRANCIS, D. H.; WILLGOS, J. A. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 3, n. 2, p. 115-118, Apr. 1991.

NIELSEN, L. R.; KUDAHL, A. B.; OSTERGAARD, S. Age-structured dynamic, stochastic and mechanistic simulation model of *Salmonella Dublin* infection with dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 105, n. 1/2, p. 59-74, June 2012.

NIKUNEN, S. et al. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 143-151, May 2007.

OLIVEIRA FILHO, J. P. et al. Diarreia em bezerros da raça nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 419-424, out. 2007.

OK, M. et al. The studies on the etiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **Zoonoses and Public Health**, Hoboken, v. 56, n. 2, p. 94-101, Mar. 2009.

PARK, S. J. et al. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, Sept. 2006.

PARK, S. J. et al. Detection and molecular characterization of calf diarrhoea bovine coronaviruses circulating in South Korea during 2004-2005. **Zoonoses and Public Health**, Hoboken, v. 54, n. 6/7, p. 223-230, Sept. 2007a.

PARK, S. J. et al. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives of Virology**, Wien, v.152, n. 10, p. 1885-1900, Oct. 2007b.

PARRENO, V. et al. Milk supplemented with immune colostrum: protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 136, n. 1/2, p. 12-27, July 2010.

PARSONS, K. R. et al. Localization of enteropathogens in paraffin embedded tissue by immunoperoxidase. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 37, n. 6, p. 645-650, June 1984.

PAVARINI, S. P. et al. Clinic pathological features during a winter dysentery outbreak in cattle in Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 611-616, Dec. 2008.

PIÉRARD, D. et al. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. **Veterinary Research**, London, v. 43, n. 1, p. 1-13, Feb. 2012.

RADOSTITIS, O. M. et al. **Veterinary medicine**: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. chap. 3, p. 769-802.

REY, L. Flagelados das vias digestivas e geniturinárias: tricomoníase e giardíase. In: REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 30, p. 411-421.

RIGOBELLO, E. C. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 305-310, June 2006.

RYCKE, J. de et al. Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. **Annales de Recherches Vétérinaires**, London, v. 17, n. 2, p. 159-168, 1986.

SANTOS, A. S. et al. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarréia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 10, p. 885-892, out. 2011.

SCHAUSER, K.; OLSEN, J. E.; LARSSON, L. Immunocytochemical studies of *Salmonella Typhimurium* invasion of porcine jejunal epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 53, n. 7, p. 691-695, July 2004.

SCOTT, P. R. et al. **Medicina bovina**: doenças e criação de bovinos. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 1080 p.

SELEIM, R. S. et al. *Salmonella* infection in calves: virulence proteins and its immunogenic properties. In: INTERNATIONAL RESEARCH ON FOOD SECURITY, NATURAL RESOURCE MANAGEMENT AND RURAL DEVELOPMENT, 2002, Kassel-Witzenhausen. **Proceedings...** Kassel-Witzenhausen: University of Hohenheim, 2002. Disponível em: < <http://www.tropentag.de/2002/abstracts/full/178.pdf> >. Acesso em: 17 nov. 2012.

SILVA, D. G. et al. Avaliação clínica da infecção experimental de bezerros com *Salmonella Dublin*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 251-255, dez. 2008.

SINGH, K. et al. Development of a novel diagnostic test for detection of bovine viral diarrhea persistently infected animals using hair. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 12, n. 3, p. 295-297, Sept. 2011.

SOUZA, S. P. **Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de genótipos para o coronavírus bovino (BCoV)**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SRINIVASAN, A.; MCSORLEY, S. J. Activation of *Salmonella*-specific immune response in the intestinal mucosa. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, Basel, v. 54, n. 1, p. 25-31, Jan./Feb. 2006.

THORNS, C. J. et al. Evaluation of monoclonal antibodies to K88, K99, F41 and 987P fimbrial adhesins for the detection of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* in paraffin-wax tissue sections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 377-381, Aug. 1989.

TURNER, J. R. The gastrointestinal tract. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. **Robbins and cotran: pathologic basis of disease**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2009. chap.18, p. 763-831.

VAN KRUININGEN, H. J. et al. Calfhood coronavirus enterocolitis: a clue to the etiology of winter dysentery. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 24, n. 6, p. 564-567, Nov. 1987.

VAN KRUININGEN, H. J. Sistema gastrointestinal. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2<sup>nd</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. chap. 1, p. 13-80.

WATANABE, T. T. N. et al. Rectal stenosis in pigs associated with *Salmonella Typhimurium* and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 6, p. 511-515, June 2011.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 143-148, Sept. 1988.

WHITLOCK, R. H. Diarrhea in cattle. In: ANDERSON, N. V. **Veterinary gastroenterology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. chap. 31, p. 755-802.

WILSON, H. L. et al. Molecular analyses of disease pathogenesis: application of bovine microarrays. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 105, n. 3/4, p. 277-287, May 2005.

WRAY, C.; DAVIES, R. H. Salmonella infections in cattle. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2000. chap. 10, p. 169-190.

ZHANG, G. et al. Application of immunohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-embedded formalin-fixed intestines. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11, p. 2964-2965, Nov. 1997.

ZHU, W. et al. Rapid and sensitive detection of bovine coronavirus and group A bovine rotavirus from fecal samples by using one-step duplex RT-PCR assay. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 73, n. 4, p. 531-534, Apr. 2011.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

(Este artigo será submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

**SURTO DE CORONAVIROSE BOVINA EM VACAS LEITEIRAS EM  
ESTAÇÃO QUENTE NO BRASIL**

**ABSTRACT.** – Lopes P.F.R., Abreu C.C., Pavarini S.P., Driemeier D., Barros I.N., Brandão P.E., Seixas J.N., Varaschin, M.S. & Bezerra Junior P.S. 2013. [Outbreak of bovine coronaviruses in dairy cattle during the warmer season in Brazil.] Surto de coronavirose bovina em vacas leiteiras em estação quente no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil. E-mail: [bezerraj@dmv.ufla.br](mailto:bezerraj@dmv.ufla.br)

An outbreak of winter dysentery in a dairy cattle herd was monitored in southern Minas Gerais, Brazil. In a total of 30 bovines, 15 (50%) cows exhibit diarrhea, associated with serous nasal discharge in some animals and, among those, one died (3%). A histopathological, molecular and immunohistochemical investigation has been carried out to detect bovine coronavirus (BCoV) in the dead cow. At necropsy, the most substantial alteration was observed in the spiral loop of the ascending colon. Grossly, there were foci of erosions and hemorrhage in the mucosa and a large amount of blood in the colonic lumen and, in the histopathology, crypt cells necrosis in these areas. It was also observed a moderate amount of yellowish catarrhal discharge in the nasal cavity, trachea and bronchi. Based on epidemiological and pathological data, a molecular and immunohistochemical investigation was performed to evaluate the bovine coronavirus (BCoV) involvement in the outbreak and to exclude other possible differential diagnosis and coinfections. By nested RT-PCR, five

of the seven faecal samples from clinically affected dairy cows were BCoV positive. In the immunohistochemical detection of BCoV in the necropsied cow were found viral antigens in the cytoplasm of the infected crypt enterocytes and in the respiratory epithelium of the nasal turbinates. Three of six faecal samples from cows showed a moderate nematode coinfection. The paired serologic testing for bovine viral diarrhoea virus was negative in all samples tested. The hematological analysis did not reveal any consistent alterations in the diarrheic cows. The present study reports the occurrence of an outbreak of coronaviruses in adult cows at summer and the concomitant involvement of the digestive and respiratory tracts.

INDEX TERMS: bovine, diarrhoea, respiratory coronavirus, summer, winter dysentery.

**RESUMO** – Um surto de disenteria de inverno foi acompanhado, em março de 2010, em um rebanho de gado de leite no sul de Minas Gerais, Brasil. Em um total de 30 bovinos, 15 (50%) vacas apresentaram diarreia, associada a corrimento nasal seroso em alguns animais e, dentre estas, uma veio a óbito (3%). Na necropsia, a principal alteração foi observada na alça espiral do cólon ascendente. Macroscopicamente, havia erosões e hemorragia na mucosa e grande quantidade de sangue no lúmen e, na histopatologia, necrose de criptas desta área. Foi também visualizada uma quantidade moderada de secreção catarral amarelada na cavidade nasal, na traqueia e nos brônquios. Com base nos dados epidemiológicos e patológicos, uma investigação imuno-histoquímica e molecular foi realizada para avaliar o envolvimento do coronavírus bovino (BCoV) no surto, bem como o diagnóstico diferencial e possíveis coinfeções. Cinco de sete amostras fecais de vacas clinicamente afetadas submetidas a *nested* RT-PCR para BCoV foram positivas. Na imuno-histoquímica para BCoV

na vaca submetida a necropsia foram detectados antígenos virais no citoplasma dos enterócitos das criptas do cólon e do epitélio respiratório dos cornetos nasais. Três de seis amostras fecais de vacas revelaram moderada coinfeção por nematódeos. A sorologia pareada para o vírus da diarreia viral bovina foi negativa em todas as amostras testadas. O exame hematológico não revelou alterações consistentes nas vacas afetadas. No presente estudo, relata-se a ocorrência de um surto de coronavirose em animais adultos, no verão e o envolvimento concomitante dos sistemas digestivo e respiratório.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovino, diarreia, verão, coronavírus respiratório, disenteria de inverno.

## INTRODUÇÃO

O coronavírus bovino (BCoV) é um vírus pneumoentérico, membro do gênero *Coronavirus*, pertencente à família Coronaviridae, responsável por quadros de diarreia e infecção do trato respiratório em bovinos e em ruminantes selvagens (Cho et al. 2001, Jeong et al. 2005, Decaro et al. 2008, Scott et al. 2008, Saif 2010). Em neonatos, o BCoV, geralmente, cursa com diarreia grave e, em adultos, principalmente nas vacas leiteiras, com a denominada disenteria de inverno (DI).

A DI é uma doença infecciosa amplamente distribuída, de aspecto sazonal, que se caracteriza pela ocorrência de diarreia de curso agudo e, muitas das vezes, hemorrágica. Embora a morbidade seja alta, a mortalidade tende a ser baixa e as perdas econômicas de maior impacto advêm da queda acentuada na produção leiteira (Saif 1990; Park et al. 2006, Brandão et al. 2007b, Decaro et al. 2008, Pavarini et al. 2008, Bezerra Jr et al. 2009).

A DI já foi descrita em vários países e, no Brasil, há registros de sua ocorrência nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Brandão et al. 2002, Brandão et al. 2007a, Brandão et al. 2007b, Pavarini et al. 2008, Bezerra Jr et al. 2009). A DI é mais frequentemente observada nas estações frias, o que pode ser atribuído à maior sensibilidade do vírus a temperaturas mais elevadas e ao estresse térmico a que os animais são expostos neste período (Park et al. 2006, Decaro et al. 2008), e os surtos descritos no Brasil acompanham esta tendência (Brandão et al. 2002, Brandão et al. 2007a, Brandão et al. 2007b, Pavarini et al. 2008, Bezerra Jr et al. 2009). Não obstante, há raras descrições de surtos de DI em épocas mais quentes do ano, no leste da Ásia (Fukutomi et al. 1999, Park et al. 2006) e no oeste da Europa (Decaro et al. 2008), situação que não foi descrita no Brasil até o momento.

O diagnóstico da coronavirose é realizado, principalmente, pela detecção do BCoV, seus antígenos ou RNA nas fezes de bovinos, durante os surtos de diarreia (Brandão et al. 2007a, Pavarini et al. 2008, Bezerra Jr et al. 2009). Porém, alguns autores questionam a correlação da detecção isolada do vírus nas fezes com a doença clínica, visto que o BCoV também pode ser encontrado em fezes de bovinos clinicamente sadios (Radostits et al. 2000). Estudos patológicos e imuno-histoquímicos têm sido importantes para estabelecer uma correlação inequívoca do vírus com a doença do rebanho, embora sejam pouco frequentes, devido à baixa letalidade da doença (Pavarini et al. 2008).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de descrever um surto de coronavirose bovina em vacas leiteiras durante o verão, na região sul do estado de Minas Gerais, Brasil. Foram avaliadas as alterações clínicas e patológicas dos animais acometidos e realizada *nested* RT-PCR, histopatologia e imuno-histoquímica para o diagnóstico do BCoV.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Dados meteorológicos, histórico do rebanho e dados clínicos**

O surto de DI descrito ocorreu no mês de março de 2010, em uma propriedade leiteira da região de Lavras, no sul do estado de Minas Gerais, Brasil. Os dados meteorológicos da região para o mês foram obtidos no Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia (Dados da Rede do INMET 2013). A temperatura máxima média registrada no período foi de 29,7°C e a mínima, de 18,3°C, com temperatura compensada média de 23,1 °C. Nesse período, a umidade relativa do ar média foi de 78,3%, a precipitação pluviométrica total foi de 97,7mm, com precipitação em 18 dias, e a insolação total foi de 218,4 horas.

O histórico do rebanho e os dados clínicos dos bovinos afetados foram obtidos junto ao proprietário e aos funcionários da propriedade, durante as visitas para acompanhamento do surto. O rebanho era composto por trinta animais da raça Girolando, entre novilhas, vacas e bezerros, alimentados com capim e cana picados e farelo de milho. Embora as fêmeas fossem criadas separadamente dos bezerros, as instalações eram bem próximas. Os animais eram vacinados contra raiva, brucelose e clostridioses, anualmente e não era feita vacinação contra a diarreia viral bovina. Dois meses antes do início do surto, um bezerro com diarreia foi adquirido em leilão e introduzido na propriedade. De todo o rebanho, 15 vacas (50%) apresentaram diarreia esverdeada. Em sete vacas que desenvolveram um quadro clínico mais grave, havia sangue nas fezes. Os sinais clínicos evidenciados nos animais eram febre, apatia, hiporexia, hipogalactia moderada a acentuada e corrimento nasal seroso, em alguns animais. A diminuição da ingestão de alimento foi observada principalmente nas novilhas e a evolução da doença variou entre dois e dez dias,

com curso médio de sete dias. Das vacas doentes, oito apresentaram sintomatologia mais branda, recuperando-se em até dez dias. Apesar de 93,3% (14/15) das vacas terem se recuperado da doença, a produção de leite não retornou aos níveis anteriores.

### **Histopatologia e imuno-histoquímica para detecção do BCoV**

Submeteu-se à necropsia a vaca que evoluiu para o óbito na propriedade, procedendo-se à coleta de fragmentos de diversos órgãos, em formol a 10% tamponado, que foram processados rotineiramente para histopatologia. Cortes de 5µm foram confeccionados e corados pela hematoxilina e eosina.

Fragmentos de cólon espiral e corneto nasal foram submetidos à imuno-histoquímica para BCoV, conforme protocolo descrito previamente por Pavarini et al. (2008). Como anticorpo primário foi empregado o anticorpo monoclonal para BCoV 8F2 (Rural Tech<sup>®</sup>, South Dakota, USA), na diluição de 1:300 em PBS, por uma hora, em temperatura ambiente.

Fragmentos do intestino também foram submetidos à imuno-histoquímica para *Salmonella* spp., segundo protocolo adaptado descrito por Watanabe et al. (2011). Foi utilizado o anticorpo policlonal antissalmonella (8209-4006, AbD SeroTec<sup>®</sup>, Oxford, UK), na diluição de 1:10000 em PBS e incubado, *overnight*, a 4°C.

Em todos os testes foi utilizado, como controle positivo, um caso confirmado laboratorialmente pelo isolamento bacteriano ou PCR e, como controle negativo, foi realizada a incubação de tecidos suspeitos com PBS, omitindo-se os anticorpos primários.

### ***Nested* RT-PCR para detecção do BCoV**

Amostras fecais das sete vacas e do bezerro introduzido dois meses antes do surto foram coletadas diretamente da ampola retal, acondicionadas e congeladas para pesquisa de RNA do BCoV por meio da *nested* RT-PCR. Na primeira reação de PCR foi utilizado o *primer* senso 2Bp 5' ACTCARWTRAATYTNAAATAYGC 3' e o *primer* antissenso 4Bm 5' TCACAYTTWGGATARTCCCA 3'. Já na segunda reação, os *primers* adicionados foram o senso CV2U 5' TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA 3' e o antissenso CV2L 5' AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA 3', para amplificar um fragmento de 136bp do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (RpRd) dos coronavírus do grupo II, segundo protocolo descrito por Brandão et al. (2005). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo.

### **Investigação sorológica para BVDV**

De seis vacas com diarreia e do bezerro introduzido dois meses antes do surto foram coletadas amostras pareadas de sangue, para a obtenção de soro, com intervalo de três semanas. O sangue foi obtido por venopunção da veia epigástrica cranial (nas vacas) e jugular (bezerro), em tubos sem anticoagulante. As amostras de soro foram encaminhadas para o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul, para a realização de sorologia pareada para diarreia viral bovina, pela prova de soroneutralização.

### **Investigação parasitológica e hematológica**

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de sete animais doentes, em sacos plásticos individuais, devidamente identificados e acondicionados sob refrigeração até a chegada ao laboratório. O exame coproparasitológico para contagem de ovos (OPG) e oocistos (OOPG) por grama de fezes foi empregado segundo a técnica de McMaster modificada, descrita por Gordon & Whitlock (1939).

O perfil hematológico de seis animais também foi avaliado, por meio da coleta de sangue por venopunção da veia epigástrica cranial (nas vacas) e jugular (no bezerro) em tubos com anticoagulante (EDTA) e mantidos resfriados até a análise das amostras, por método automatizado. No eritrograma, determinaram-se o número de hemácias, hemoglobina e hematócrito; os índices hematimétricos; o volume corpuscular médio (VCM), além de hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma procedeu-se à contagem global e diferencial do número de leucócitos, bem como à avaliação da relação neutrófilo:linfócito. O número de plaquetas também foi descrito.

## **RESULTADOS**

Durante o exame de necropsia do único caso fatal observado neste surto, foi observado que as mucosas externas e a carcaça estavam hipocoradas. Os principais achados macroscópicos foram observados na alça espiral do cólon ascendente. A serosa deste segmento apresentava hiperemia leve a moderada e o lúmen estava preenchido por grande quantidade de coágulos sanguíneos e conteúdo líquido sanguinolento. Na mucosa destas áreas havia hiperemia difusa e moderada, além de petéquias, equimoses e erosões irregulares de 0,1 a 0,5cm

de diâmetro na mucosa que, por vezes, se apresentavam em arranjo linear (Fig.1). No lúmen da cavidade nasal, da traqueia e dos brônquios foi observada moderada quantidade de secreção catarral amarelada (Fig.2).

Os principais achados histopatológicos também se restringiram à alça espiral do cólon ascendente. Havia um moderado número de criptas com dilatação, desnudamento ou revestimento por células cuboidais e/ou pavimentosas, e com detritos necróticos no lúmen. Na lâmina própria foi observada inflamação predominantemente mononuclear leve e difusa, com raros eosinófilos. No exame imuno-histoquímico, houve intensa marcação para BCoV no citoplasma de enterócitos de criptas do cólon e no epitélio respiratório do corneto nasal (Fig.3 e 4). A imuno-histoquímica para *Salmonella* spp. não detectou nenhum antígeno associado às lesões do cólon espiral.

O teste de *nested*RT-PCR para detecção do BCoV foi positivo em 71,4% (5/7) das amostras avaliadas, resultando na formação do fragmento esperado de 136pb e nenhuma amplificação inespecífica de bandas foi observada. A amostra fecal do bezerro introduzido na propriedade dois meses antes do surto foi negativa.

A sorologia para BVDV foi negativa em todas as amostras testadas, tanto as da primeira coleta quanto as dos mesmos animais, três semanas após, evidenciando que não houve soroconversão dos animais, no período avaliado, durante o surto de diarreia. A contagem de OPG nas fezes revelou a presença de ovos de *Strongyloidea* sp. em 57,1% (4/7) das amostras, com índices variando de 100 a 1800 ovos por grama de fezes. Somente em um animal (14,3%) foi detectado um baixo número de oocistos, compatíveis com *Eimeria* sp.

Na avaliação hematológica, as médias e o desvio padrão das principais variáveis estão sumarizadas na Tabela 1, obtidas de seis amostras de sangue coletadas durante o surto de coronavirose.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico da coronavirose nos bovinos deste estudo foi baseado nos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos, semelhantes aos descritos na literatura para a disenteria de inverno (DI) dos bovinos. Características importantes descritas no histórico da DI, e observadas no rebanho deste estudo, são diarreia em vacas de início abrupto, com sangue em alguns animais, com alta morbidade, baixa mortalidade e queda acentuada na produção leiteira (Saif 1990, Cho et al. 2001, Brandão et al. 2007b, Natsuaki et al. 2007, Pavarini et al. 2008, Bezerra Jr et al. 2009). Em surtos de DI nos quais há óbitos, erosões e hemorragias na alça espiral do cólon ascendente associadas à necrose em criptas nesta área, como as observadas na vaca deste estudo submetida à necropsia, são as lesões consistentemente descritas (Van Kruiningen et al. 1987, Cho et al. 2001, Natsuaki et al. 2007, Pavarini et al. 2008).

Estes achados, em conjunto, foram importantes para um diagnóstico provisório da doença no rebanho em estudo. No entanto, a confirmação do envolvimento do BCoV depende de exames adicionais. Neste surto descrito, a confirmação se deu pela presença de antígenos virais nas lesões intestinais e na mucosa nasal da vaca submetida à necropsia e pela detecção do RNA viral nas fezes de cinco vacas afetadas. No caso apresentado, não havia lesões significantes em outros órgãos, nem mesmo nos cornetos nasais, em que houve marcação imuno-histoquímica para o BCoV. Além disso, neste surto merecem destaque a época de ocorrência da doença e o envolvimento concomitante do trato digestivo e do respiratório.

O relato de sinais clínicos respiratórios em alguns dos bovinos afetados, associados aos antígenos virais observados no trato respiratório do bovino submetido à necropsia, sugerem que o BCoV relacionado ao presente surto também apresentava tropismo pelo trato respiratório superior. Tal fato tem sido

mencionado, na literatura, para bezerros e vacas, durante surtos e em trabalhos experimentais de DI (Saif, 1990; Fukutomi et al. 1999, Cho et al. 2000, Travén et al. 2001, Decaro et al. 2008, Saif 2010). Entretanto, apenas um dos surtos de DI descritos no Brasil faz menção a sinais respiratórios em animais acometidos, caracterizados por secreção serosa nasolacrimal (Bezerra Jr et al. 2009). No presente trabalho, no entanto, a correlação do BCoV com os sinais clínicos e as lesões respiratórias pode ser confirmada por meio da imuno-histoquímica. É proposto, na patogênese da DI, que a replicação na mucosa nasal seria um evento inicial e que a presença de sinais respiratórios é variável, podendo ser leves ou mesmo ausentes (Saif 2010). Tal fato talvez justifique a não observação destes sinais clínicos em outros surtos reportados no Brasil.

O surto descrito no presente estudo ocorreu durante o final do verão, o que é incomum e descrito apenas em alguns dos surtos descritos no trabalho de Park et al. (2006), na Coreia do Sul. Os demais surtos ocorridos em períodos considerados quentes do ano foram relatados no outono (Fukutomi et al. 1999, Park et al. 2006, Decaro et al. 2008) e na primavera (Park et al. 2006). Os surtos descritos no Brasil ocorreram, principalmente, no inverno (Brandão et al. 2002, Brandão et al. 2007a, Brandão et al. 2007b), mas também no outono (Brandão et al. 2007a, Pavarini et al. 2008) e na primavera (Bezerra Jr et al., 2009).

Dos trabalhos de surtos em períodos considerados quentes, apenas Decaro et al. (2008) mencionam a temperatura durante o surto, sendo a temperatura média de 30°C, com máximas de 34°C, atípicas para o outono da região estudada. No presente caso, as temperaturas foram relativamente inferiores às descritas por Decaro et al. (2008) e variaram de 18°C a 30°C, com média de 23°C, temperaturas dentro do esperado para a época do ano na região (Dados da Rede do INMET, 2013). Estas temperaturas, por sua vez, foram superiores às mencionadas no surto descrito por Pavarini et al. (2008), no início do outono, no Rio Grande Sul, Brasil, que foram de 16 a 24°C. Os dados do

presente estudo corroboram o indicado por outros autores (Fukutomi et al. 1999, Travén et al. 2001, Park et al. 2006, Decaro et al. 2008, Pavarini et al. 2008) de que a temperatura ambiente nem sempre será um fator predisponente importante para a ocorrência da DI.

Os fatores predisponentes para a ocorrência da doença em estações quentes não têm sido determinados (Park et al. 2006, Decaro et al. 2008). A manutenção do vírus no ambiente em estações quentes tem sido atribuída à alta prevalência de infecção em determinadas regiões e a alterações nas propriedades biológicas do vírus, com aumento de sua resistência em temperaturas elevadas (Park et al. 2006). Estudos filogenéticos e da prevalência da infecção pelo BCoV em bovinos adultos são necessários para determinar a importância destes fatores em surtos na região sul de Minas Gerais.

No presente estudo, a introdução de um bezerro com diarreia no rebanho, dois meses antes do surto, foi mencionada pelo proprietário. No entanto, a importância deste bezerro no desencadeamento da doença no rebanho não pode ser determinada, uma vez que este não apresentava diarreia quando das visitas à propriedade e a pesquisa de BCoV nas fezes deste animal foi negativa. Alterações no manejo do rebanho estudado, que pudessem acarretar em estresse, não foram mencionadas pelo proprietário.

São escassos os trabalhos na literatura que avaliam as alterações hematológicas em bovinos naturalmente infectados pelo BCoV. As principais alterações hematológicas nestes casos são anemia normocítica normocrômica, neutrofilia com neutrófilos tóxicos e linfocitose. A anemia tem sido atribuída à hemorragia associada à lesão no trato gastrointestinal provocada pelo vírus (Natsuaki et al. 2007, Pavarini et al. 2008). Nas vacas do presente estudo, não foram evidenciadas alterações na contagem das células sanguíneas. Apenas o bezerro introduzido dois meses antes do surto apresentava uma anemia normocítica normocrômica moderada ( $3,14 \times 10^6/\mu\text{L}$ ). Não foi possível

determinar a causa da anemia neste animal, que foi atribuída à debilidade crônica, decorrente de sua condição geral.

O diagnóstico diferencial deve incluir outras causas de surtos de diarreia em bovinos adultos, de início abrupto, com alta morbidade, baixa mortalidade e importante impacto na produção leiteira. O principal diferencial é a infecção aguda pelo vírus da diarreia viral bovina (Radostits et al. 2000, Laureyns et al. 2011). A sorologia pareada demonstrou que o rebanho em estudo permaneceu negativo para BVDV após o surto de diarreia e que, portanto, este vírus não teve participação no presente surto.

A coinfeção com outros enteropatógenos pode aumentar a gravidade da doença relacionada ao BCoV (Saif 1990, Park et al. 2006, Natsuaki et al. 2007). Nos casos apresentados foi identificada uma coinfeção moderada por parasitas em três de sete bovinos avaliados. A pesquisa de antígenos de *Salmonella* spp. no intestino da vaca submetida à necropsia foi negativa. No exame histopatológico desta vaca não havia, além das lesões associadas ao antígeno do BCoV, outras lesões que indicassem infecção concomitante ou que pudessem justificar o quadro de diarreia.

A ocorrência deste surto de coronavirose em bovinos adultos (DI) no verão no hemisfério sul demonstra que, como na Ásia e na Europa, o envolvimento do BCoV deve ser também considerado em surtos de diarreia em bovinos adultos, mesmo nos períodos quentes no Brasil e em outras regiões de clima semelhante. O presente trabalho também demonstra a necessidade de se considerar o envolvimento do BCoV em quadros respiratórios em bovinos adultos, principalmente se associados com diarreia.

## REFERÊNCIAS

Bezerra Jr P.S., Brandão P.E., Pavarini S.P., Varaschin M.S., Wouters F., Villarreal L.Y.B., Jerez J.A. & Costa G.M. 2009. Surto de diarreia em vacas de um rebanho leiteiro na região sul de Minas Gerais: detecção de coronavírus bovino nas fezes. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 61:992-995.

Brandão P.E., Birgel Jr E.H., Gregori F., Rosales C.A.R., Ruiz V.L.A. & Jerez J.A. 2002. Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. *Arq Inst Biol*. 69:398-402.

Brandão P.E., Gregori F., Villareal L.Y.B., Rosales C.A.R., Soares R.M. & Jerez J.A. 2005. A nested polymerase chain reaction to bovine coronavirus diagnosis based on the RNA-dependent RNA-polymerase gene. *Virus Rev Res*. 10:45-49.

Brandão P.E., Gregori F., Sforsin A.J., Villareal L.Y.B. & Jerez J.A. 2007a. Winter dysentery in cows associated with Bovine Coronavirus (BCoV). *Arq Bras Med Vet Zoo*. 59:1074-1076.

Brandão P.E., Villareal L.Y.B., Gregori F., Souza S.L.P., Lopes M.A.E., Gomes C.R., Sforsin A.J., Sanches A.A., Rosales C.A.R., Richtzenhain L.J., Ferreira A.J.P. & Jerez J.A. 2007b. On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. *Pesq Vet Bras*. 27:398-402.

Cho K.O., Hasoksuz M., Nielsen P.R., Chang K.O., Lathrop S., Saif L.J. 2001. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter

dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch Virol.* 146:2401-2419.

Dados da Rede do INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Capturado em 09 de jan. Online. Disponível em: <[www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br)>.

Decaro N., Mari V., Desario C., Campolo M., Elia G., Martella V., Greco G., Cirone F., Colaianni M.L., Cordioli P. & Buonavoglia C. 2008. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet Microbiol.* 126:30-39.

Fukutomi T., Tsunemitsu H. & Akashi H. 1999. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch Virol.* 144:997-1006.

Gordon H.M. & Whitlock H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res.* 12:50-52.

Jeong J.H., Kim S.S., Yoon S.S., Park S.J., Im Y.J., Sung C.M., Jang O.J., Shin S.S., Koh H.B., Lee B.J., Lee C.Y., Kang M.I., Kim H.J., Park N.Y. & Cho K.O. 2005. Detection and isolation of winter dysentery Bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. *J Vet Med Sci.* 67:187-189.

Laureyns, J., Pardon, B., Letellier, C. & Deprez, P. 2011. Periparturient infection with bovine viral diarrhea virus type 1 causes hemorrhagic proctocolitis in a cow. *Can Vet J.* 52:1135-1139.

Natsuaki S., Goto K., Nakamura K., Yamada M., Ueo H., Komori T., Shirakawa H. & Uchinuno Y. 2007. Fatal winter dysentery with severe anemiy in an adult cow. *J Vet Med Sci.* 69:957-960.

Park, S.J., Jeong C., Yoon S. S., Choy H. E., Saif L. J., Park S. H., Kim Y. J., Jeong J. H., Park S. I., Kim H. H., Lee B. J., Cho H. S., Kim S. K., Kang M. I. & Cho, K. O. 2006. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J Clin Microbiol.* 44:3178-3188.

Pavarini S.P., Bezerra Jr P.S., Santos A.S., Pescador C.A., Brandão P.E., Souza S.P. & Driemeier D. 2008. Clinic pathological features during a winter dysentery outbreak in cattle in Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 28:611-616.

Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* 9 ed. W.B. Saunders, London. 1877p.

Saif L.J. 1990. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell Vet.* 80:303-311.

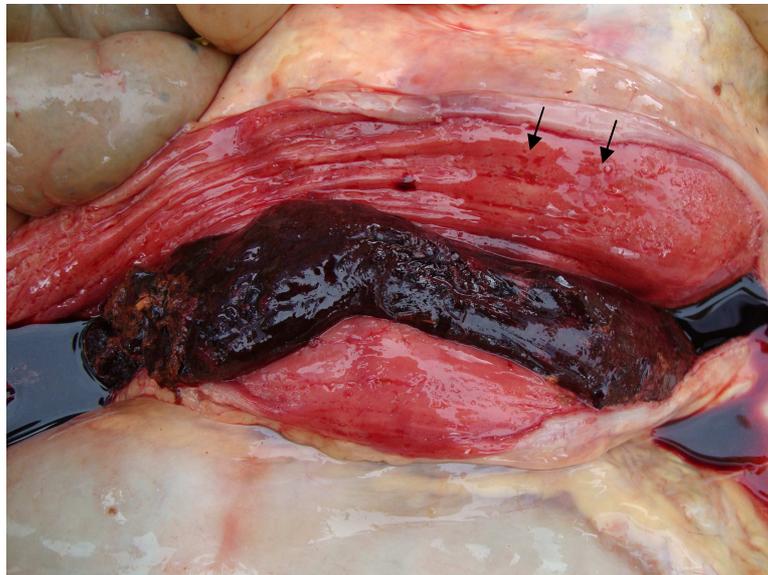
Saif L.J. 2010. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin N Am-Food A.* 26:349-364.

Scott P.R., Hall G.A., Jones P.W. & Morgan J. H. 2008. Diarreia dos Bezerros, p.162-189. In: Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd H. & Eddy R.G.(Eds), *Medicina Bovina: Doenças e Criação de Bovinos.* 2 Ed. Roca, São Paulo.

Traven M., Naslund K., Linde N., Linde B., Silvan A., Fossum C., Hedlund K.O. & Larsson B. 2001. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV—comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet Microbiol.* 81:127–151.

Van Kruiningen H.J., Khairallah L.H., Sasseville V.G., Wyand M.S. & Post J.E. 1987. Calfhood Coronavirus enterocolitis: a clue to the etiology of winter dysentery. *Vet Pathol.* 24:564-567.

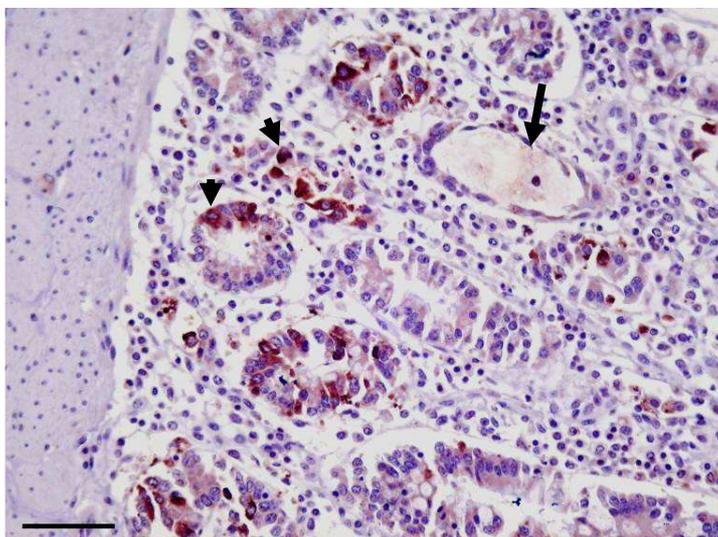
Watanabe T.T.N., Zlotowski P., Oliveira L.G.S., Rolim V.M., Gomes M.J.P., Snel G. & Driemeier D. 2011. Rectal stenosis in pigs associated with *Salmonella* Typhimurium and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection. *Pesq Vet Bras.* 31:511-515.



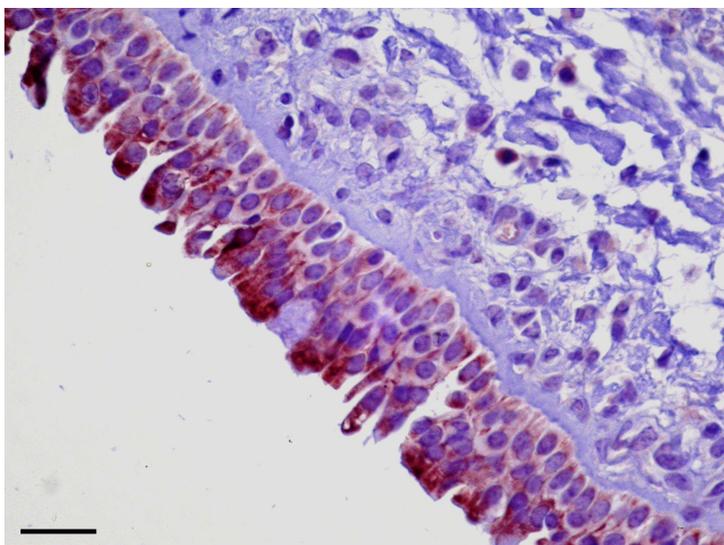
**Fig.1.** Coronavirose bovina em vacas. Alça espiral do cólon ascendente. Hiperemia difusa, hemorragia e erosões irregulares na mucosa (setas) com arranjo predominantemente linear, grande coágulo sanguíneo e conteúdo líquido sanguinolento no lúmen.



**Fig.2.** Coronavirose bovina em vacas. Traqueia e brônquios. Secreção catarral amarelada em moderada quantidade, observada na porção final da traqueia e no início dos brônquios.



**Fig.3.** Coronavirose bovina em vacas. Alça espiral do cólon ascendente. Imuno-histoquímica para coronavírus bovino. Intensa marcação no citoplasma de enterócitos de criptas (cabeça de seta). Notar cripta com revestimento cuboidal e pavimentoso (seta) e infiltrado mononuclear na lâmina própria. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector<sup>®</sup> NovaRED<sup>®</sup>. Barra = 50  $\mu$ m.



**Fig.4.** Coronavirose bovina em vacas. Corneto nasal. Imuno-histoquímica para coronavírus bovino. Intensa marcação no citoplasma do epitélio respiratório. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector<sup>®</sup> NovaRED<sup>®</sup>. Barra = 20  $\mu$ m.

Tabela 1 - Valores médios das variáveis hematológicas avaliadas em bovinos, durante um surto de coronavirose no sul do estado de Minas Gerais, Brasil.

<b>Variáveis</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5,9	1,7
Hematócrito (%)	26,7	8,6
Hemoglobina (g/dL)	10,1	3,1
Leucócitos totais ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	10,7	4,3
Neutrófilos (mL)	2601,6	913,0
Linfócitos (mL)	7181,6	241,5
Eosinófilos (mL)	611,7	568,4
Monócitos (mL)	288,3	474,0
Relação neutrófilo:linfócito (N/L)	0,41	0,20
Plaquetas ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ )	241,5	71,2

**ARTIGO 2**

(Este artigo será submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

**ENTEROPATÓGENOS ASSOCIADOS A CASOS FATAIS DE DIARREIA BOVINA NO SUL DE MINAS GERAIS: UM ESTUDO MORFOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E MOLECULAR**

**ABSTRACT.** – Lopes P.F.R., Orlando D.R., Paglis J.R., Costa R.C., Mesquita L.P., Costa G.M., Raymundo D.L., Varaschin, M.S. & Bezerra Junior P.S. 2013. [Enteropathogens associated with fatal bovine diarrhea in southern of Minas Gerais state, Brazil: A histopathological and immunohistochemical study.] Enteropatógenos associados a casos fatais de diarreia bovina no sul de Minas Gerais: Um estudo histopatológico e imuno-histoquímico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Cx. Postal 3037, Lavras, MG 37200-000, Brasil. E-mail: [bezerraj@dmv.ufla.br](mailto:bezerraj@dmv.ufla.br)

The present study describes the pathological, immunohistochemical (IHC) and molecular (nested RT-PCR) findings of the main enteropathogens isolated from spontaneous fatal cases of diarrhea in cattle in the southern region of Minas Gerais. Were evaluated 32 animals of different ages, necropsied in the field or had histological material referred to the laboratory. The histopathological lesions and the degree of autolysis was also described and graded by a intensity scale. The age of the animals ranged from 1 day to 48 months ( $11.9 \pm 17.8$  months), 43.75% (14/32) were female and 56.25% (18/32) were males. The acute to sub-acute necrotizing enteritis/colitis was the predominant morphologic diagnosis in diarrheic cattle (17/32). There was positive immunostaining for *Salmonella* spp. and BVDV in 9.4% (3/32) and 6.25% (2/32) of cases, respectively. Concomitant infection with BVDV and

*Salmonella* spp. was confirmed only in one case. The nested RT-PCR for BCoV resulted in four positive samples of intestinal content (4/9). Rotavirus and *Cryptosporidium* spp. were not associated with infection in any cases evaluated in this study, suggesting that these agents have less importance in the etiology of fatal diarrhea in this region. Conclude that histopathology, IHC and molecular techniques contributed to elucidate the pathogenesis of diarrhea in the described cases, being helpful in the decision making inside the herds.

INDEX TERMS: bovine viral diarrhea virus, coronavirus, paraffin embedded tissue, pathology, *Salmonella*.

**RESUMO.** – O presente trabalho foi realizado com o objetivo principal de descrever os achados patológicos, imuno-histoquímicos (IHQ) e moleculares (*nested* RT-PCR) dos principais enteropatógenos isolados em casos fatais de diarréia espontânea em bovinos, na região sul de Minas Gerais. Foram avaliados 32 bovinos de diferentes idades, necropsiados a campo ou que tiveram material encaminhado ao laboratório. As lesões histopatológicas e o grau de autólise foram descritos e graduados por meio de uma escala de intensidade. A idade dos animais variou entre 1 dia e 48 meses ( $11,9 \pm 17,8$  meses); 43,75% (14/32) dos animais eram fêmeas e 56,25% (18/32) eram machos. A enterite/colite necrotizante aguda a subaguda foi o diagnóstico morfológico predominante nos bovinos diarreicos (17/32). Houve imunomarcagem positiva para *Salmonella* spp. e BVDV em 9,4% (3/32) e 6,25% (2/32) dos casos, respectivamente. Infecção concomitante de BVDV e *Salmonella* spp. foi confirmada apenas no bovino 1. A *nested* RT-PCR para o BCoV resultou positiva em quatro amostras de conteúdo intestinal (4/9). O rotavírus e o *Cryptosporidium* spp. não estavam associados a nenhum dos casos avaliados neste trabalho, sugerindo que esses agentes tenham importância menor na

etiologia de diarreias fatais na região estudada. Conclui-se que o exame histopatológico, a IHQ e técnicas moleculares contribuíram para esclarecer a etiopatogenia da diarreia nos casos descritos, auxiliando nas tomadas de decisão dentro dos rebanhos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: coronavírus, patologia, *Salmonella*, tecido parafinado, vírus da diarreia viral bovina.

## INTRODUÇÃO

A diarreia constitui uma das mais importantes síndromes em animais domésticos e humanos e, em bovinos, mesmo nos dias atuais, é considerada uma importante causa de perda econômica para a pecuária mundial, permanecendo como um grande desafio nos sistemas de produção (Whitlock 1992, De La Fuente et al. 1998, Buzinaro et al. 2003, Smith 2012).

Diversas estimativas econômicas atestam a importância das doenças relacionadas à diarreia, no Brasil e no mundo. Nos Estados Unidos, estimativas de prejuízos relativos à diarreia indicam perdas de cerca de 95 milhões de dólares por ano. Em âmbito mundial, a estimativa é de em torno de 1,7 bilhão de dólares (Dar et al. 1998, Brandão et al. 2007c). Nos EUA, estima-se que de 8% a 25% de todos os bezerros nascidos morrem de doença entérica (Whitlock 1992). Um estudo em Minas Gerais indica que a estimativa da taxa de mortalidade geral em bovinos jovens é de 14%, sendo as afecções relacionadas à diarreia uma das importantes causas destas mortes (Ferreira et al. 2009). Entretanto, a etiologia da diarreia em bovinos é complexa e multifatorial, determinada por uma série de agentes infecciosos, como vírus, bactérias, protozoários e metazoários, além de sofrer influência de diversos fatores não infecciosos que predisõem o indivíduo à infecção e modulam a resposta do hospedeiro frente ao

patógeno (De Rycke et al. 1986, Hall et al. 1988, De La Fuente et al. 1998, Ferreira 2009, Bartels et al. 2010, Smith 2012).

Apesar da comprovada importância da detecção dos enteropatógenos nas fezes por meio de cultura e métodos ultraestruturais, imunológicos e moleculares, em vários estudos tem sido demonstrado que alguns animais podem eliminar esses agentes, mesmo sem manifestação clínica de diarreia (Radostits et al. 2000, Oliveira Filho et al. 2007). Dessa forma, a histopatologia e a imuno-histoquímica em casos de óbitos ocorridos em surtos de diarreia têm fornecido uma oportunidade de localização direta dos agentes, de seus fatores de virulência ou de suas toxinas em associação com as lesões teciduais, contribuindo para o diagnóstico e permitindo uma correlação inequívoca do agente com o quadro clínico-patológico (Parsons et al. 1984, Thorns et al. 1989, Pavarini et al., 2008, Hazlett et al. 2011, Blanchard 2012). Adicionalmente, estudos com este enfoque têm possibilitado a identificação de variações no tropismo tecidual por alguns enteropatógenos (Buonavoglia et al., 2006, Saif, 2010).

Exames baseados na morfologia das lesões e/ou dos agentes, embora menos sensíveis, permitem avaliar diferentes tipos de enfermidades e, por fornecer informações diversas, a histopatologia pode direcionar ou adicionar aos resultados de exames complementares, reduzindo custos com outros exames (Rosai 2007, Saif 2010). Além disso, em situações de dificuldade de remessa de material refrigerado, o envio de materiais fixados em formol pode ser uma opção conveniente (Parsons et al. 1984). No entanto, os achados histopatológicos podem ser inespecíficos ou prejudicados pela putrefação, particularmente no intestino delgado, no qual esta alteração *post mortem* se apresenta precocemente (Pearson & Logan 1978a, Ramos-Vara et al. 1999, Svara et al. 2003, Oliveira et al. 2009). A imuno-histoquímica tem contribuído para o diagnóstico patológico nestas situações (Oliveira et al., 2009).

Os objetivos principais do presente trabalho são descrever os achados patológicos, determinar a prevalência e diagnosticar, utilizando a imunohistoquímica e a *nested* RT-PCR, os principais enteropatógenos associados a casos fatais de diarreia espontânea em bovinos de diversas idades na região sul de Minas Gerais. O padrão de distribuição de antígenos dos enteropatógenos pesquisados em diversos órgãos dos bovinos com diarreia fatal também será apresentado, assim como o grau de interferência negativa da autólise intestinal no diagnóstico definitivo desta enfermidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização das amostras e avaliação histológica

O presente estudo foi realizado na microrregião de Lavras, situada na mesorregião do Campo das Vertentes, estado de Minas Gerais, Brasil. Foram avaliados 32 bovinos com sinais clínicos e achados macroscópicos sugestivos de diarreia infecciosa, selecionados a partir dos arquivos (estudo retrospectivo) e de necropsias realizadas a campo (estudo prospectivo), pelo Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de 2007 a 2012. Os dados do histórico e os sinais clínicos foram obtidos com o proprietário ou o responsável pelo animal.

Durante as necropsias, fragmentos de diversos órgãos foram coletados e processados rotineiramente para histopatologia, fixando-os em formol tamponado a 10%, por um período máximo de 48 horas.

A graduação das lesões encontradas foi obtida por meio de uma escala de intensidade: - (ausente); + (leve); ++ (moderada) e; +++ (acentuada), para os cortes histológicos avaliados, de acordo com os parâmetros descritos e

adaptados de Hall et al. (1988). O grau de autólise do material também foi avaliado para posterior confronto com os resultados obtidos.

### **Avaliação imuno-histoquímica**

Todos os animais que apresentaram lesões compatíveis com enterite/enterocolite e/ou depleção linfóide na avaliação histopatológica foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para a detecção dos antígenos de *Salmonella* spp. e de BVDV, em fragmentos intestinais emblocados em parafina, de acordo com as recomendações gerais descritas por Heryet & Gatter (1992).

O protocolo para detecção da *Salmonella* spp. foi adaptado do descrito por Watanabe et al. (2011), utilizando diluição de 1:10000 em PBS do anticorpo policlonal antissalmonella (8209-4006, AbD SeroTec®, Oxford, UK) e incubado, *overnight*, a 4°C. A imuno-histoquímica para BVDV foi realizada segundo protocolo descrito por Santos et al. (2011), incubando-se o anticorpo monoclonal anti-BVDV (D89, VRMD, Inc., Pullman, USA) na diluição de 1:50 em PBS, por 2 horas, à temperatura ambiente (37°C).

Em todos os testes foi utilizado, como controle positivo, um caso confirmado laboratorialmente pelo isolamento bacteriano ou PCR e, como controle negativo, foi realizada a incubação de tecidos suspeitos com PBS, omitindo-se os anticorpos primários.

### **Avaliação parasitológica**

Os estágios endógenos dos oocistos de *Eimeria* spp. foram pesquisados nos cortes histológicos de abomaso, intestinos delgado e grosso, corados rotineiramente pela HE. Para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium*

spp., nos casos suspeitos, foi empregada a técnica de Ziehl-Nielsen modificada (Luna 1968).

### **Investigação molecular de coronavírus e rotavírus**

Nove (28,12%) amostras de conteúdo entérico congelado foram enviadas para a realização de *nested* RT-PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), para pesquisa de partículas virais do coronavírus bovino e rotavírus, respectivamente. A *nested* RT-PCR foi utilizada para amplificar um fragmento de 136bp do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (RpRd) dos coronavírus do grupo II, segundo protocolo descrito por Brandão et al. (2005). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

Para detecção do rotavírus, as amostras foram submetidas à PAGE, de acordo com o protocolo adaptado de Herring et al. (1982). Procedeu-se à PAGE descontínuo, a 3,5%/7,5%, sob 20mA, por duas horas, corando-se o gel com nitrato de prata.

## **RESULTADOS**

Na Tabela 1 estão discriminados os dados epidemiológicos dos animais avaliados neste estudo, incluindo sexo, raça, idade e época do ano relacionada ao quadro de diarreia manifestado pelos indivíduos. O diagnóstico histopatológico principal das lesões observadas no intestino também foi descrito, bem como o provável agente etiológico (viral e/ou bacteriano) da diarreia, baseado no histórico e nos achados macroscópicos e microscópicos.

Durante o período de janeiro de 2007 a novembro de 2012, foram realizados 230 exames histopatológicos e 307 necropsias de bovinos no SPV da UFLA. Trinta e dois animais (6%) foram selecionados por apresentarem sinais

clínicos e achados patológicos sugestivos de diarreia infecciosa, dos quais 84,4% (27/32) correspondiam a exames de necropsia e os demais, a exames de histopatologia em materiais enviados em formol a 10%, por veterinários de campo. Na distribuição por sexo e raça, 43,75% (14/32) dos animais eram fêmeas e 56,25% (18/32) eram machos. A maioria dos animais pertencia à raça Holandesa (78,2%), seguida por Nelore (12,5%), Tabapuã (3,1%), Girolando (3,1%) e um mestiço (3,1%). A idade variou de 1 dia a 48 meses ( $11,9 \pm 17,8$  meses). A maioria dos casos teve predomínio de ocorrência durante a primavera (53,1%), enquanto os demais ocorreram no inverno (21,9%), no verão (15,6%) e no outono (9,4%).

A evolução clínica do quadro de diarreia na maioria dos animais variou entre 1 e 7 dias. Somente o bovino 3 apresentou um curso clínico de 25 dias, desde a observação dos primeiros sinais até o óbito. Durante a necropsia dos animais, o exame macroscópico revelou que as lesões mais evidentes estavam relacionadas ao trato gastrointestinal. O conteúdo intestinal dos animais variou de um conteúdo pastoso a líquido esverdeado (bovino 1), por vezes com presença de estrias de sangue (bovinos 2 e 30), amarelado (bovinos 11 ao 26) ou escuro/sangue vivo (Fig.1A) (bovinos 5, 9, 10, 31 e 32). Alterações macroscópicas observadas na mucosa intestinal de alguns animais, em maior ou menor grau, incluíram petéquias, ulcerações ao longo do intestino delgado e/ou grosso, evidenciação das placas de Peyer, espessamento, avermelhamento tanto na mucosa quanto na serosa, e material fibrinocrótico aderido à superfície da mucosa (Fig.1B). Observou-se que a coloração das mucosas externas variou de hipocoradas a congestas e todos apresentaram algum grau de desidratação, evidenciados pela enoftalmia. No bovino 28, ao abrir a carcaça, os órgãos abdominais estavam cobertos com uma pequena quantidade de exsudato fibrinoso, resultante de uma peritonite, sem haver, no entanto, algum ponto de

ruptura em vísceras (Fig.1C). Nos bovinos 2 e 4, um pequeno número de exemplares de *Eurytrema pancreaticum* foi visualizado no pâncreas.

As principais lesões microscópicas dos bovinos diarreicos estavam relacionadas ao trato gastrintestinal, sendo a enterite/colite necrotizante aguda a subaguda a mais prevalente, ocorrendo em 50% dos casos (16/32). Esse tipo de alteração era caracterizado por necrose predominantemente nas criptas intestinais, com dilatação, revestimento por células cuboidais ou pavimentosas e preenchimento por detritos necróticos (Fig.1D). Em alguns casos, estas lesões foram observadas concomitantemente ao encurtamento das vilosidades intestinais (bovinos 6, 16, 22, 23, 27 e 30) e hemorragia (bovinos 2, 30 e 32). Na enterite fibrinonecrótica (6,25%) ou necrossuprativa (3,125%), a lesão se caracterizava por focos de necrose que se estendiam até a lâmina própria e, por vezes, à submucosa, sendo associados à deposição de fibrina e/ou infiltração de neutrófilos. Em alguns destes casos, havia colônias bacterianas intralesionais (bovinos 1, 14, 22, 23, 27, 28 e 29). Enterite necro-hemorrágica aguda foi observada apenas no bovino 32. Nos bovinos 8 e 26 (2/32) não foram visualizadas alterações significativas, ao longo do trato gastrintestinal.

Adicionalmente às lesões do trato gastrintestinal, alguns bovinos (bovinos 1, 14, 17, 25, 27 e 29) apresentaram áreas de necrose de coagulação multifocal aleatória no fígado e/ou no baço, por vezes associadas a infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares. Outras lesões extraintestinais observadas com menor frequência foram broncopneumonia supurativa aguda leve (bovinos 7 e 27) a moderada (bovino22), ruminite necrossuprativa, difusa leve (bovino 12) e abomasite não supurativa, multifocal, leve (bovino 1).

Em relação às infecções parasitárias, em nenhum dos bovinos do presente estudo foi observada, na histopatologia, infecção de enterócitos por *Cryptosporidium* spp. em cortes de intestinos corados pela hematoxilina e eosina e Ziehl-Neelsen. Entretanto, no bovino 7 foi encontrado pequeno número de

estruturas compatíveis com *Eimeria* spp. em enterócitos do intestino delgado. Em 15,6% dos animais (bovinos 1, 2, 3, 4, 14) foram detectados raros nematódeos na mucosa e na submucosa do intestino delgado e/ou grosso, em meio a tecido necrótico.

As alterações *post mortem* estavam presentes em maior ou menor grau em 100% dos animais, conseqüente do período decorrido entre a morte do animal e a coleta e fixação dos tecidos. Um grau de autólise leve, moderado e acentuado foi visto em 56,25% (18/32), 15,625% (5/32) e 28,125% (9/32) dos bovinos, respectivamente. Somente dois bezerros (bovinos 16 e 22) foram submetidos à eutanásia, em função do agravamento do quadro clínico. Nestes, o grau de autólise foi leve. Em oito (25%) bovinos a autólise inviabilizou o diagnóstico histopatológico.

Marcação imuno-histoquímica positiva para a *Salmonella* spp. foi observada em 9,4% (3/32) dos casos, associada às áreas de necrose na superfície da mucosa do intestino delgado (Fig.1E), predominantemente no íleo, com intensidades acentuadas nos bovinos 1 e 14 e leve no bovino 29. Fragmentos de fígado dos bovinos 1, 14, 25, 27 e 29, que continham focos de necrose fibrinoide, também foram testados, para tentar correlacionar a presença da lesão com antígenos bacterianos. Entretanto, nenhuma marcação foi evidenciada dentro das áreas necróticas ou nos hepatócitos ao redor das lesões (Fig.1F).

No exame imuno-histoquímico para o vírus da diarreia viral bovina, houve marcação positiva em 6,25% (2/32) dos linfonodos (bovinos 1 e 3), principalmente em células mononucleares em folículos e zona do manto (Fig.1G). Nenhuma marcação foi visualizada na mucosa ou na submucosa do intestino e em fragmentos de orelha. No bovino 1 foram observadas, na macroscopia, áreas multifocais de ulcerações ao longo do abomaso e intestino delgado. Neste último, foram encontrados raros focos de necrose no centro germinativo dos folículos linfóides intestinais. Já no bovino 3 havia, além de

ulcerações focais na mucosa labial e esofágica, uma depleção folicular moderada a acentuada, associada a um infiltrado inflamatório linfo-histiocítico difuso moderado nos tecidos linfoides das tonsilas, linfonodos, placas de Peyer e nos aglomerados linfoides do intestino grosso (Fig.1H), em algumas áreas com projeção das criptas intestinais adjacentes para o interior do aglomerado (herniação das criptas).

O rastreamento por *nested* RT-PCR para o BCoV foi realizado em amostras de conteúdo intestinal de nove animais que morreram com quadro clínico de diarreia e que tinham lesões sugestivas de infecção viral (necrose de criptas intestinais). Esta pesquisa resultou positiva em quatro (44,4%) amostras, amplificando uma banda única correspondente ao fragmento de 136pb (Fig.2). O controle negativo, por sua vez, não formou nenhuma banda. As mesmas nove amostras também foram submetidas à PAGE, para a detecção do rotavírus e em nenhuma delas foi evidenciada a formação de banda específica para o vírus.

## DISCUSSÃO

A maioria dos óbitos encaminhados para necropsia e/ou histopatologia ocorreu entre o inverno e o verão (90,6%), em uma região onde o clima é considerado do tipo CWA, segundo a classificação de Koppen, com duas estações bem definidas durante o ano. A chuvosa, geralmente, começa em outubro e se estende até março, e a seca compreende os meses de abril a setembro (Antunes, 1986). Embora, neste trabalho, não tenha sido possível estabelecer uma relação entre a época de ocorrência dos episódios de diarreia e o tipo de agente etiológico envolvido (viral/bacteriano), sabe-se que, de modo geral, as diarreias infecciosas tendem a não seguir um caráter sazonal, por possuir uma ecologia complexa e multifatorial, mas sofrem influência de fatores climáticos, como variações drásticas de temperatura e de precipitação, favorecendo a manifestação de surtos em uma população susceptível,

principalmente as que possuem envolvimento bacteriano (De La Fuente et al. 1998, Chou et al. 2010, Smith 2012).

Conforme observado no Bovino 2, que veio a óbito após um surto de coronavirose na propriedade de origem, surtos de coronavirose em bovinos adultos podem ser esporadicamente observados em estações mais quentes (Fukutomi et al. 1999, Park et al. 2006, Decaro et al. 2008). Dos agentes etiológicos pesquisados, somente há uma associação temporal evidente nas disenterias de inverno causadas pelo coronavírus bovino nas épocas mais frias do ano (Brandão et al. 2002, Decaro et al. 2008, Bezerra Jr et al. 2009).

A desidratação e o conteúdo intestinal pastoso a líquido foram achados macroscópicos observados em todos os animais necropsiados e corroboram os sinais clínicos descritos na literatura (Whitlock 1992, Khan & Khan 1997). A intensidade pode variar com o tipo de lesão causada pelo enteropatógeno e os distúrbios sistêmicos que irão resultar, frequentemente, em grandes perdas de fluidos e eletrólitos, decorrentes de malabsorção e diarreia secretória, choque circulatório e conduzir à morte do animal (Argenzio 1992).

São escassos os estudos que avaliam a etiopatogenia da diarreia em animais que vieram a óbito em diferentes surtos e épocas, concomitantemente. Em outros trabalhos que avaliaram a prevalência de enteropatógenos em amostras fecais de bezerros vivos foram encontrados 47,4% de infecções mistas em bezerros diarreicos infectados pelo *Cryptosporidium* spp. (De La Fuente et al. 1999), 25,7% em bezerros naturalmente infectados (Bartels et al. 2010), 38% em bezerros diarreicos naturalmente infectados por dois ou mais patógenos e 6,7% em animais não diarreicos (Oliveira Filho et al. 2007). Na avaliação histológica, infecções mistas foram atribuídas a 21,9% dos animais avaliados, com lesões sugestivas tanto de infecção viral quanto bacteriana.

As alterações frequentemente associadas às infecções por coronavírus e rotavírus incluem necrose de criptas intestinais, com concomitante atrofia das

vilosidades. Já as que possuem envolvimento bacteriano incluem necrose das vilosidades e lesões decorrentes da septicemia provocada pela disseminação das bactérias no organismo. Infecção mista de BVDV-salmonella, confirmada pela imuno-histoquímica, foi observada apenas em um bovino adulto. Na diarreia viral bovina, o vírus pode contribuir com o quadro de diarreia por meio de uma imunossupressão inespecífica do sistema imune, favorecendo a entrada de outros patógenos (Blanchard 2012). Não é muito clara a importância dessas associações de patógenos no desenvolvimento da diarreia em bovinos, mas acredita-se que possa resultar em infecções mais graves e, até mesmo, a morte, quando comparadas à presença de apenas um agente (De La Fuente et al. 1999).

O diagnóstico morfológico de enterite/colite necrotizante foi realizado em 50% dos casos (16/32). Em dois bovinos (bovinos 2 e 13) com este padrão morfológico foi detectado material genético do BCoV. Entretanto, oito bovinos (bovinos 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23 e 24) do mesmo surto do bovino 13 apresentaram o mesmo padrão morfológico de lesão. Assim, como este padrão foi frequentemente relacionado ao BCoV, a identificação do mesmo pode ser importante para um diagnóstico provisório da enfermidade, em casos espontâneos da infecção por este vírus, pois lesões de criptas do intestino grosso, semelhantes às observadas nos bovinos supracitados, têm sido relacionadas também à infecção com outros patógenos bacterianos (particularmente *Escherichia coli* enteroaderente, EAEC e entero-hemorrágicas, EHEC-), virais (parvovírus bovino, BVDV) ou mesmo tóxicos (exposição a altas doses radiação ionizante) (Brown, Baker & Barker 2007). Esta correlação, embora característica, não é patognomônica e necessita de confirmação adicional. Consequentemente, além da PCR empregada neste e em outros estudos (Brandão et al. 2007a, Natsuaki 2007), a imuno-histoquímica também pode ser utilizada para esta confirmação, em casos em que há óbitos (Pavarini et al. 2009).

O envolvimento concomitante com outros patógenos, como os relacionados anteriormente, também deve ser considerado. Em relação à infecção por EAEC e EHEC, não foram observadas bactérias aderidas à superfície dos enterócitos nos casos apresentados, uma vez que o diagnóstico histopatológico desses tipos de infecção, que podem causar lesões em cripta do intestino grosso, é baseado no reconhecimento de grande número de bactérias no ápice de enterócitos nas vilosidades do intestino delgado e na superfície do intestino grosso (Brown, Baker & Barker 2007).

Embora, em alguns casos, a avaliação das vilosidades intestinais estivesse comprometida pela autólise, as criptas do intestino grosso não apresentavam alterações *postmortem* a ponto de comprometer esse tipo de avaliação, nos casos com este padrão morfológico de lesão. O diagnóstico diferencial com a infecção pelo BVDV nestes animais foi realizado por meio da IHQ, enquanto a exposição à radiação ionizante foi descartada pelo histórico e a infecção pelo parvovírus bovino foi improvável, uma vez que este é raramente diagnosticado como causa de morte e seu papel como patógeno entérico ainda não foi esclarecido (Brown, Baker & Barker 2007). Adicionalmente, as lesões em criptas do intestino grosso, quando presentes, são importantes para o diferencial com a infecção por rotavírus, que não é associada a lesões nesta estrutura nem a esse segmento intestinal (Brown, Baker & Barker 2007).

A restrição das lesões em criptas do intestino grosso, em alguns casos do presente estudo, deveu-se ao não envio do intestino delgado para exame (Bovino 8) ou autólise mais intensa no intestino delgado, que inviabilizou a avaliação deste segmento. Somente lançando mão do histórico é que foi possível sugerir o provável agente etiológico envolvido na morte dos bovinos 5 e 31 e, por meio de exames complementares, foi isolado o BCoV do bovino 9. Nos bovinos 11, 12, 17, 18 e 19, a etiologia provável não foi determinada, embora estivessem

envolvidos no mesmo surto que outros animais (bovinos 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23 e 24).

É conhecido que a autólise no intestino delgado se desenvolve mais precocemente que no intestino grosso, particularmente em animais com lesão intestinal, podendo ser notada já três minutos após a morte (Pearson & Logan, 1978a, Pearson & Logan 1978b). Tal fato gera uma dificuldade na avaliação de lesões degenerativo-necróticas de casos espontâneos de diarreia de bovinos, particularmente nas vilosidades, tornando difícil a diferenciação de lesões, como atrofia e desnudamento de vilosidades, causadas por diversos enteropatógenos (Brown, Baker & Barker 2007). Por outro lado, esta restrição das lesões de criptas no intestino grosso pode representar o óbito e a avaliação do intestino em uma fase mais tardia da infecção por coronavírus, quando a colonização viral do cólon se encontra ainda em fase ativa (Van Kruiningen et al. 1987). Tais fatos demonstram a necessidade da coleta de material com a maior brevidade possível, após a morte do animal.

Outro padrão morfológico importante no presente estudo foi o das enterites fibrinonecroticas ou necrossupurativas, observado em 6,25% e 3,13% dos casos, respectivamente. Estes casos foram correlacionados às infecções por bactérias, juntamente com outros nove animais com possíveis complicações bacterianas. Em três bovinos (bovinos 1, 14 e 29), antígenos de *Salmonella* spp. foram detectados, associados a áreas de necrose e acúmulos de fibrina na superfície da mucosa do intestino delgado. Estas lesões são compatíveis com as alterações descritas na literatura para a salmonelose intestinal (Mohler Izzo & House 2009). A salmonelose aguda se caracteriza por uma enterite catarral difusa, acompanhada de uma enterocolite fibrinonecrotica. Por vezes, também está presente uma colecistite fibrinosa, considerada patognomônica na infecção aguda em bezerros (Mohler Izzo & House 2009, Zachary & McGavin 2009). O animal 28 apresentava uma enterite fibrinonecrotica aguda moderada, com

presença de colônias bacterianas associadas às lesões, mas não houve marcação positiva para *Salmonella* spp. nestas áreas. Neste caso específico, outros agentes bacterianos devem ser considerados no diagnóstico diferencial.

Nódulos paratifoídes, caracterizados como necrose de coagulação multifocal, aleatória, com infiltrado inflamatório misto, no fígado e/ou no baço, foram observados em alguns bovinos deste estudo (bovinos 1, 14, 17, 25, 27 e 29). Entretanto, a avaliação IHQ não permitiu confirmar o envolvimento da *Salmonella* spp. nas lesões hepáticas e esplênicas, mesmo nos casos em que foram identificados antígenos deste agente nas lesões intestinais. Esses nódulos são frequentemente associados à salmonelose entérica aguda em bovinos (Brown, Baker & Barker 2007) e o mecanismo dessas lesões parece estar relacionado à circulação sistêmica e/ou à liberação de toxinas da *Salmonella* spp. no organismo (Stoycheva 2006). Além disso, deve-se considerar que muitas infecções bacterianas sistêmicas também podem produzir esse mesmo padrão morfológico no fígado (Kelly 1993).

O envolvimento da *E. coli*, concomitante nos casos mencionados acima ou isolados nos casos negativos para *Salmonella* spp., não pode ser totalmente desconsiderado, embora não fosse observada aderência de bactérias em enterócitos nas áreas de lesão ou adjacentes. O bovino 28 apresentou peritonite fibrinosa difusa e moderada, que também é considerado um indício de infecção bacteriana sistêmica, frequentemente relacionado à infecção subaguda por *E. coli* septicêmica (Brown, Baker & Barker 2007). Neste animal, foi isolada *E. coli* na cultura bacteriana (dados não apresentados).

A pesquisa de antígenos de *E. coli* através de IHQ nas lesões com estes padrões morfológicos poderiam contribuir nesta questão. Nos bovinos 8 e 26 não foram observadas alterações microscópicas significativas e, portanto, não foi possível estabelecer o diagnóstico definitivo. O envolvimento da *E. coli*

enterotoxigênica foi considerado, devido ao quadro de diarreia sem alterações na histopatologia (Brown, Baker & Barker 2007).

A avaliação IHQ permitiu confirmar o envolvimento do vírus da diarreia viral bovina em 6,25% (2/32) dos animais, por meio da detecção dos antígenos virais em linfonodos (bovinos 1 e 3). As principais lesões observadas nestes casos foram erosões em mucosas do trato digestivo superior e depleção linfoide. As lesões mais típicas de BVDV, incluindo úlceras orais e esofágicas, necrose do rúmen, do epitélio das criptas intestinais e linfócitos das placas de Peyer, são usualmente observadas em bovinos entre 4 e 14 meses de idade (Brown, Baker & Barker 2007, Blanchard 2012). Estas alterações são compatíveis com o que foi descrito para os bovinos 1 e 3, porém, a idade foi superior àquela descrita pela literatura.

Andrade et al. (2005) observaram, por meio de testes imunohistoquímicos em indivíduos infectados experimentalmente, que o BVDV tem forte tropismo pelo tecido epitelial do trato gastrointestinal, pele, glândulas e por células do sistema fagocítico-mononuclear circulante ou em tecidos linfoides. Esta distribuição dos antígenos também foi relatada por Liebler-Tenorio (2005). Nos bovinos 1 e 3, houve marcação somente nas células mononucleares dos linfonodos. A marcação negativa em orelha e na mucosa do trato gastrointestinal pode estar associada a uma reduzida concentração de antígenos nos tecidos avaliados.

A criptosporidiose não demonstrou ser um problema evidente como etiologia das mortes por diarreia no presente estudo. Até o primeiro mês de idade, o rotavírus e o *Cryptosporidium* spp. são considerados a maior causa de diarreia em bovinos, muitas das vezes com eliminação dos dois agentes ao mesmo tempo (De Rycke et al. 1986, De La Fuente et al. 1998, Blanchard 2012). No presente estudo, o rotavírus não foi detectado em nenhum dos nove animais testados na eletroforese, incluindo sete amostras de bovinos com menos

de 30 dias de vida. A explicação desse resultado negativo nas amostras dos animais pode estar relacionada à virulência do agente. Apesar de causar atrofia das vilosidades de maneira semelhante ao coronavírus, o rotavírus causa uma diarreia menos grave que na infecção por outros agentes (Blanchard 2012). Dessa forma, a letalidade da rotavirose é baixa, raramente levando o animal ao óbito. O mesmo raciocínio pode ser construído para o *Cryptosporidium* spp., já que cursa com infecções geralmente autolimitantes, associadas a outros patógenos, sendo pouco encontrado em casos fatais de diarreia.

As principais espécies de *Eimeria* relacionadas à diarreia em bovinos, principalmente entre 3 e 6 meses de idade, são a *E. bovis* e *E. zuernii*. Entretanto, mais de 95% das infecções são subclínicas e, quando é causa substancial de diarreia, as lesões são evidentes no intestino grosso (Brown Baker & Barker 2007, Blanchard 2012). Um pequeno número de exemplares de *Eimeria* spp. foi detectado nas células das criptas do cólon no bovino 7, muito embora a diferenciação entre as espécies não pudesse ser realizada. Neste caso, em função do baixo número de coccídeos, a diarreia não foi atribuída exclusivamente à presença de *Eimeria* e uma associação viral foi considerada pela presença de outras lesões concomitantes. A observação de um baixo número de nematódeos em 15,6% (5/32) dos bovinos pode ter contribuído para o agravamento do quadro, mas não pode ser atribuído a eles o fator determinante da diarreia, uma vez que indícios do envolvimento de agentes virais e bacterianos foram observados nos bovinos 1 (salmonella/BVDV), 2 (BCoV), 3 (BVDV) e 14 (BCoV), e estes são justificados pelas lesões encontradas nesses animais.

No presente estudo, a ferramenta molecular de *nested*RT-PCR foi empregada para uma rápida detecção do BCoV. O alvo foi o gene RdRp, que é altamente conservado no grupo II dos coronavírus, resultando na amplificação de um fragmento de 136 pb e na confirmação da presença do vírus nas amostras

suspeitas, em concordância com estudos prévios (Brandão et al. 2005, Brandão et al., 2007, Bezerra Jr et al. 2009). Destas amostras, três estavam relacionadas à disenteria de inverno, tendo uma delas ocorrido em estação quente, e um caso de coronavirose neonatal. Os aspectos clínicos e patológicos observados nos três animais com disenteria são típicos da afecção, corroborando os achados descritos no Brasil (Pavarini et al 2008) e em diversas partes do mundo (Fukutomi et al. 1999, Decaro et al. 2008).

A PCR foi uma técnica importante para elucidar o diagnóstico, quando a avaliação histológica das lesões não foi possível em função da autólise acentuada nos bovinos 9 e 10. Ela também pode ser aplicada na detecção do BCoV em amostras provenientes de animais vivos, com infecção clínica ou subclínica, auxiliando na compreensão da dinâmica e da epidemiologia da doença.

Os resultados deste trabalho ressaltam que a diarreia deve ser tratada como uma síndrome de etiologia complexa e é uma importante causa de óbito em bovinos de diferentes idades, no sul de Minas Gerais. A *nested*RT-PCR pode ser útil no diagnóstico do coronavírus bovino, tanto em bezerros quanto em adultos. A necropsia e a histopatologia em tecidos bem preservados, associadas à imuno-histoquímica, podem ajudar a determinar o papel desses enteropatógenos no desenvolvimento da diarreia, auxiliando nas tomadas de decisão e na prevenção da doença nos rebanhos.

## REFERÊNCIAS

- Andrade G. I., Serra C. V., Barbosa-Stancioli E. F., Serakides R. & Lobato Z. I. P. 2005. Padronização da técnica imunoistoquímica para o diagnóstico etiológico de rotina da diarreia bovina a vírus. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 57:710-714.
- Antunes F. Caracterização climática do Estado de Minas Gerais. 1986. *InfAgro*. 12:9-13.
- Argenzio R.A. Pathophysiology of Diarrhea. In: Anderson, N.V. 1992. *Veterinary Gastroenterology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 163-172.
- Bartels C. J. M., Holzhauer M., Jorritsma R., Swart W.A.J.M. & Lam T.J.G.M. 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of Young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med*. 93:162-169.
- Bezerra Jr P.S., Brandão P.E., Pavarini S.P., Varaschin M.S., Wouters F., Villarreal L.Y.B., Jerez J.A. & Costa G.M. 2009. Surto de diarreia em vacas de um rebanho leiteiro na região sul de Minas Gerais: detecção de coronavírus bovino nas fezes. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 61:992-995.
- Blanchard P.C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. 2012. *Vet Clin Food Anim*. 28:443-464.
- Brandão P.E., Gregori F., Villarreal L.Y.B., Rosales C.A.R., Soares R.M. & Jerez J.A. 2005. A nested polymerase chain reaction to bovine coronavirus diagnosis. *Virus Rev Res*. 10:45-49.
- Brandão P.E., Gregori F., Sforsin A.J., Villarreal L.Y.B. & Jerez J.A. 2007a. Winter dysentery in cows associated with Bovine Coronavirus (BCoV). *Arq Bras Med Vet Zoo*. 59:1074-1076.
- Brandão P.E., Villarreal L.Y.B., Gregori F., Souza S.L.P., Lopes M.A.E., Gomes C.R., Sforsin A.J., Sanches A.A., Rosales C.A.R., Richtzenhain L.J., Ferreira A.J.P. & Jerez J.A. 2007b. On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. *Pesq Vet Bras*. 27:398-402.

Brown C.C., Baker D.C., Barker I.K. Alimentary System. In: Maxie M.G. 2007. *Pathology of Domestic Animals – Jubb, Kennedy & Palmer's – Volume 2*. Saunders. 5 Ed, p. 1-296.

Buzinaro M.G., Mistieri M.L.A., Carvalho A.A.B., Samara S.I.; Regitano L.C.A. & Jerez J.A. 2003. Prevalence of group A rotavirus in diarrheic calves of beef calves in semi-intensive production system. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 55: 266-270.

Caldow G.L. & Munro R. 1995. Necrotising enteritis in suckled calves. *Veterinary Record*. 137:307-311.

Chou W.C., Wu, J.L. Wang Y.C., Huang H., Sung F.C. & Chuang C.Y. 2010. Modeling the impact of climate variability on diarrhea-associated diseases in Taiwan (1996-2007). *Sci Tot Env*. 409:43-51.

Dar A.M., Kapil S., Goyal S.M. 1998. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. *J Vet Diagn Inv*. 10:152-157.

De La Fuente R., García A., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Luzón M., Cid D., García S., Orden J.A. & Gómez-Bautista M. 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med*. 36:145-152.

De Rycke J., Bernard S., Laporte J., Naciri M., Popoff M.R. & Rodolakis, A. 1986. Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. *Ann Rech Vét*. 17:159-168.

Decaro N., Mari V., Desario C., Campolo M., Elia G., Martella V., Greco G., Cirone F., Colaianni M.L., Cordioli P. & Buonavoglia C. 2008. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet Microbiol*. 126:30-39.

Ferreira M.G. *Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi-intensivas de duas bacias leiteiras do Estado de Minas Gerais*. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Frois M.C.M., Modena C.M. & Viegas D.M. 1999. Tendência histórica dos coeficientes de mortalidade de bezerros em Minas Gerais, 1960 a 1985. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 46:741-747.

Fukutomi T., Tsunemitsu H. & Akashi H. 1999. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch Virol.* 144:997-1006.

Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Orden JA, Cid D, Sanz R, Gomes-Bautista M, Fuente R (2000) Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23:175–183.

Hall G.A.1988. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. *ResVet Sci.* 45:240-250.

Herring A. J., Inglis N.F., Ojeh C.K., Snodgrass D.R., Menzies J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol.* 16:473-477.

Heryet A.R.& Gatter K.C. 1992. Immunohistochemistry for light microscopy. In: Herrington C.S., McGee J.O'D. *Diagnostic Molecular Pathology: A practical approach.* New York: IRL, p. 7-46.

Kelly W.R. The gastrointestinal system. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C.&Palmer C. (Ed.). 4. ed. *Pathologyof domestic animals.* San Diego: Academic Press, 1993.v.2, p.319-406.

Khan A. & Khan M.Z. Gross and histopathological findings in buffalo and bovine diarrhoeic neonates. *Veterinarski Arhiv.* 67:203-213.

Landsverk T. Pathomorphology of the intestinal mucosa in diarrheic calves. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 22:435.

Liebler-Tenorio E.M. Pathogenesis. In: Goyal S.M.; Ridpath J. F. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control.* Iowa: Blackwell Publishing, 2005, 1 Ed, p.121-143.

Luna L.G. *Afip histologic staining methods.* New York: McGraw-Hill American Registry of Pathology, 1968. 258p.

Mohler V.L. & Izzo M.M. 2009. *Salmonella* in Calves. Vet Clin North Am: Food Anim Pract. 25:37-54.

Morris W.E., Venzano A.J., Elizondo A., Vilte D.A., Mercado E.C. & Fernandez-Miyakawa M.E. 2011. Necrotic Enteritis in Young Calves. J Vet Diagn Invest. 23:254-259.

Hazlett M.J., Kircanski J., Slavic D. & Prescott J.F. 2011. Beta 2 Toxigenic *Clostridium Perfringens* Type A Colitis in a Three-Day-Old Foal. J Vet Diagn Invest. 23: 373.

Natsuaki S., Goto K., Nakamura K., Yamada M., Ueo H., Komori T., Shirakawa H. & Uchinuno Y. 2007. Fatal winter dysentery with severe anemia in an adult cow. J Vet Med Sci. 69:957-960.

Oliveira Filho J.P., Silva D.P.G., Pacheco M.D., Mascarini L.M., Ribeiro M.G., Alfieri A.A., Alfieri A.F., Stipp D.T., Barros B.J.P. & Borges A.S. 2007. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. Pesq Vet Bras. 27:419-424.

Park, S.J., Jeong C., Yoon S. S., Choy H. E., Saif L. J., Park S. H., Kim Y. J., Jeong J. H., Park S. I., Kim H. H., Lee B. J., Cho H. S., Kim S. K., Kang M. I. & Cho, K. O. 2006. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. J Clin Microbiol. 44:3178-3188.

Parsons K.R., Wilson A.M., Hall G.A., Bridger J.C., Chanter N. & Reynolds D.J. 1984. Localization of enteropathogens in paraffin embedded tissue by immunoperoxidase. J Clin Pathol. 37:645-650.

Pavarini S.P., Bezerra Jr P.S., Santos A.S., Pescador C.A., Brandão P.E., Souza S.P. & Driemeier D. 2008. Clinic pathological features during a winter dysentery outbreak in cattle in Rio Grande do Sul. Pesq Vet Bras. 28:611-616.

Pearson G.R. & Logan E. F. 1978a. The rate of development of postmortem artifact in the small intestine of neonatal calves. Br. J. exp. Path. 59, 1 78.

Pearson G.R., McNulty M.S. & Logan E. F. 1978b. Pathological changes in the small intestine of neonatal calves with enteric colibacillosis. Vet Pathol Br. J. exp. Path. 59:71-78.

Pesquisa Pecuária Municipal (PPM). Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acessado em 11 mar 2012.

Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9 ed. W.B. Saunders, London. 1877p.

Ramos-Vara J.A., Segales J., Duran C.O. 1999. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. J Swine Health Prod. 7:85-91.

Rosai, J. 2007. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. Lab Inv. 87:403-408.

Saif L.J. 1990. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? Cornell Vet. 80:303-311.

Santos A.S., Antoniassi N.A.B., Boabaid F.M., Bitencourt A.P.G., Almeida L.L., Canal C.W., Flores E.F. & Driemeier D. 2011. Aspectos clínicos, patológicos, imuno-histoquímicos e virológicos em cinco bezerros persistentemente infectados com o vírus da diarreia viral bovina em uma propriedade do Rio Grande do Sul. Pesq Vet Bras. 31:885-892.

Smith D.R. 2012. Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea. Vet Clin Food Anim. 28:465-481.

Stoycheva, M. 2006. Liver disturbances in patients with salmonellosis. Trakia J Sci. 4:23-27.

Svara T., Juntos P., Pogacnik M., Gombac M. & Hostnik P. 2003. Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of dogs with canine parvovirus. Slov. Vet. Res. 40:81-90.

Thorns C.J., Wells G.A.H., Morris J.A., Bridges A. & Higgins R. 1989. Evaluation of Monoclonal Antibodies to K88, K99, F41 and 987P Fimbrial Adhesins for the Detection of Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Paraffin-Wax Tissue Sections. Vet Microbiol. 20:377-381.

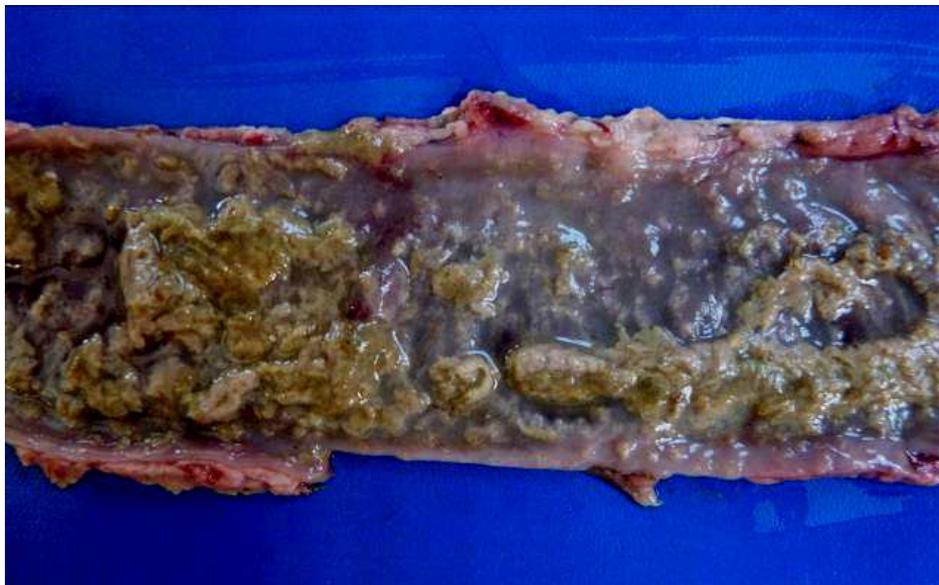
Van Kruiningen H.J., Khairallah L.H., Saseville V.G., Wyand M.S. & Post J.E. 1987. Calfhood coronavirus enterocolitis: A clue to the etiology of winter dysentery. Vet Pathol. 24:564-567.

Whitlock R.H. Diarrhea in Cattle. In: Anderson N.V. *Veterinary Gastroenterology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 755-802.

Zachary J.F. & McGavin M.D. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5<sup>th</sup> Ed. St. Louis: Mosby, 2009, 1344p.



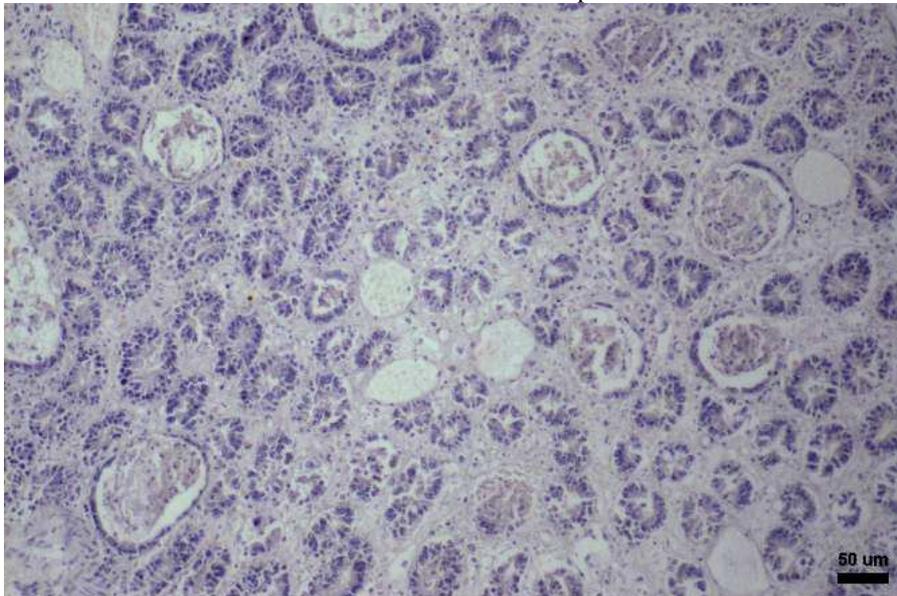
**Fig.1.** Bovino 10. Coronavirose. Alça espiral do cólon ascendente apresentando grande quantidade de conteúdo sanguinolento no lúmen.



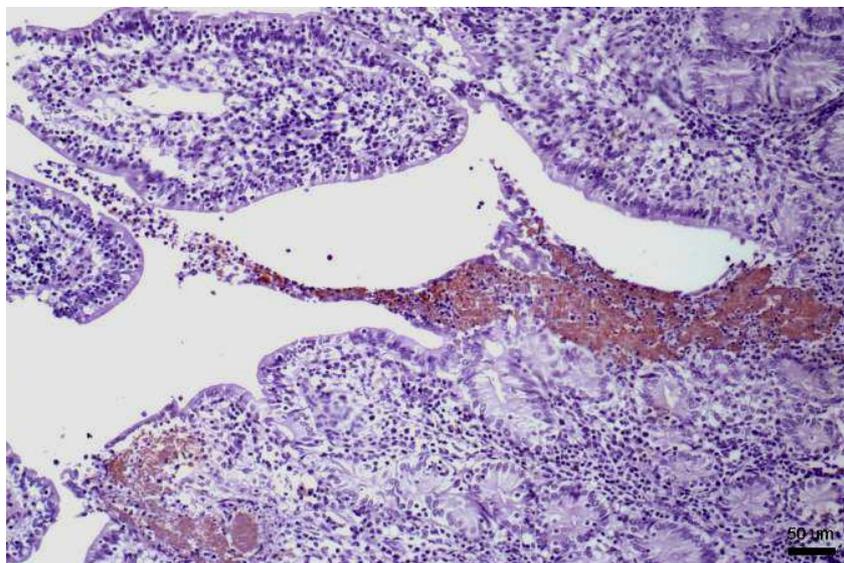
**Fig.2.** Bovino 30. Mucosa do íleo com áreas de ulceração coalescentes recobertas por material friável amarelo-acinzentado.



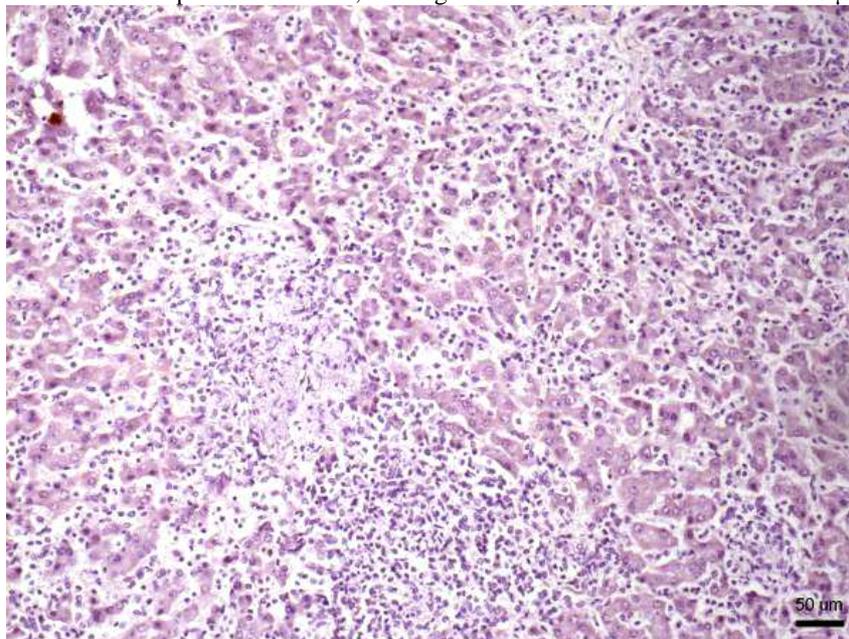
**Fig.3.** Bovino 28. Intestino delgado apresentando distensão gasosa, serosa avermelhada e exsudato fibrinoso aderido à superfície.



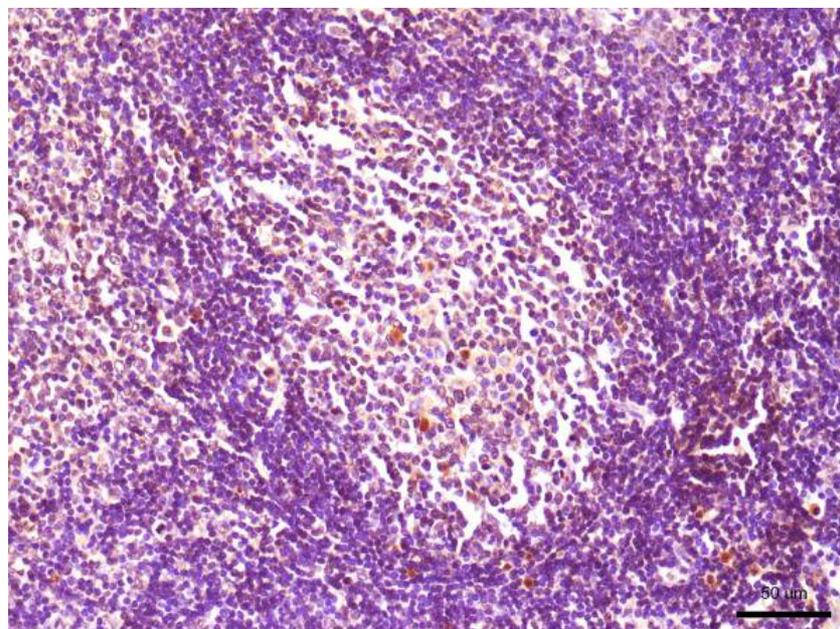
**Fig.4.** Bovino 22. Intestino grosso com moderado número de criptas dilatadas, revestidas por células cuboidais ou pavimentosas e preenchidas por debris necróticos. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .



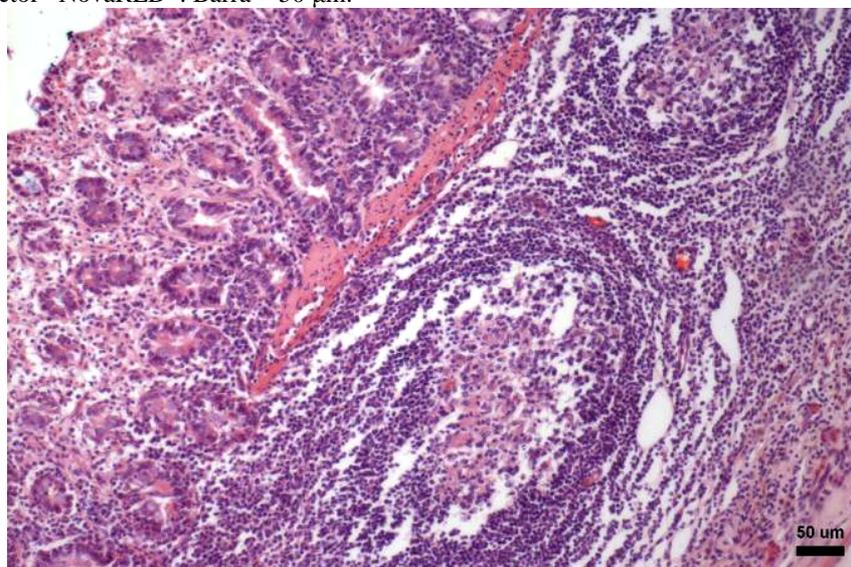
**Fig.5.** Bovino 1. Marcação positiva de *Salmonella* spp. na superfície da mucosa do cólon. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector<sup>®</sup> NovaRED<sup>®</sup>. Barra = 50 μm.



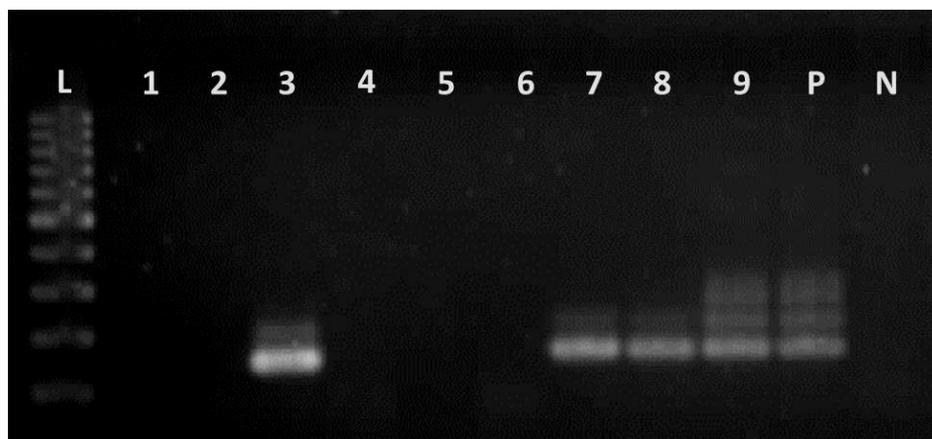
**Fig.6.** Bovino 27. Fígado com áreas multifocais de necrose com infiltrado inflamatório misto com células mononucleares e polimorfonucleares. Ausência de marcação imunohistoquímica para *Salmonella* spp. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector<sup>®</sup> NovaRED<sup>®</sup>. Barra = 50 μm.



**Fig.7.** Bovino 1. Marcação positiva do vírus da diarreia viral bovina em células mononucleares no linfonodo mesentérico. Método estreptavidina-biotina, cromógeno Vector® NovaRED®. Barra = 50 µm.



**Fig.8.** Bovino 3. Cólon apresentando acentuada depleção linfoide folicular associada a infiltrado histiocitário nos aglomerados linfóides da submucosa. Barra = 50 µm.



**Fig.9.** Eletroforese do gel de agarose da *nested* RT-PCR para detecção do coronavírus bovino (BCoV). O fragmento amplificado corresponde a 136pb. L = DNA ladder de 100pb; 1-9 = amostras de conteúdo intestinal dos bovinos 2, 3, 8, 9, 10, 13, 14, 22 e 27; P = controle positivo; N = controle negativo (água ultrapura tratada DEPC).

Tabela 1. Sumário do diagnóstico histopatológico, provável etiologia e grau de autólise observada no intestino delgado e cólon de 32 casos fatais de diarreia bovina na região sul de Minas Gerais, Brasil.

Animal Nº.	Dados epidemiológicos			Histopatologia		
	Sexo	Idade (meses)	Raça	Diagnóstico morfológico	Etiologia provável	Autólise
1	F	30	NEL	Enterite necrotizante aguda <sup>a</sup> (++)	(BVDV)/Bacteriana‡ ∅	+
2	F	36	GIR	Colite necrotizante subaguda (++)	Viral (BcoV)†	++
3	F	42	MES	Depleção linfóide moderada em tecidos linfóides <sup>b</sup>	Viral (BVDV)∅	++
4	M	23	NEL	Depleção linfóide acentuada em tecidos linfóides	Viral (BVDV)	+
5	F	48	HPB	Colite necrotizante aguda (++)	Viral (BCoV) <sup>c</sup>	+++
6	F	13 dias	HPB	Enterocolite necrotizante subaguda (+)	Viral (BCoV)	+
7	M	6	NEL	Colite necrotizante subaguda (+)	Viral (BCoV)	+
8	F	2	HPB	Sem alterações significativas	Não determinada	++
9	F	48	HPB	Inconclusivo	Não determinada†	+++
10	M	24	TAB	Inconclusivo	Não determinada†	+++
11	M	1	HPB	Inconclusivo	Não determinada	+++
12	M	1	HPB	Inconclusivo	Não determinada	+++
13	M	1	HPB	Enterocolite necrotizante aguda (+)	Viral (BCoV)/Bacteriana†	+
14	M	1	HPB	Enterocolite necrotizante aguda <sup>a</sup> (++)	Viral (BCoV)/Bacteriana‡	++
15	M	1	HPB	Colite necrotizante subaguda (++)	Viral (BCoV)	+
16	M	1	HPB	Colite necrotizante subaguda (++)	Viral (BCoV)	+
17	M	1	HPB	Inconclusivo <sup>a</sup>	Não determinada	+++
18	M	1	HPB	Inconclusivo	Não determinada	+++
19	M	1	HPB	Inconclusivo	Não determinada	+++
20	M	1	HPB	Colite necrotizante aguda (+)	Viral (BCoV)	+
21	M	1	HPB	Colite necrotizante aguda (++)	Viral (BCoV)	+
22	M	1	HPB	Enterite necrotizante aguda (++)	Viral (BCoV)/Bacteriana	+
23	M	1	HPB	Enterite necrotizante aguda (+)	Viral (BCoV)/Bacteriana	+
24	M	1	HPB	Enterocolite necrotizante aguda (++)	Viral (BCoV)	+
25	F	1	HPB	Colite necrotizante aguda <sup>a,d</sup> (+)	Viral (BCoV)/Bacteriana	++
26	F	5 dias	HPB	Sem alterações significativas	Bacteriana	+
27	F	20 dias	HPB	Enterocolite necrossuprativa aguda <sup>a</sup> (++)	Bacteriana	+
28	F	3	HPB	Enterite fibrinocrótica aguda (++)	Bacteriana	+
29	F	2	HPB	Enterite fibrinocrótica aguda <sup>a</sup> (+++)	Bacteriana‡	+
30	F	48	HPB	Enterocolite necrotizante aguda (++)	Viral (BCoV)	+
31	M	6	NEL	Inconclusivo	Viral (BcoV) <sup>c</sup>	+++

---

32	F	48	HPB	Enterite necro-hemorrágica aguda	Bacteriana	+
----	---	----	-----	----------------------------------	------------	---

---

F = fêmea; M = macho; HPB = Holandês preto e branco; NEL = Nelore; TAB = Tabapuã; GIR = Girolando; MES = mestiço; BVDV = vírus da diarreia viral bovina; BCoV = coronavírus bovino; + leve; ++ moderado;

+++ acentuado.‡ IHQ positiva para *Salmonella* spp.; § IHQ positiva para BVDV; † PCR positiva para BCoV.

<sup>a</sup> Focos de necrose aleatórios no fígado e/ou baço. <sup>b</sup> Adicionalmente necrose e ulceração em mucosa esofágica e labial. <sup>c</sup> Com base nos sinais clínicos e/ou nos achados macroscópicos. <sup>d</sup> Intestino delgado não enviado para exame.