

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA DE SALMONELOSE EM BOVINOS

Thainã Piccolo Vargas

PORTO ALEGRE

2016/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA DE SALMONELOSE EM BOVINOS

Autor: Thainã Piccolo Vargas

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

**Orientador: Saulo Petinatti Pavarini
Coorientador: Matheus Viezzer Bianchi**

PORTO ALEGRE

2016/1

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me mostrar que nunca devo perder a fé. Que a vida é um ciclo constante de renovação e que as perdas não significam o final de tudo mas sim, o início de uma nova etapa.

Ao meu pai pelos momentos de alegria, compreensão, companheirismo, amizade e pelo exemplo de caráter e otimismo, que mesmo em momentos difíceis, se fez presente me ensinando que vale a pena seguir em frente.

À minha mãe pela paciência, pelas esperas, pela compreensão, pelo cuidado, pelo amor incondicional e pelo exemplo de força, trabalho e dedicação.

À minha irmã, agradeço pelo carinho e amizade, pelas intermináveis ligações a qualquer hora do dia, por escutar minhas histórias, minhas angústias e alegrias, tornando assim a distância que nos separa bem menor.

Aos meus tios Aura e Antônio pelos ensinamentos, pelas conversas, pelo companheirismo e por me ensinarem que a amizade e o amor vão além de laços familiares.

A toda minha família que de uma forma ou de outra estiveram presentes durante essa caminhada.

Aos professores do SPV-UFRGS, David, Luciana e Saulo, pela oportunidade e aprendizado proporcionado durante o período de estágio no laboratório.

Aos colegas e amigos pelos momentos de companheirismo, aprendizado e alegrias compartilhados.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
(Filipenses 4:13)

RESUMO

A salmonelose é uma doença entérica a septicêmica, causada por bactérias do gênero *Salmonella*. É descrita em bovinos jovens e outras espécies na forma de surtos com alta mortalidade. O desenvolvimento da doença depende do estado imunológico do hospedeiro, da virulência, do sorotipo e de fatores estressantes (manejo, condição nutricional e outras doenças intercorrentes). Realizou-se um estudo retrospectivo no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2015 através da análise dos registros de necropsias do SPV-UFRGS, agrupando casos diagnosticados como salmonelose em bovinos. Os bovinos afetados, lesões macroscópicas e informações referentes a isolamentos e tipificação do agente foram caracterizados de acordo as descrições prévias que constavam nos laudos de necropsia. No período, foram realizadas 923 necropsias em bovinos, entre as quais oito casos (0.87%) foram diagnosticados como salmonelose. A média da idade dos bovinos afetados foi de 5.3 meses (15 dias a 2.5 anos), sendo cinco fêmeas e três machos, das raças Holandesa (4), Angus (2), Hereford (1) e SRD (1), com histórico de emagrecimento, diarreia e febre. Na necropsia, o intestino delgado apresentava espessamento da parede com deposição de fibrina no lúmen (7/8 casos), intestino grosso com conteúdo fibrinonecrótico aderido à mucosa (4/8), linfonodos mesentéricos aumentados de volume (6/8), a vesícula biliar estava repleta, distendida, com conteúdo grumoso contendo fibrina e mucosa com áreas ulceradas (5/8 casos), e o fígado estava aumentado e alaranjado (5/8). Na histopatologia, observou-se em intestino delgado necrose acentuada da mucosa (5/8), com moderado a acentuado infiltrado inflamatório de neutrófilos degenerados (6/8). Recobrimo essas áreas, havia acentuada deposição de fibrina (5/8) entremeada por múltiplas miríades bacterianas cocobacilares basofílicas (7/8), e em submucosa, havia leve a moderada vasculite e trombose (5/8). O fígado apresentava áreas multifocais de necrose com deposição de fibrina e infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos (nódulos paratifoideis; 4/8). Os linfonodos mesentéricos e o baço exibiam áreas multifocais de necrose (6/8; 3/8). *Salmonella* spp. foi isolada em três casos com tipificação para *S. typhimurium* (2) e *S. panama* (1). A IHQ demonstrou acentuada marcação em mucosa e submucosa de intestino delgado (5/8), leve a moderada em fígado (4/8), linfonodos mesentéricos (2/8) e baço (1/8). A salmonelose em bovinos afeta animais jovens, com lesões predominantes em intestino delgado e ocasionalmente septicemia. A IHQ mostrou-se ser uma ferramenta útil para realizar o diagnóstico de salmonelose quando o isolamento do agente não é mais possível.

Palavras-chave: bovinos, doenças de bovinos, enterites, *Salmonella*.

ABSTRACT

Salmonellosis is an enteric to septicemic disease caused by *Salmonella* spp.. It is described affecting young cattle and other species mainly in outbreaks with high mortality rates. The disease occurrence depends of the immunological condition of the host, the serotype virulence and some stressful factors (management, nutritional condition and other concomitant diseases). A retrospective study was performed from the period of January 2005 to December 2015 by searching the necropsy database of SPV-UFRGS aiming cases of salmonellosis diagnosed in cattle. The affected cattle, gross lesions, and information related to the isolation and typification of the agent were characterized according to previous necropsy descriptions. During this period, 923 necropsies were performed in cattle, from which eight cases (0.87%) were diagnosed as salmonellosis. The average age of the affected animals was 5.3 months (15 days to 2.5 years), being five female and three male, breeds were Holstein Friesian (4), Angus (2), Hereford (1) and mixed-breed (1), with clinical history of weight loss, diarrhea and fever. In necropsy, small intestine showed thickened wall with luminal fibrin casts (7/8 cases), large intestine with fibrinous content adhered to the mucosa (4/8), enlargement of the mesenteric lymph nodes (6/8), the gall bladder was replete, distended, with flocculent content containing fibrin and the mucosa was ulcerated (5/8), and the liver was enlarged and with orange color (5/8). At histopathology there weremarked small intestine mucosal necrosis (5/8), with moderate to marked inflammatory infiltrate of degenerated neutrophils (6/8). There was also a marked fibrin deposition overlaying the mucosa (5/8) with multiple basophilic bacterial myriads coccobacilli associated (7/8), and in the submucosa there were mild to moderate vasculitis and thrombosis (5/8). The liver showed multifocal necrotic areas with fibrin deposition and inflammatory infiltrate of macrophages and neutrophils (paratyphoid nodes; 4/8). The mesenteric lymph nodes and the spleen showed multifocal necrotic (6/8; 3/8). *Salmonella* spp. was isolated in four cases, with typification in three cases: *S. typhimurium* (2) and *S. panama* (1). The immunohistochemical examination showed severe immunomarking in mucosa and submucosa of the small intestine (5/8), mild to moderate in liver (4/8), mesenteric lymph nodes (2/8) and spleen (1/8). Salmonellosis in cattle affected mainly calves. The immunohistochemical examination demonstrated to be a useful tool to diagnose salmonellosis when the agent isolation is no longer possible.

Key words: cattle, cattle's disease, enteritis, Salmonella.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Achados macroscópicos em intestino delgado e linfonodos mesentéricos..... | 18 |
| Figura 2 –Achados macroscópicos em fígado e vesícula biliar. | 19 |
| Figura 3 –Alterações microscópicas em intestino delgado, fígado, baço e imuno-histoquímica | 20 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Caracterização dos bovinos afetados por salmonelose de acordo com sexo, idade e raça | 16 |
| Tabela 2 – Caracterização dos bovinos afetados por salmonelose de acordo com sinais clínicos, curso da doença, forma de apresentação e fator predisponente | 16 |
| Tabela 3 – Distribuição das lesões macroscópicas de acordo com o órgão afetado em oito bovinos afetados por salmonelose | 17 |
| Tabela 4 – Caracterização microscópica e imuno-histoquímica das lesões em oito bovinos afetados por salmonelose..... | 17 |

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2.MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 2.1 Seleção das amostras | 12 |
| 2.2 Classificação das amostras..... | 13 |
| 3 RESULTADOS | 14 |
| 4 DISCUSSÃO | 20 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 25 |
| REFERÊNCIAS | 25 |

1 INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma doença distribuída mundialmente com grande importância econômica na produção animal, principalmente, quando há ocorrência de surtos. Apresenta morbidade que varia de 50-75% e mortalidade de 5-10%. Surtos são descritos esporadicamente no Brasil, de forma que a enfermidade pode ser subdiagnosticada e/ou sub-relatada, tornando-se importante estudar a sua ocorrência e caracterizá-la patologicamente (BARROS, 2007). É uma doença bacteriana que afeta todas as espécies animais com maior frequência em bovinos, equinos e suínos. Os animais infectados servem de reservatório para a infecção em humanos, sendo uma enfermidade zoonótica (BARROS, 2007; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016).

Bezerros com faixa etária entre duas a doze semanas são mais frequentemente afetados, todavia bovinos adultos também podem desenvolver doença clínica. Essa pode se apresentar com diarreia, aborto e perda de peso, os quais são sinais clínicos comuns de enfermidades que afetam bovinos (TUSTIN; COETZER, 2004). É uma doença comumente relatada em bovinos de leite jovens, e os sorovares Dublin e Tiphymurium são frequentemente isolados (BARROS, 2007). A salmonelose pode se apresentar de forma hiperaguda, aguda e crônica, as quais diferem pela forma de apresentação das lesões (GELBERG *et al.*, 2013). As lesões incluem enterocolite, pneumonia, nódulos paratifoïdes no fígado, focos de necrose no rim e esplenomegalia (GUEDES *et al.*, 2010).

A infecção acontece geralmente por contaminação ambiental ou alimentar. A principal via de transmissão é a fecal-oral, e animais doentes ou portadores assintomáticos podem disseminar a enfermidade pelo rebanho (GUEDES *et al.*, 2010). Assim, o histórico do rebanho, os achados clínicos e de necropsia apenas levantam suspeita da enfermidade, de forma que para o diagnóstico definitivo é necessário o isolamento e a caracterização do agente (MARQUES *et al.*, 2013).

Há cinco padrões de salmonelose descritos em animais. Pode ser causada por um determinado sorovar de *Salmonella* patogênica para uma determinada espécie. O segundo padrão ocorrer em animais associado a algum fator predisponente como estresse de transporte, estado fisiológico ou por doença intercorrente, e os outros três padrões incluem os estados portadores de salmonelose (ativo, passivo e latente) (BARROS *et al.*, 2007).

Considerando que a salmonelose gera grandes perdas econômicas e que o diagnóstico é importante para que sejam tomadas medidas adequadas de tratamento e profilaxia nos

rebanhos, o objetivo desse estudo é caracterizar os casos de salmonelose em bovinos diagnosticados através de necropsias na região metropolitana de Porto Alegre - RS. Através desse estudo, pretende-se descrever o quadro clínico apresentado, as lesões macroscópicas e microscópicas, classificar os animais afetados por faixa etária, fatores predisponentes e raça e caracterizar a presença do agente às lesões em cortes histológicos através do exame imunohistoquímico naqueles casos onde o isolamento do agente não foi possível.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção das amostras

Foram revisados os arquivos de registros dos exames de necropsia no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2015 do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) em busca de casos de salmonelose em bovinos. Destes protocolos, foram agrupados e registrados as informações referentes ao diagnóstico, sexo, idade e raça. Os bovinos afetados, lesões macroscópicas e informações referentes a isolamentos e tipificação do agente foram caracterizados de acordo as descrições prévias que constavam nos laudos de necropsia. A caracterização microscópica foi realizada através da busca de lâminas e blocos de parafina, com posterior corte a 3µm de espessura em micrótomo, e processamento histológico de rotina, com confecção de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE).

Para exame imuno-histoquímico (IHQ), utilizou-se anticorpo comercial policlonal para *Salmonella* spp. (Biogenesis[®]), em cortes selecionados de intestino delgado, linfonodo mesentérico, fígado e baço, dos quais foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, sobre lâminas positivadas (StarfrostSakura[®]). Inicialmente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 15 minutos em temperatura ambiente. Para recuperação antigênica, os cortes foram tratados por protease XIV (Sigma[®]) por 15 minutos em temperatura ambiente. Para bloqueio das reações inespecíficas os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico[®]) a 5% diluído em solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 15 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados *overnight* com o anticorpo primário (diluição 1:1000). Após, foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado à estreptavidina-peroxidase (Kit LSAB-HRP, DakoCytomation[®]) por 20 minutos cada etapa. A reação foi revelada com cromógeno 3,3'- diaminobenzidina (DAB, K3468, Dako[®]). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 20 segundos e montadas com Entellan (Merck[®]). O controle positivo consistiu em um corte de intestino delgado de um suíno com lesões típicas e isolamento bacteriano de *Salmonella* spp, enquanto no controle negativo foi incubado PBS.

2.2 Classificação das amostras

Os dados referentes aos bovinos foram agrupados de acordo com o sexo, idade, raça, sinais clínicos, curso da doença (dias), forma de apresentação (individual ou em forma de surtos) e fator predisponente, conforme informações que constavam nos registros dos laudos de necropsia. Quanto às lesões macroscópicas, foram classificadas individualmente como presente (+) ou ausente (-) de acordo com o órgão afetado (intestino delgado e grosso, linfonodo mesentérico, vesícula biliar, fígado e baço). Quanto à caracterização microscópica das lesões, estas foram agrupadas de acordo com a sua apresentação no órgão afetado e a alteração apresentada e classificadas como ausente, leve, moderada ou acentuada. A IHQ foi classificada de acordo com a presença ou não de marcação nas lesões/órgão.

3 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2005 a dezembro de 2015, o SPV-UFRGS realizou 923 necropsias de bovinos. Entre essas, oito casos de salmonelose foram diagnosticados (0.87%). A média de idade dos bovinos afetados foi de 5.3 meses, com um intervalo de faixa etária variando entre 15 dias e 2.5 anos, sendo cinco fêmeas e três machos das raças Holandesa, Angus, Hereford e sem raça definida (SRD). A distribuição por sexo, faixa etária e raça encontram-se na **tabela 1**.

A maioria dos bovinos que adoeceram apresentavam histórico de diarreia, apatia, febre, emagrecimento, prostração e anorexia, apresentando a doença de forma individual em 75% (6/8) dos casos e em 25% (2/8) dos casos em forma de surtos, nos quais observou-se histórico de mortalidade de 19 bezerros em um intervalo de dois meses e mortalidade de 50 bovinos no período de dois anos com a doença ocorrendo no intervalo médio de três a quatro meses (**fig 1. A**). O curso clínico da doença foi agudo a hiperagudo com os bovinos apresentando sinais clínicos no intervalo de até uma semana. A presença de fatores predisponentes para a ocorrência da doença, como transporte, manejo e mudança de alimentação, foi observado em 87.5% (7/8) dos casos. A caracterização dos bovinos de acordo com os sinais clínicos apresentados, o curso da doença, a forma de apresentação e os fatores predisponentes encontram-se na **tabela 2**.

Os achados macroscópicos consistiram em espessamento da parede do intestino delgado com deposição de fibrina no lúmen (**fig 1. B; 1. D; 1. F**), por vezes formando úlceras em 87.5% dos casos (7/8) (**fig 1. E**), intestino grosso com conteúdo fibrinonecrótico aderido à mucosa em 50% dos casos (4/8) e os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume e ao corte edematosos em 75% dos casos (6/8) (**fig 1. C**). A vesícula biliar estava repleta e distendida, com conteúdo grumoso contendo fibrina e mucosa com áreas ulceradas em 62.5% (5/8) (**fig 2. C; 2. D**) dos casos e em 75% dos casos (6/8) observou-se o fígado aumentado de tamanho, difusamente alaranjado e com áreas pálidas multifocais distribuídas por toda a superfície (**fig 2. A; 2. B**). O baço estava aumentado de volume e congesto em 12.5% (1/8) dos casos. Em 12.5% (1/8) dos casos, observou-se icterícia, além de peritonite por ruptura intestinal em também 12.5% (1/8). A distribuição das lesões macroscópicas de acordo com o órgão afetado encontra-se na **tabela 3**.

Na histopatologia, observou-se em intestino delgado acentuada necrose e ulceração da mucosa em (62.5%; 5/8) e (50%; 4/8) respectivamente, além de acentuado infiltrado inflamatório de neutrófilos degenerados (50%; 4/8). Recobrimo essas áreas, havia acentuada

deposição de fibrina (62.5%; 5/8) entremeada por miríades bacterianas cocobacilares basofílicas (50%; 4/8). Em submucosa havia leve a moderada vasculite (12.5%;1/8) e trombose (50%; 4/8) (**fig 3. A; 3. B**). O intestino grosso apresentando abscessos de cripta, necrose da mucosa, infiltrado inflamatório neutrofilico com deposição de fibrina (25%; 2/8). O fígado apresentava áreas multifocais de necrose com deposição de fibrina e infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos (nódulos paratifoideis) (50%; 4/8) (**fig 3. C**). O baço apresentou em 25% (2/8) dos casos necrose fibrinoide de polpa branca e congestão (**fig 3. D**). Em 12.5% (1/8) casos, os linfonodos mesentéricos apresentaram necrose difusa de centros foliculares com ocasionais estruturas bacterianas associadas. A IHQ demonstrou acentuada marcação em mucosa e submucosa de intestino delgado em 100% dos casos (8/8) (**fig 3. F**). A caracterização microscópica das lesões e IHQ de acordo com os bovinos afetados são apresentadas na **tabela 4**. Dos casos submetidos ao cultivo bacteriológico, em três foram isolados *Salmonella* spp. com posterior tipificação de *Salmonella* Typhimurium em dois casos (bovinos 5 e 8) e *S. Panama* em um (bovino 3).

Tabela 1 – Caracterização dos bovinos afetados por salmonelose de acordo com sexo, idade e raça

| Bovino | Sexo | Idade | Raça |
|--------|-------|-----------|------------------|
| 1 | Fêmea | 1.5 meses | Holandesa |
| 2 | Macho | 30 dias | Holandesa |
| 3 | Fêmea | 15 dias | Holandesa |
| 4 | Macho | 8 meses | Hereford |
| 5 | Macho | 2 meses | Angus |
| 6 | Fêmea | 2.5 anos | SRD ¹ |
| 7 | Fêmea | Adulta | Holandesa |
| 8 | Fêmea | 3 meses | Angus |

¹Sem raça definida. Fonte: o próprio autor.

Tabela 2 – Caracterização dos bovinos afetados por salmonelose de acordo com sinais clínicos, curso da doença, forma de apresentação e fator predisponente

| Bovino | Sinais clínicos | Curso da doença | Forma de apresentação | Fator predisponente |
|--------|--|-----------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | Diarreia, apatia, hipotermia e anorexia | 6 dias | Individual | Transporte |
| 2 | Febre, anorexia e dificuldade respiratória | 7 dias | Surto | Manejo |
| 3 | Diarreia, apatia, febre, pneumonia e sinais neurológicos | 3 dias | Surto | Troca de alimentação |
| 4 | Diarreia, anorexia | NI ¹ | Individual | Manejo |
| 5 | Prostração, diarreia e icterícia | 6 dias | Individual | Troca de alimentação |
| 6 | Emagrecimento e agressividade | 7 dias | Individual | Transporte |
| 7 | Diarreia crônica | NI ¹ | Individual | NI ¹ |
| 8 | Apatia, anorexia e peritonite por ruptura intestinal | 14 dias | Individual | Troca de alimentação |

¹Não informado. Fonte: o próprio autor.

Tabela 3 – Distribuição das lesões macroscópicas de acordo com o órgão afetado em oito bovinos afetados por salmonelose

| Bovino | Intestino delgado | Intestino grosso | Linfonodo mesentérico | Vesícula biliar | Fígado | Baço |
|--------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------|--------|------|
| 1 | + | + | + | + | - | - |
| 2 | + | + | + | + | + | - |
| 3 | + | - | - | - | + | - |
| 4 | - | + | + | + | - | - |
| 5 | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | - | + | - | + | - |
| 7 | + | - | - | + | + | - |
| 8 | + | - | + | + | + | - |

Fonte: próprio autor

Tabela 4 – Caracterização microscópica e imuno-histoquímica das lesões em oito bovinos afetados por salmonelose

| Órgão | Ausente | Leve | Moderado | Acentuado | IHQ (+) |
|---|---------|------|----------|-----------|---------|
| Intestino (delgado/grosso) | | | | | 8/8 |
| Necrose da mucosa | - | 1/8 | 2/8 | 5/8 | |
| Ulceração da mucosa | 1/8 | 1/8 | 2/8 | 4/8 | |
| Deposição de fibrina | - | 2/8 | 1/8 | 5/8 | |
| Infiltrado inflamatório | - | 1/8 | 3/8 | 4/8 | |
| Vasculite e trombose | 1/8 | 4/8 | 1/8 | 2/8 | |
| Presença de bactérias | - | 2/8 | 2/8 | 4/8 | |
| Vesícula biliar | 6/8 | - | - | 2/8 | 1/8 |
| Fígado (nódulos paratifoideis) | 2/8 | 2/8 | - | 4/8 | 4/8 |
| Baço (focos necróticos) | 5/8 | 2/8 | 1/8 | - | 1/8 |
| Linfonodos mesentéricos (focos necróticos) | 1/8 | 3/8 | 3/8 | 1/8 | 2/8 |

Fonte: próprio autor



Figura 1. Caracterização Patológica de Salmonelose em Bovinos. (A) Bezerro em visão posterior, apresentando diarreia amarelada. (B) Espessamento de parede de intestino delgado. (C) Linfonodos mesentéricos acentuadamente aumentados de tamanho e edematosos, e evidência dos vasos do mesentério. (D) Segmento de intestino delgado com conteúdo fibrinonecrotico aderido à mucosa de forma difusa. (E) Intestino delgado com úlceras botonosas recobertas por exsudato fibrinoso formando “botões”. (F) Molde de fibrina preenchendo a luz do intestino delgado. Fonte: SPV-UFRGS.

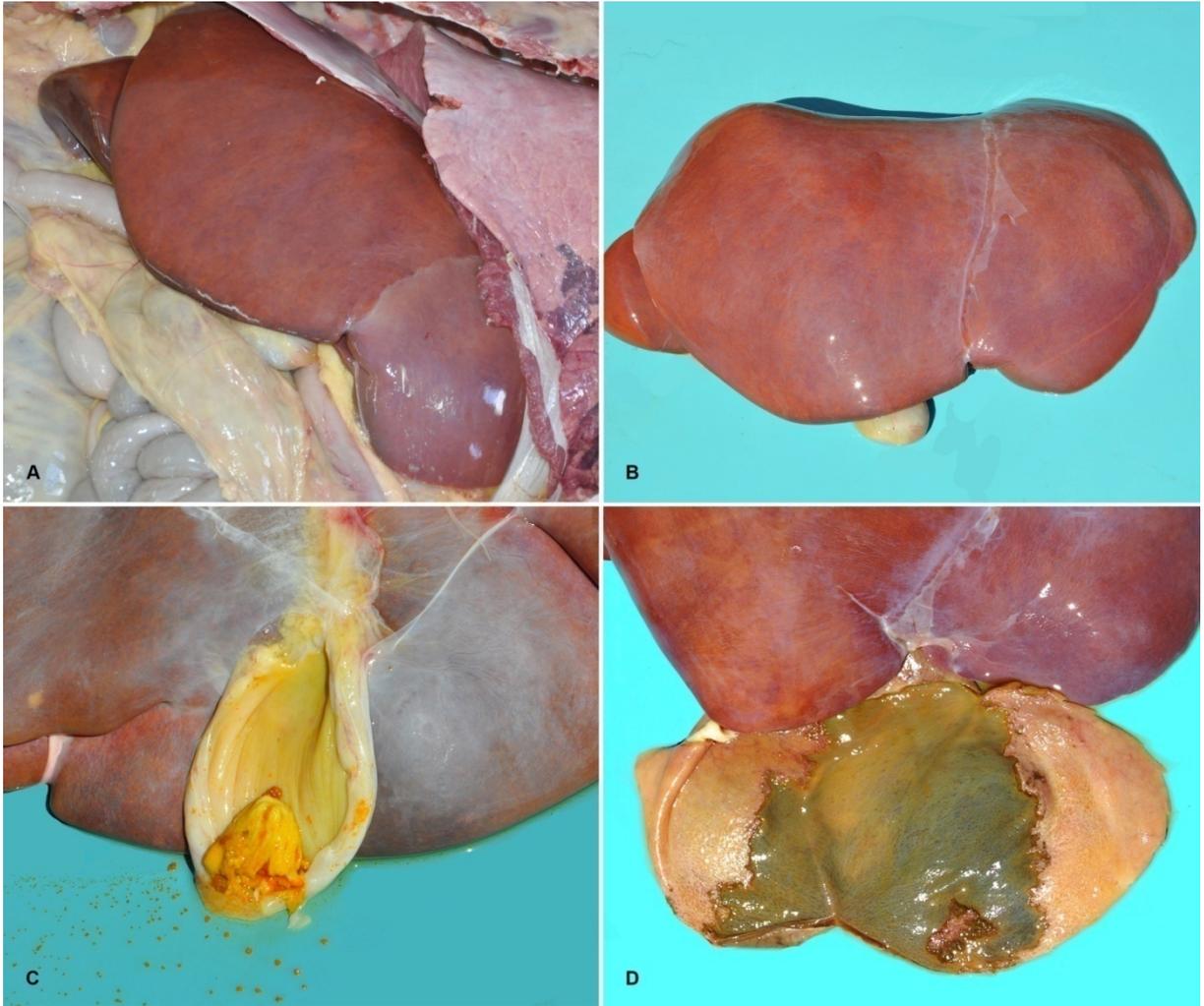


Figura 2. Caracterização patológica de salmonelose em bovinos. (A) Hepatomegalia. **(B)** Fígado aumentado de tamanho, alaranjado e com áreas pálidas e bordos arredondado. **(C)** Vesícula biliar apresentando conteúdo grumoso contendo fibrina. **(D)** Mucosa da vesícula biliar apresentando área focalmente extensa de ulceração. Fonte: SPV-UFRGS.

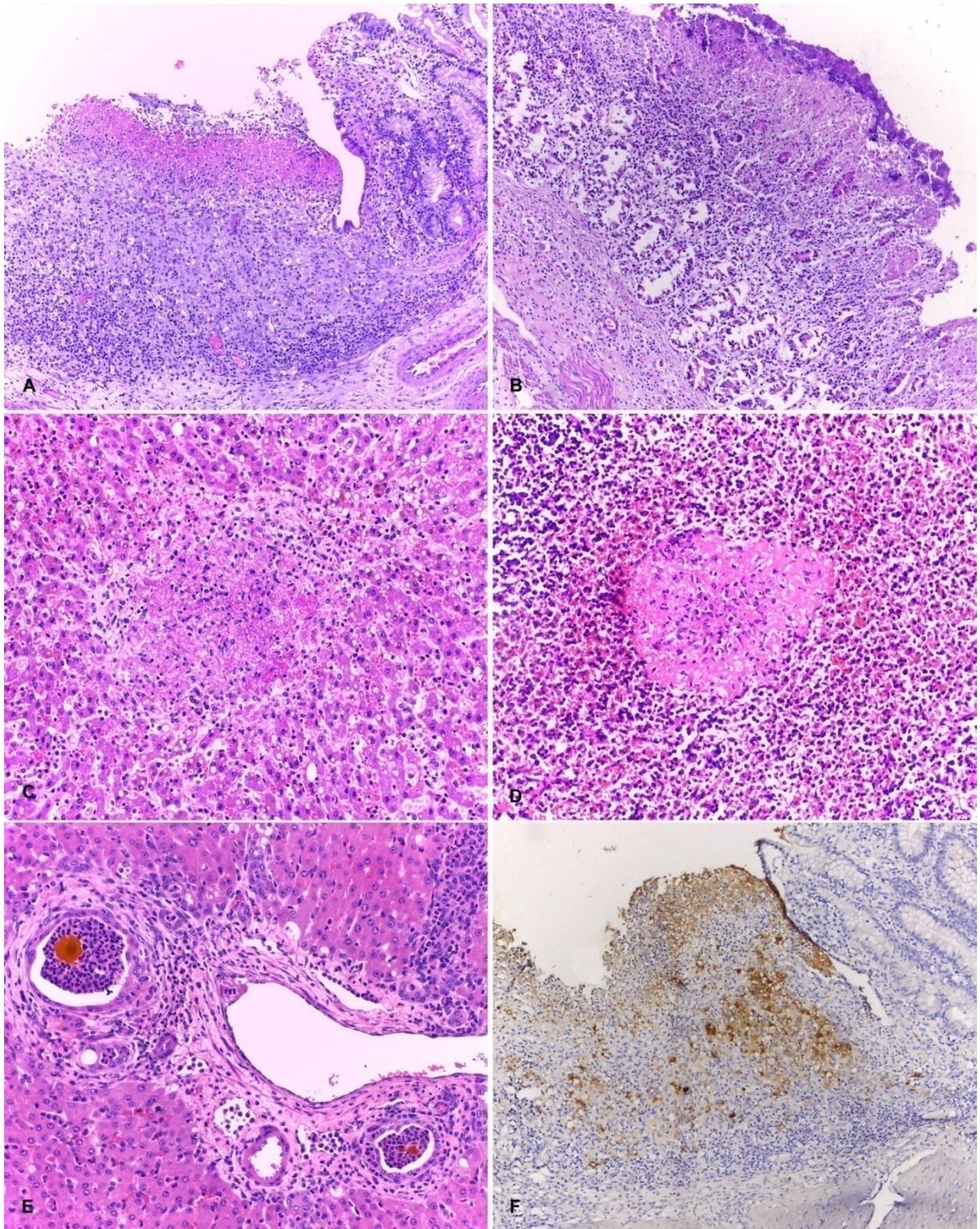


Figura 3. Caracterização patológica de salmonelose em bovinos. (A) Intestino delgado apresentando necrose e ulceração da mucosa, infiltrado inflamatório de neutrófilos degenerados e presença de miríades bacterianas cocais, HE, 20x. (B) Mucosa com deposição de fibrina, HE, 20x. (C) Fígado apresentando áreas multifocais de necrose com deposição de fibrina, infiltrado inflamatório de macrófagos e neutrófilos (nódulos paratifoídes), HE, 20x. (D) Baço: área de necrose fibrinoide em polpa branca, HE, 20x. (E) Ductos biliares contendo conteúdo alaranjado (colestase) e neutrófilos, HE, 20x. (F) Acentuada marcação em mucosa e submucosa de intestino delgado, IHQ anti-*Salmonella* spp, 20x. Fonte: SPV-UFRGS.

4 DISCUSSÃO

O diagnóstico de salmonelose nos bovinos neste estudo foi baseado na análise dos sinais clínicos, lesões macroscópicas, microscópicas, isolamento e tipificação do agente e imuno-histoquímica. A maioria dos bovinos afetados eram jovens, com a maioria dos casos até 3 meses de idade, e clinicamente apresentavam diarreia, prostração, febre e desidratação e corroboram com a literatura consultada (BARROS, 2007; SILVA *et al.*, 2009; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016). Tal suscetibilidade está relacionada com a imaturidade do sistema imune nessa faixa etária e ao declínio da imunidade passiva (colostró) (RADOSTITS *et al.*, 2007), os quais podem maximizar os efeitos entéricos de *Salmonella* spp. em bezerros. Segundo UZAL *et al.* (2016), a imaturidade do sistema imunológico dos bovinos mais jovens provavelmente é associada ao fato do maior número de mortes serem registrados nessa categoria. Nielsen (2003) relata que a idade é um fator muito relevante para o desenvolvimento dos sinais clínicos na salmonelose. Bezerros de até três meses são incapazes de produzir uma resposta imune rápida e eficaz contra a infecção, e animais com idade inferior a quatorze dias apresentam certa proteção pelos anticorpos adquiridos através do colostro, sendo os bezerros entre quatorze dias e três meses mais susceptíveis à infecção e consequentemente ao aparecimento de sinais clínicos (MARQUES *et al.*, 2013).

Além disso, fatores estressantes podem comprometer a resposta imunológica ou modificar a microbiota intestinal (UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016). Em 7/8 dos casos foram identificados fatores estressantes prévios, como mudança de alimentação (3/7), manejo (2/7) e transporte (2/7), os quais associados à imaturidade do sistema imune e queda na imunidade passiva foram determinantes para a ocorrência da doença. Dois bovinos deste estudo eram adultos, nos quais a doença é esporádica e pode ser desencadeada devido à existência de fatores predisponentes, como os citados anteriormente (RADOSTITS *et al.*, 2007; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016). Os principais achados macroscópicos foram identificados no intestino delgado e grosso, com espessamento da parede e deposição de fibrina no lúmen. Esses achados macroscópicos caracterizam uma enterocolite fibrinonecrótica, a qual associada à detecção por IHQ de *Salmonella* spp. em 100% dos bovinos desse estudo e às alterações microscópicas, como necrose e acúmulos de fibrina na superfície da mucosa do intestino delgado são compatíveis com as alterações descritas na literatura para a salmonelose entérica (MOHLER *et al.*, 2009) e correspondem aos achados descritos nos casos de salmonelose (SILVA *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2011).

A colecistite fibrinosa é descrita por Barros (2007), como uma lesão característica de salmonelose em bovinos, com acentuado exsudato fibrinoso e formação de molde de fibrina no lúmen. Em 62.5% (5/8) casos observou-se a vesícula biliar repleta contendo fibrina. A hepatomegalia (75%, 6/8 casos) e esplenomegalia observada em 12.5% (1/8) casos são achados sugestivos de salmonelose septicêmica (MARQUES *et al.*, 2013), o que é comumente relatado em bovinos (LOPES *et al.*, 2013; GELBERG, 2012), provocando quadros clínicos graves.

Na microscopia a observação de infiltrado de neutrófilos e macrófagos, presença de vasculite, necrose endotelial, trombos e nódulos paratífoides no fígado ajudam a comprovar também a ocorrência da doença no rebanho, a observação microscópica de granulomas paratífoides em diversos órgãos representam provavelmente uma resposta celular imunomediada à bacteremia embólica (MARQUES *et al.*, 2013; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016). Segundo Gelberg (2012) a forma aguda da salmonelose favorece a adesão e a colonização da mucosa, causando necrose mediada por toxinas bacterianas. Por meio desse processo e da inflamação aguda, os leitos capilares da lâmina própria passam a ser permeáveis, e é provável que as bactérias, as toxinas bacterianas e os macrófagos infectados entrem na circulação venosa e sejam disseminados, pela veia porta, até o fígado. Já a forma crônica da doença, favorece a invasão da lâmina própria da submucosa, exercendo efeitos diretos na vasculatura que supre o intestino. No entanto, é possível que as úlceras em botão observadas nesta forma sejam uma manifestação da septicemia, e que a adesão das bactérias ao endotélio vascular provoque vasculite, trombose, isquemia e infarto (GELBERG, 2012). Observou-se vasculite e trombose em (12,5% (1/8); 50% (4/8)) respectivamente.

A salmonelose pode ocorrer na forma de surtos, os quais podem durar muitos meses, e podem ser decorrentes da persistência do agente no meio ambiente, persistência de fatores predisponentes, presença de animais portadores ou reinfecção de animais suscetíveis (MARQUES *et al.*, 2013). Nos dois surtos observados (bovinos 2 e 3), o primeiro apresentou a morte de 19 bezerros em um intervalo de dois meses, enquanto no segundo relatou-se a morte de 50 bezerros nos últimos dois anos, com sinais clínicos distintos aos casos individuais, como sinais neurológicos (bovino 3) e respiratórios (bovinos 2 e 3), além de diarreia. No Rio Grande do Sul, dois surtos de salmonelose foram descritos, incluindo as formas entéricas aguda e crônica, e o sorotipo isolado foi *Salmonella* Dublin. Todavia, há poucos surtos de salmonelose descritos no Brasil envolvendo bovinos, de modo que a enfermidade pode ser subdiagnosticada e/ou subrelatada (BARROS, 2007).

A salmonelose em bovinos é predominantemente causada por *S. Typhimurium* e *S. Dublin*, diferindo em partes do observado no presente estudo, no qual obteve-se isolamento com tipificação dos sorovares Typhimurium (bovinos 5 e 8) e Panama (bovino 3). *S. Typhimurium* tem uma ampla gama de hospedeiros, afeta animais jovens, causando enterocolite e septicemia (MARQUES *et al.*, 2013; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016), e, geralmente, afeta indivíduos ou grupos pequenos de animais (BARROS, 2007), assim como observado no presente estudo em que os bovinos 5 e 8 foram afetados individualmente. Por sua vez, *S. Panama* tem sido mais associada a doença septicêmica grave (enterocolite, bacteremia e meningite) em crianças de até 15 meses de idade e isolada a partir de alimentos e água (CORDANO *et al.*, 1996; NÖEL *et al.*, 2010). Esse sorovar acomete raramente bovinos, com descrição na Argentina causando diarreia em bezerros de corte onde foi tipificada *S. Panama* (BELLINZONI *et al.*, 1990). No presente estudo, *S. Panama* ocorreu na forma de surto com doença grave septicêmica similar ao descrito em humanos com sinais entéricos, respiratórios e neurológicos (CORDANO *et al.*, 1996; NÖEL *et al.*, 2010), o que sugere que esse sorovar pode apresentar um fator de virulência próprio e não depender de fatores predisponentes. A ausência do crescimento bacteriano em 50% (4/8) dos casos provavelmente seja decorrente do tratamento com antimicrobianos que pode criar culturas bacterianas falso-negativas (GELBERG, 2012).

Na IHQ para *Salmonella* spp. obteve-se marcação em 100% dos casos (8/8) em cortes de intestino delgado ou grosso. Todavia, mesmo que em todos os casos o agente tenha sido identificado nesses tecidos, não foi possível confirmar o envolvimento da *Salmonella* spp. em todas as lesões hepáticas, esplênicas e em vesícula biliar. Os nódulos paratifoïdes são frequentemente associados à salmonelose entérica aguda em bovinos (LOPES *et al.*, 2013) e o mecanismo dessas lesões parece estar relacionado à circulação sistêmica e/ou à liberação de toxinas da *Salmonella* spp. no organismo (STOYCHEVA, 2006; LOPES *et al.*, 2013), o que pode explicar a ausência de marcação observada em fígado, baço e vesícula biliar.

A salmonelose deve ser diferenciada de outras doenças causadoras de diarreia em bovinos como: diarreia por *Escherichia coli* (colibacilose), rotavirose, coronavirose e eimeriose (LOPES *et al.*, 2013). A colibacilose costuma ocorrer em bezerros na primeira semana de vida (BARROS, 2007; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016), apresentando à necropsia intestino delgado dilatado, flácido e preenchido por fluído translúcido e amarelo, algumas vezes por gás. Microscopicamente observam-se bactérias aderidas na superfície das vilosidades e pode haver, ainda, atrofia e fusão leve das vilosidades no jejuno e íleo (GELBERG *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013). A eimeriose provoca diarreia fétida

sanguinolenta em bovinos entre três semanas e seis meses (LOPES *et al.*, 2013; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016), e à macroscopia observa-se hiperemia das serosas e distensão das alças intestinais por líquido, enquanto microscopicamente as lesões se caracterizam principalmente pela presença de parasitos, também pela necrose de vilosidades e criptas, que resulta em atrofia pela perda das células epiteliais, associada a congestão e infiltrado inflamatório mononuclear, podendo também apresentar eosinófilos (LOPES *et al.*, 2013; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016). O rotavírus é considerado um importante agente etiológico da gastroenterite viral aguda em animais jovens, ocorrendo, principalmente, na primeira semana de vida. Bovinos acometidos apresentam diarreia aquosa amarelada e desidratação, com acúmulo de fluído no lúmen intestinal e à microscopia encurtamento e fusão de vilosidades (LOPES *et al.*, 2013; GELBERG *et al.*, 2012). O coronavírus bovino (BCoV) é um agente causador de diarreia neonatal (que afeta animais entre três a quatro semanas de idade) e da disenteria de inverno em vacas adultas. A mesma cepa viral pode ser responsável pelo aparecimento simultâneo de doença entérica e respiratória nos mesmos animais (LOPES *et al.*, 2013; PAVARINI *et. al.*, 2009). O vírus causa severa enterocolite caracterizada pela destruição das vilosidades no intestino delgado e destruição das criptas do intestino delgado e grosso. (LOPES *et al.*, 2013; RADOSTITIS *et al.*, 2007; UZAL, PLATTNER, HOSTETTER, 2016).

5 CONCLUSÃO

Com base nos achados deste estudo, pode-se concluir que a salmonelose foi observada principalmente em bovinos jovens.

A apresentação da doença é mais frequente na forma individual do que na forma de surtos.

Fatores predisponentes como manejo, mudança de alimentação e transporte estiveram associados à maioria dos casos relatados.

Em três casos foi realizado o isolamento com tipificação para *Salmonella* Typhimurium (bovinos 5 e 8) e *S. Panama* (bovino 3).

A imuno-histoquímica obteve marcação no intestino delgado em todos os casos, de forma que é uma ferramenta importante de diagnóstico quando o isolamento do agente não é possível.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. S. *et al.* Aspectos clínicos e patológicos de um surto de salmonelose em bezerros. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 18, (supl.2) resumo 005, p. 21-22, 2013.
- ÁVILA, L. G.; SILVA, R. A.; FAGLIARI, J. J. Avaliação clínica da infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Typhimurium. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.6, p. 1587-1590, dez. 2011.
- BARROS, C. S. L. Salmonelose. *In*: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A; BORGES, J. R. J. **Doença de ruminantes e equídeos**. 3. ed., Santa Maria: Pallotti, 2007, v.1, p. 416-425.
- BELLINZONI, R. C. *et al.* Mycrobiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.22, n. 3, p. 130-137, jul.1990.
- BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 3, p. 443-464, nov. 2012.
- COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. 2. ed. Southern Africa: Oxford University Press, 2004.p.1582-1590.
- CORDANO, A. M.; VIRGILIO, R. Evolution of Drug Resistance in *Salmonella* panama Isolates in Chile. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Santiago, v. 40, n.2, p. 336-341, feb.1996.
- GELBERG, H. B. Sistema alimentar, Peritônio, Omento, Mesentério e Cavidade Peritoneal. *In*: ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5. ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier, 2012. p. 378-379.
- GUEDES, R.M.C.; BROWN, C.C.; SEQUEIRA, J.L. Sistema digestório. *In*: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2011, v. 1, cap. 3, p.165-167.
- LOPES, P. F. R. **Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e molecular de casos fatais de diarreia bovina na Microrregião de Lavras**, 2013. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, 2013.
- MARQUES, A. L.A. *et al.* Surto de salmonelose pelo sorovar Dublin em bezerros no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 8, p. 983-988, ago. 2013.
- MOHLER, V. L.; IZZO, M. M.; HOUSE, J. K. *Salmonella* in calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n.1, p. 37-54, mar. 2009.
- NIELSEN, L. R. **Salmonella Dublin in dairy cattle: use of diagnostic tests for investigation of risk factors and infection dynamics**. 2003. 219 p. PHD thesis -Department of Animal Science and Animal Health, Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 2003.

NIELSEN, L. R. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 1-9, feb. 2013.

NOËL, H. Consumption of Fresh Fruit Juice: How a Healthy Food Practice Caused a National Outbreak of *Salmonella* Panama Gastroenteritis. **Food borne Pathogens and Disease**, v. 7, n.4, p. 375-381, abr. 2010.

PAVARINI, S. P. **Achados clínicos e patológicos em casos naturais e experimentais de disenteria de inverno em bovinos adultos**. 2009. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

RADOSTITS, O. M. *et al.* **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.896-921.

RIBEIRO, M. G. *et al.* Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n.2, p. 155-160, feb. 2010.

RIET-CORREA, F. *et al.* **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. 3. ed. Santa Maria: Palloti, 2007.

SANCHES, A. W. D. *et al.* Surto de salmonelose em bovinos. *In*: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Belo Horizonte. **Anais de congresso**, Belo Horizonte, MG. p. 22.

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

SILVA, D.G.; ÁVILA, L.G.; SILVA, P. R. L. Estudo comparativo da infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Thyphimurium. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 7.,2009, Belo Horizonte. **Anais de congresso**. Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009, p.464-468.

SILVA; D.G.; SILVA; P.R.L.; FAGLIARI; J.J. Avaliação clínica da infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Dublin. **Arquivo Brasileiro de veterinária e Zootecnia**, v.60, n. 1, p.251-255, 2008.

SMITH, D. R. Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea. **Veterinary clinics of North America - Food Animal Practice**. v. 28, n. 3, p. 465-481, nov. 2012.

STOYCHEVA, M. Liver disturbances in patients with salmonellosis. **Trakia Journal of Sciences**. Plovdiv, v. 4, n. 2, p. 23-27, 2006.

UZAL, F. A., PLATTNER, B. L., HOSTETTER, J. M. Alimentary System. *In*: MAXIE, M. G. 2016. **Pathology of Domestic Animals** – Jubb, Kennedy & Palmer's. 6.ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016, v.2, p. 117-176.