

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

ROBERIO GOMES OLINDA

Doenças Infecciosas e Parasitárias de Suínos no Nordeste do Brasil

PATOS/PB
2020

ROBERIO GOMES OLINDA

Doenças Infecciosas e Parasitárias de Suínos no Nordeste do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas

PATOS/PB
2020

O46d

Olinda, Roberio Gomes.

Doenças infecções e parasitárias de suínos no Nordeste do Brasil / Roberio Gomes Olinda. - Patos, 2022.

40 f. : il. Color.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2020.

"Orientação: Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas".

Referências.

1. Doenças de Suíno. 2. Pulmão. 3. Dermatite. 4. Protozoário. 5. Vírus *Swinepox*. 6. *Demodex phylloides*. I. Dantas, Antônio Flávio Medeiros. II. Título.

CDU 591.2:636.4(043)


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

ROBERIO GOMES OLINDA

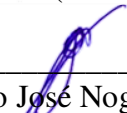
Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciência e Saúde Animal.

APROVADO EM 28/02/2020

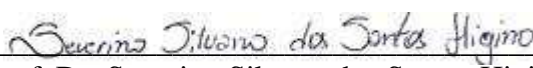
EXAMINADORES




Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Presidente (Orientador)



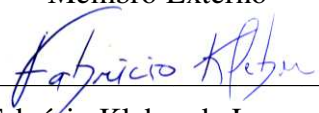
Prof. Dr. Glauco José Nogueira de Galiza
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Membro Interno



Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Membro Interno



Prof. Dra. Lisanka Ângelo Maia
Universidade Federal da Paraíba/UFPA
Membro Externo



Prof. Dr. Fabrício Kleber de Lucena Carvalho
Centro Universitário de Patos/UNIFIP
Membro Externo

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO I - Toxoplasmose aguda em suínos no Brasil causada por <i>Toxoplasma gondii</i> genótipo Chinese 1. Roberio G. Olinda, Hilda F. J. Pena, Maria Talita S. Frade, Jefferson da Silva Ferreira, Lisanka Â. Maia, Antônio Flávio M. Dantas, Solange M. Gennari, Solange Oliveira, Franklin Riet-Correa, Parasitology Research	8
RESUMO	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
3 RESULTADOS	13
4 DISCUSSÃO	16
CAPÍTULO II - Varíola em suínos no Nordeste do Brasil. Roberio G. Olinda, Lisanka A. Maia, Juliana F. Cargnelutti, Rayr C.S. Gois, Jael S. Batista, Antônio F.M. Dantas, Eduardo F. Flores e Franklin Riet-Correa, Pesquisa Veterinária Brasileira	21
RESUMO	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
3 RESULTADOS	26
4 DISCUSSÃO	29
CAPÍTULO III - Demodicose Suína: Relato de Caso. Roberio Gomes Olinda, Millena de Oliveira Firmino, Raquel Annes Fagundes Silva, Jovanna Karine Pinheiro, Rodrigo Cruz Alves, Glauco José Nogueira de Galiza e Antônio Flávio Medeiros Dantas, Acta Scientiae Veterinariae	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 RELATO DE CASO	35
3 DISCUSSÃO	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40

RESUMO

Esta tese é composta de três capítulos sobre doenças infecciosas em suínos diagnosticadas no Laboratório de Patologia Animal, do Hospital Veterinário Universitário Prof. Dr. Ivon Macedo Tabosa, da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba. O primeiro capítulo descreve os achados clínico-patológicos, imuno-histoquímicos e a caracterização molecular em dois casos de toxoplasmose sistêmica em suínos no Brasil. Os sinais clínicos observados foram apatia e dispneia. Macroscopicamente, os pulmões estavam não colapsados, difusamente avermelhados e no parênquima foram observados múltiplos nódulos de necrose caseosa. Histologicamente, havia pneumonia broncointersticial, necrosante, difusa, acentuada e com numerosos taquizoítos de *T. gondii* intralésional. A imuno-histoquímica, realizada com anticorpo anti-*T. gondii* em tecido pulmonar revelou forte imunomarcagem de taquizoítos livres e cistos. A nested PCR tendo como alvo um fragmento de 155pb do gene B1 de *T. gondii* foi positiva. Realizou-se a genotipagem por meio de PCR-RFLP e microssatélites, sendo caracterizado o genótipo não-arquétipo Chinês 1. O segundo capítulo descreve os achados epidemiológicos, clínico-patológicos e moleculares de surtos de infecção pelo vírus da varíola suína na região semiárida do Nordeste. Cinco surtos de varíola provocada pelo vírus da varíola suína (SWPV) ocorreram em rebanhos suínos de dois municípios do estado do Rio Grande do Norte (2008-2014). Os sinais clínicos iniciaram com pápulas cinzentas ou esbranquiçadas coalescentes e vesículas que geralmente evoluíram à lesões crostosas, e em alguns casos havia úlceras. Macroscopicamente, foram observados pápulas, pústulas avermelhadas, por vezes recobertas por crostas, afetando mais gravemente as orelhas, região periocular, abdômen e membros torácicos e pélvicos. Histologicamente, observou-se dermatite proliferativa e ulcerativa com degeneração balonosa das células do epitélio, com inclusões virais eosinofílicas no citoplasma de queratinócitos. Foi confirmado SWPV por sequenciamento e análise filogenética. O diagnóstico foi realizado com base nos achados epidemiológicos, clínico-patológicos e confirmado por exames moleculares. O terceiro relata os achados clínicos e patológicos da demodicose suína em um suíno no semiárido da Paraíba, Brasil. No exame clínico, observaram-se nódulos multifocais a coalescentes, firmes, associados a crostas e moderada alopecia. Quando manipulados, tais nódulos expeliam conteúdo semissólido de coloração amarelada, evidenciando secreção purulenta. As lesões concentravam-se na região lateral do tórax, do abdômen, em todos os membros, cabeça e orelhas. Foi realizada biópsia incisional e avaliação histopatológica. Macroscopicamente observou-se na superfície nódulos irregulares, com múltiplas crostas e descamação. Ao corte exibiam superfície esbranquiçada com múltiplas áreas formando cavitações preenchidas com material amarelado. Histologicamente, havia dermatite granulomatosa a perivascular e foliculite associada ácaros morfológicamente compatíveis com o gênero *Demodex*. O diagnóstico de demodicose foi baseado nos achados macroscópicos e microscópicos associado ao exame parasitológico. As doenças diagnosticadas em suínos no LPA/HVU/UFCG ocorrem esporadicamente, entretanto causam perdas econômicas significativas na região, principalmente em criações de subsistência. Muitas patologias são de caráter infeccioso e o seu surgimento está relacionado diretamente a falhas de manejo nutricional e sanitário. Sugere-se que outros trabalhos sejam realizados, principalmente de forma mais abrangente, com o intuito de determinar as patologias que ocorrem em suínos nas diferentes regiões do Nordeste brasileiro, para que sejam sugeridas medidas básicas de controle e prevenção de infecções na suinocultura de subsistência, minimizando as perdas econômicas significativas para os pequenos produtores.

Palavras-chaves: doenças de suínos; pulmão; dermatite; protozoário; vírus *Swinepox*; *Demodex phylloides*.

ABSTRACT

This thesis is composed of three chapters on infectious diseases in swine diagnosed at the Animal Pathology Laboratory, Hospital Veterinário Universitário Prof. Dr. Ivon Macedo Tabosa, from the Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba. The first chapter describes the clinicopathological, immunohistochemical and molecular characterization findings in two cases of systemic toxoplasmosis in swine in Brazil. The clinical signs observed were apathy and dyspnea. Macroscopically, the lungs were non-collapsed, diffusely reddened, and multiple nodules of caseous necrosis were observed in the parenchyma. Histologically, there was bronchointerstitial, necrotizing, diffuse, accentuated pneumonia with numerous intralesional tachyzoites of *T. gondii*. Immunohistochemistry, performed with anti-*T. gondii* in lung tissue revealed strong immunostaining of free tachyzoites and cysts. Nested PCR targeting a 155-bp fragment of the B1 gene of *T. gondii* was positive. Genotyping was performed using PCR-RFLP and microsatellites, characterizing the non-archetype Chinese genotype 1. The second chapter describes the epidemiological, clinicopathological and molecular findings of outbreaks of swinepox virus infection in the semiarid region of the Northeastern. Five outbreaks of smallpox caused by the swinepox virus (SWPV) occurred in swine herds in two municipalities in the state of Rio Grande do Norte (2008-2014). Clinical signs started with coalescing gray or whitish papules and vesicles that usually progressed to crusted lesions, and in some cases, there were ulcers. Macroscopically, papules, reddish pustules, sometimes covered by crusts, were observed, affecting more severely the ears, periorcular region, abdomen and thoracic and pelvic limbs. Histologically, proliferative and ulcerative dermatitis with ballooning degeneration of epithelial cells was observed, with eosinophilic viral inclusions in the cytoplasm of keratinocytes. SWPV was confirmed by sequencing and phylogenetic analysis. The diagnosis was made based on epidemiological, clinicopathological findings and confirmed by molecular tests. The third reports the clinical and pathological findings of swine demodicosis in a swine in the semiarid region of Paraíba, Brazil. In clinical examination, firm, multifocal to coalescing nodules associated with crusts and moderate alopecia were observed. When manipulated, such nodules expelled yellowish semi-solid content, evidencing purulent secretion. The lesions were concentrated in the lateral region of the thorax, abdomen, all limbs, head and ears. Incisional biopsy and histopathological evaluation were performed. Macroscopically, irregular nodules were observed on the surface, with multiple crusts and desquamation. On section, it exhibited a whitish surface with multiple areas forming cavitations filled with yellowish material. Histologically, there was granulomatous to perivascular dermatitis and folliculitis associated with mites morphologically compatible with the *Demodex* genus. The diagnosis of demodicosis was based on the macroscopic and microscopic findings associated with the parasitological examination. The diseases diagnosed in swine in the LPA/HVU/UFCG occur sporadically, however they cause significant economic losses in the region, mainly in subsistence farming. Many pathologies are infectious and their emergence is directly related to nutritional and sanitary management failures. It is suggested that other studies be carried out, mainly in a more comprehensive way, in order to determine the pathologies that occur in swine in the different regions of the Brazilian Northeastern, so that basic measures of control and prevention of infections in the subsistence swine are suggested, minimizing significant economic losses for small producers.

Key words: swine diseases; lung; dermatitis; protozoan; *Swinepox* virus; *Demodex phylloides*.

LISTA DE TABELAS

	Páginas
CAPÍTULO II - Varíola em suínos no Nordeste do Brasil.....	21
TABELA 1 - Dados epidemiológicos dos surtos de varíola suína no Nordeste do Brasil.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
CAPÍTULO I - Toxoplasmose aguda em suínos no Brasil causada por <i>Toxoplasma gondii</i> genótipo Chinese 1.....	08
FIGURA 1 - Análise de rede filogenética de <i>Toxoplasma gondii</i> de cepas de referência (RH = Tipo I; PTG = Tipo II; CTG = Tipo III; MAS = Tipo BrIV; Cougar = genótipo RFLP # 66 e TgCatBr5 = genótipo RFLP # 19); Os genótipos RFLP mais frequentes encontrados no Brasil (Tipos BrI, BrII e BrIII); O genótipo RFLP mais frequente encontrado na região Nordeste do Brasil (genótipo RFLP # 13) e o genótipo chinês 1 (genótipo RFLP # 9).	13
FIGURA 2 - Lesões macroscópicas e histológicas de toxoplasmose sistêmica aguda em suínos. (A) A superfície de corte do pulmão é redundada de forma difusa com nódulos esbranquiçados com um diâmetro de 0,5-1,0 cm (setas). (B) Espessamento difuso dos septos alveolares causados por infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas. Os taquizoítos são observados no citoplasma de macrófago alveolar (ponta de seta; no detalhe). HE, bar = 20 µm. (C) Fígado com bradizoíto de <i>T. gondii</i> no citoplasma de um hepatócito (ponta de flecha e inserção). Necrose individual de hepatócitos também é observada (seta); HE, bar = 20 µm. (D) Pulmão com imunomarcção forte de taquizoítos livres (seta vazia) nos septos alveolares, citoplasma de macrófagos, brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos. Também é observado o imunomarcção de bradizoítos em septos alveolares (seta). Streptavidina-biotina-peroxidase (IHQ), bar = 50 µm.	14
CAPÍTULO II - Variola em suínos no Nordeste do Brasil.....	21
FIGURA 1 - Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da DNA polimerase de diferentes gêneros da família <i>Poxviridae</i> : <i>Avipoxvirus</i> (números de acesso GenBank AY318871 e M31638), <i>Capripoxvirus</i> (KC684337 e KC951854), <i>Cervidpoxvirus</i> (AY689437), <i>Crocodylidpoxvirus</i> (NC008030), <i>Leporipoxvirus</i> (NC001132 e NC001266), <i>Molluscipoxvirus</i> (NC001731), <i>Orthopoxvirus</i> (DQ066528, NC006998 e DQ441419), <i>Parapoxvirus</i> (AY386263 e AY386265), <i>Suipoxvirus</i> (JF770341 e AF410153) e <i>Yatapoxvirus</i> (NC009888); o grupo externo foi composto pelo respectivo gene de <i>Squirrelpoxvirus</i> (AY340976). A árvore foi construída usando o método <i>Neigbohr-Joining</i> com 1.000 réplicas de <i>bootstrap</i> baseado no método de <i>p-distance</i> e implementado pelo MEGA	

	5.0. Valores >60% são mostrados. A amostra positiva para varíola suína do presente relatório é identificada com um losango preto.	26
FIGURA 2 -	Achados macroscópicos infecção pelo vírus da varíola suína em suínos. (A) Vesículas e pápulas multifocais a coalescentes no pescoço e membros anteriores. (B) Pavilhão auricular recoberto por crostas acentuadas.	28
FIGURA 3 -	Lesões histológicas da infecção pelo vírus da varíola suína em suínos. (A) Dermatite pustulosa intraepidérmica grave HE, Bar=50µm. (B) Inclusões arredondadas, eosinofílicas, intracitoplasmáticas, com 3-8 µm de diâmetro (setas), são observadas próximas a uma pústula. HE, Bar=20µm.....	29
CAPÍTULO III - Demodicose Suína: Relato de Caso		13
FIGURA 1 -	Demodicose em suíno no Estado da Paraíba. A) Nódulos multifocais a coalescentes, firmes, associados a crostas acinzentadas e moderada alopecia na região lateral do tórax, abdômen, membros, cabeça e orelhas. B) Fragmento de pele hirsuta demonstrando na superfície de corte múltiplas cavitações com material amarelado. C) Observa-se folículo piloso distendido por debris de ceratina e numerosas estruturas parasitárias no lúmen em derme superficial. HE, obj. 20x. D) Derme profunda observa-se um granuloma focal. HE, obj. 20x.	36

INTRODUÇÃO GERAL

Na economia brasileira os setores de agricultura e pecuária são fundamentais para o desenvolvimento socioeconômico. Neste contexto, a nível mundial o Brasil é o quinto maior consumidor de carne suína e se destaca como o quarto maior exportador deste produto (ABIPECS, 2014). Para os anos vindouros há expectativa no mercado suinícola brasileiro de crescimento, principalmente no volume das exportações (ABCS, 2014). Nesta contextualização, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), estimou que no período de 2012 até 2030, o mundo haverá de aumentar a produção *per capita* de carne em 20%. Há maior perspectiva de crescimento do setor de produção de carne de aves (40,4%), suína (20%), peixe (19%) e bovina (12,7%) respectivamente.

Historicamente os Estados brasileiros da região Sul (49,5%) detém o maior rebanho de suínos no território brasileiro, seguidos pelos os estados do Sudeste (18,4%), Nordeste (15,1%), Centro-Oeste (13,2%) e Norte (3,8%) (IBGE, 2012). Apesar de ter ocorrido no período entre 2008 e 2012, perda de participação dos efetivos do Norte e Nordeste e ganho relativo em comparação com as demais regiões brasileiras. Estima-se que aproximadamente 5,8 milhões de cabeças de suínos são criados no Nordeste, o que corresponde a 15,1% do total no Brasil (IBGE, 2012). Estes dados representa uma contribuição expressiva nos aspectos sociais e econômicos para os criadores nesta região.

Estudos tem demonstrados que a produção de suínos no Nordeste apresenta de forma incipiente, pouco desenvolvida, em que se observa grande contingente de animais que são criados de forma rudimentar (Ribeiro, 2005, Silva Filha et al. 2011). Pois, há o predomínio de criações de subsistência, sem tecnificação adequada para uma exploração lucrativa da atividade e com falhas de manejo que se refletiam na baixa produtividade dos rebanhos e na exposição dos animais a riscos de infecção por agentes patogênicos. Apesar de que nos últimos anos tem sido verificado significativo avanço na suinocultura nordestina.

Considerando-se os fatores de produção, as doenças infecciosas são as maiores ameaças à estabilidade das cadeias produtivas. Portanto, a disponibilização de ferramentas de diagnóstico alavancam pesquisas de etiologia, epidemiologia, caracterização anatomopatológica, e através da utilização de exames complementares por meio das técnicas imuno-histoquímica e molecular, tornam-se essenciais no controle de problemas sanitários em rebanhos suínos (Ciacci-Zanella et al. 2011).

Na medicina veterinária, os conceitos de estudos populacionais, utilizando-se as ferramentas epidemiológicas, em estudos de doenças em populações e a avaliação dos fatores

de riscos que determinam a sua ocorrência são importantes. Uma forma de estudo populacional, utilizado frequentemente em patologia veterinária é o estudo retrospectivo, que pode abordar as causas de morte ou razões para eutanásia e, dessa forma, permitem determinar a frequência de doenças em relação à espécie, ao sexo, à raça e à idade em uma determinada região geográfica. A partir dos resultados de um levantamento podem-se reunir os dados clínicos, laboratoriais e patológicos de uma determinada doença; ou esclarecer a ocorrência de uma enfermidade de acordo com a categoria que esse indivíduo está inserido; elucidar a etiologia das lesões cuja, outrora eram desconhecidas, por não haver disponibilidade de técnicas com acurácia apurada de diagnóstico; e, por fim, retificar diagnósticos incorretos e conceitos errôneos a respeito de algumas entidades clínico-patológicas (Brum et al. 2013). A grande parte das referências bibliográficas disponíveis no Brasil sobre a ocorrência e as características de doenças dos animais domésticos é fundamentada em estudos internacionais.

Nos últimos anos, em vários laboratórios de diagnóstico em diferentes regiões do Brasil estão trabalhando com estudos retrospectivos, com a finalidade de criar um banco de dados sobre os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos das doenças nos animais domésticos. Este estudo dará continuidade a uma linha de pesquisa do Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande (LPA-UFCG), no mesmo modelo de estudo, mas alterando a espécie estudada. Pois já foram determinadas as frequências das doenças que acometem o SNC de cães (Frade, 2014), equinos (Pimentel et al. 2007), bovinos (Galiza et al. 2012), ovinos e caprinos (Guedes et al. 2012).

Porém, ainda não foram compilados os dados referentes às doenças que afetam os suínos. Desta forma, acreditamos ser oportuno determinar as enfermidades, podendo auxiliar os clínicos no diagnóstico. Além do mais, a partir deste estudo será possível propor medidas de prevenção e controle. Portanto, a tese objetiva-se descrever os principais aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da toxoplasmose aguda em suínos causada por *Toxoplasma gondii* genótipo Chinese 1 (Artigo 1), varíola em suínos (Artigo 2) e demodicose suína (Artigo 3).

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA - ABIPECS. Estatísticas 2014. Disponível em: <http://www.abipecs.com.br/>. Acesso em: 12 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE SUÍNOS - APCS. Estatísticas 2014. Disponível em: <http://www.apcs.com.br/portal/>. Acesso em: 12 jun. 2015.

Brum, J.S., Konradt, G, Bazzi, T., Fighera, R.A., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., & Barros, C.S.L. (2013). Características e frequência das doenças de suínos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(10), 1208-1214.

Ciacchi-Zanella, J.R. Schaefer, R., Klein, C.S., Silva, V.S., Caron, L. & Piovezan D. (2011). Diagnóstico, caracterização molecular e estudos da patogenia de agentes infecciosos de importância econômica para a suinocultura brasileira. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 58-58.

Frade, M.T.S. Amebíase Sistêmica e Toxoplasmose associadas à Cinomose em Cães no Semiárido da Paraíba. Universidade Federal de Campina Grande. 2014. 56p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Patos, Paraíba.

Galiza, G.J.N., Silva, M.L.C.R., Dantas, A.F.M., Simões, S.V.D., & Riet-Correa, F. (2010). Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(3), 267-276.

Guedes, K.M.R., Riet-Correa, F., Dantas, A.F.M., Simões, S.V.D., Miranda Neto, E.G., Nobre, V.M.T., & Medeiros, R.M.T. (2007). Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27(1), 29-38.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, 2012. v.40, p.1-71.

Pimentel, L.A., Oliveira, D.M., Galiza, G.J.N., Rego, R.O., Dantas, A.F.M. & Riet-Correa, F. (2009). Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(7), 589-597.

Ribeiro, T. C. F. S. Aspectos produtivos da suinocultura e estudo epidemiológico da brucelose suína na Região Metropolitana de Natal, RN. 2005. 64 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

Silva Filha, O. L., Barbosa, E. J. R., Lima, A. D., Melo, A. G. P., Melo Filho, A. J. Sá, M. S. (2011). Os produtores de suínos no município de Floresta, Estado de Pernambuco, Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, [S.l.], v. 1, p. 416-418.

CAPÍTULO I

Toxoplasmose aguda em suínos no Brasil causada por *Toxoplasma gondii* genótipo Chinese 1

Roberio G. Olinda, Hilda F. J. Pena, Maria Talita S. Frade, Jefferson da Silva Ferreira,
Lisanka Â. Maia, Antônio Flávio M. Dantas, Solange M. Gennari, Solange Oliveira, Franklin
Riet-Correa

Trabalho publicado na revista Parasitology Research

Toxoplasmose aguda em suínos no Brasil causada por *Toxoplasma gondii* genótipo Chinese 1

Roberio G. Olinda¹, Hilda F. J. Pena², Maria Talita S. Frade¹, Jefferson da Silva Ferreira¹,
Lisanka Â. Maia¹, Antônio Flávio M. Dantas¹, Solange M. Gennari², Solange Oliveira²,
Franklin Riet-Correa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Hospital Veterinário, Laboratório de Patologia Veterinária, Av. Universitária, S/N, Bairro Santa Cecília, 58708-110, Patos, PB, Brasil. Telefone: +55 8334239523. E-mail: rgumes@hotmail.com

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ / USP), Avenida Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo-SP, 05508-900, Brasil.

RESUMO

Este trabalho relata os achados clínico-patológicos, imuno-histoquímicos e a caracterização molecular em dois casos de toxoplasmose sistêmica em suínos no Brasil. Os suínos apresentavam histórico de apatia e dispneia. Ao exame post-mortem, observou-se pneumonia broncointersticial, necrosante, difusa, acentuada e com numerosos taquizoítos de *T. gondii* intralesional. Os pulmões estavam não colapsados, difusamente avermelhados e no parênquima foram observados múltiplos nódulos de necrose caseosa. Os achados histopatológicos compreenderam inflamação mononuclear e áreas multifocais de necrose em septos alveolares (casos 1 e 2). Adicionalmente, foi visto também esofagite e ulcerações na mucosa do estômago, intestino delgado e grosso (caso 1). A imuno-histoquímica, realizada com anticorpo anti-*T. gondii* em tecido pulmonar nos dois casos revelou forte imunomarcagem de taquizoítos livres e no citoplasma de histiócitos, assim como nos cistos. A nested PCR tendo como alvo um fragmento de 155pb do gene B1 de *T. gondii* foi positiva para o DNA extraído de fragmentos de pulmão dos dois suínos. A genotipagem das amostras por meio de PCR-RFLP (10 marcadores) e por meio de microssatélites (15MS) revelou que os animais foram infectados com *T. gondii* caracterizado molecularmente como genótipo não-arquétipo Chinese 1, que apresenta circulação mundial, mas pela primeira vez é descrito no Brasil. O estudo de microssatélites mostrou que os animais foram infectados pelo mesmo isolado de *T. gondii* circulante no ambiente.

Palavras-Chave: *Toxoplasma gondii*, suínos, toxoplasmose aguda, genotipagem, chinesa 1, Brasil

INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que é um coccídio intracelular obrigatório. As características biológicas e genótípicas das amostras de *T. gondii* têm sido amplamente estudadas nos últimos quinze anos, com importância significativa para o conhecimento da estrutura populacional do agente, da patogenicidade e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas. Na América do Sul, *T. gondii* apresenta uma ampla diversidade genética (Ajzenberg et al., 2004; Pena et al., 2008; Shwab et al., 2014) que contrasta com a diversidade limitada no Hemisfério Norte e Europa, onde particularmente predominam as linhagens arquetípicas denominadas Tipos I, II e III (Howe; Sibley, 1995; Ajzenberg et al., 2002) e estudos recentes também apontam para uma diversidade mais limitada do parasita na Ásia (Shwab et al., 2014). As linhagens predominantes no Brasil são os tipos BrI, BrII e BrIII (Pena et al., 2008, Shwab et al., 2014), mas, especificamente no Nordeste do Brasil, o genótipo #13 através de RFLP (polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição) é o mais prevalente (Shwab et al., 2014).

Os suínos podem ser uma fonte importante de infecção por *T. gondii* para os humanos (Feitosa et al., 2014). No Brasil, muitos estudos sorológicos recentes demonstraram a infecção por *T. gondii* em suínos em diferentes regiões do país. No Nordeste do Brasil, Azevedo et al. (2010) e Feitosa et al. (2014) relataram seroprevalência de 36,2 e 19,5%, respectivamente, no Estado da Paraíba, enquanto Samico Fernandes et al. (2012) reportaram 12,5% no Estado de Pernambuco. Na região Sudeste, foi reportado a prevalência de 7,6% no Estado do Rio de Janeiro (Luciano et al., 2011) e na região Centro-Oeste, Muraro et al. (2010) relataram soropositividade de 12,8% nos suínos do Estado de Mato Grosso. Na grande maioria desses casos, a infecção era subclínica (Feitosa et al., 2014).

Toxoplasmose aguda em suínos é considerada rara, existindo relatos em neonatos (Thiptara et al., 2006) e em leitões desmamados (Liao et al., 2006; Klein et al. 2010). Macroscopicamente, a lesão predominante é a necrose, especialmente no cérebro, pulmão, fígado e nos linfonodos mesentéricos. Nos pulmões, as lesões consistem de focos nodulares branco-acinzentados de tamanhos variáveis observados no espaço subpleural e no parênquima. No exame histopatológico, observam-se taquizoítos intracelulares nas áreas

necróticas e reação inflamatória predominantemente constituída por células mononucleares (Jones et al., 2000). O objetivo deste estudo é relatar os achados clínico-patológicos, imuno-histoquímicos e a caracterização molecular em dois casos de infecção sistêmica por *T. gondii* em suínos no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos Suínos

Os dois suínos estudados eram procedentes de pequenas propriedades localizadas na cidade de Patos, Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil (S 7°4'4.30", W 37°16'49.90" e altitude de 221 m). Nas duas propriedades as criações de suínos eram uma atividade de subsistência familiar, distantes a 20 km uma da outra.

Análise clínico-patológica

Os sinais clínicos e a evolução da doença foram descritos nas fichas clínicas enviadas ao Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) em Patos. Os dois animais foram necropsiados e fragmentos de fígado, rim, coração, pulmão, linfonodos, estômago, baço, pâncreas, intestino e sistema nervoso central foram coletados, fixados em formol tamponado a 10% e processados rotineiramente pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para exame histopatológico e coloração de ácido periódico Schiff (PAS) e de metenamina nitrato de prata de Grocott (GMS). Fragmentos de pulmões dos casos 1 e 2 foram congelados a -80°C para realização de estudos moleculares.

*Imuno-histoquímica para *T. gondii**

A imuno-histoquímica foi realizada em fragmentos de pulmões dos suínos (casos 1 e 2). As lâminas foram desparafinadas. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3%. A recuperação antigênica foi realizada com a imersão das lâminas em solução tampão citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas em potência máxima. Utilizou-se anticorpo primário policlonal anti-*T. gondii* na diluição de 1:100, a temperatura de 37 °C por 1 hora. A IHQ foi realizada pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB+System-HRP, Dako). A revelação foi procedida com o cromógeno diaminobenzidina (DAB; Dako), lavados e contracorados com

hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi utilizado fragmentos de encéfalo de canino com imunomarcção positiva para *T. gondii*.

Caracterização Molecular

Após o descongelamento, as amostras de pulmão foram maceradas em solução salina a 0,85% e alíquotas de 300µL de todos os homogeneizados foram separadas para extração de DNA. Primeiramente, as alíquotas foram lavadas três vezes em tampão Tris-EDTA (q.s.p. 1500µL), pH 8.0 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), centrifugando-se a 12000 x g por 5 min. Utilizou-se então o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue kit, Qiagen, no formato “spin-column”, de acordo com as instruções do fabricante.

Para a detecção molecular do agente, utilizou-se a PCR tendo como alvo um fragmento de 155-pb do gene B1. Os primers utilizados na PCR primária foram T1-Fext (5'-AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA-3') e T2-Rext (5'-TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT-3'); os primers usados para a nested-PCR foram T3-Fint (5'-TGGGAATGAAAGAGACGCTAATGTG-3') e T4-Rint (5'-TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG-3') (Yai et al., 2003). As reações e condições de ciclo também foram realizadas como descrito previamente por Yai et al. (2003). Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de taquizoítos da amostra de referência RH de *T. gondii*.

A caracterização genotípica foi primeiramente feita por meio de nested PCR-RFLP, utilizando-se os marcadores SAG1, 5'3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1, L358 e Apico (Su et al., 2006; Dubey et al., 2007). As sequências de primers, mix de PCRs, condições de ciclo e endonucleases foram previamente descritas (Su et al., 2006; Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008; Su et al., 2010). As amostras arquétipas de referência RH (Type I), PTG (Type II) e CTG (Type III) e não-arquétipas TgCgCa1, MAS e TgCatBr5 foram incluídas em todas as reações como controles positivos (Fig.1).

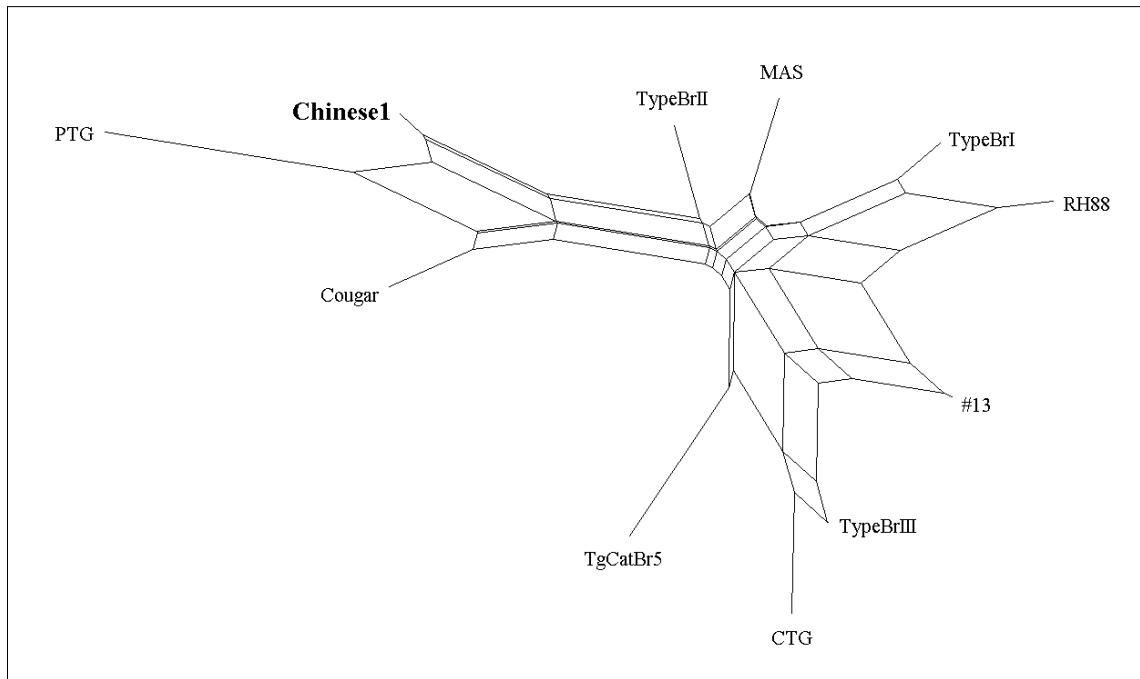


Fig. 1 – Análise de rede filogenética de *Toxoplasma gondii* de cepas de referência (RH = Tipo I; PTG = Tipo II; CTG = Tipo III; MAS = Tipo BrIV; Cougar = genótipo RFLP # 66 e TgCatBr5 = genótipo RFLP # 19); Os genótipos RFLP mais frequentes encontrados no Brasil (Tipos BrI, BrII e BrIII); O genótipo RFLP mais frequente encontrado na região Nordeste do Brasil (genótipo RFLP # 13) e o genótipo chinês 1 (genótipo RFLP # 9).

Para aumentar a resolução do resultado obtido na nPCR-RFLP, foi realizada também a genotipagem utilizando 15 marcadores microssatélites (MS) em único ensaio multiplex conforme previamente descrito por Ajzenberg et al. (2010). A análise dos resultados foi feita no Programa GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems).

RESULTADOS

Caso 1: suíno macho, quatro meses de idade, sem raça definida e com escore corporal ruim, proveniente de criação de subsistência. Este animal apresentou histórico de apatia, anorexia, dispneia, fraqueza muscular e episódios de diarreia. Morreu após cinco dias do início dos sinais clínicos. Além desse caso-estudo, mais dois animais na propriedade apresentaram o mesmo quadro e vieram a óbito, o que poderia caracterizar a ocorrência de um surto.

Caso 2: suíno macho, um mês de idade, sem raça definida. O animal apresentava histórico de apatia, dispneia e perda de peso e morreu após quatro dias do início dos sinais clínicos.

Os animais dos casos 1 e 2 eram alimentados com farelo de milho e sobras de comida caseira. Foi informado que os animais tinham contato com felinos domésticos e não existia um programa sistemático de desverminação e vacinação nestas criações de subsistências.

Macroscopicamente, nos casos 1 e 2, as lesões nos pulmões eram similares. Estes estavam não colapsados, difusamente avermelhados, com áreas firmes, que evidenciava nódulos subpleurais distribuídos multifocais a coalescentes, brancos e friáveis, 0,5-1,0 cm de diâmetro (Fig. 2A). No caso 1, pseudomembranas esbranquiçadas foram evidenciadas em uma área focalmente extensa na mucosa do esôfago, e áreas de ulcerações com distribuição multifocal foi observada na mucosa do estômago, intestino delgado e grosso.

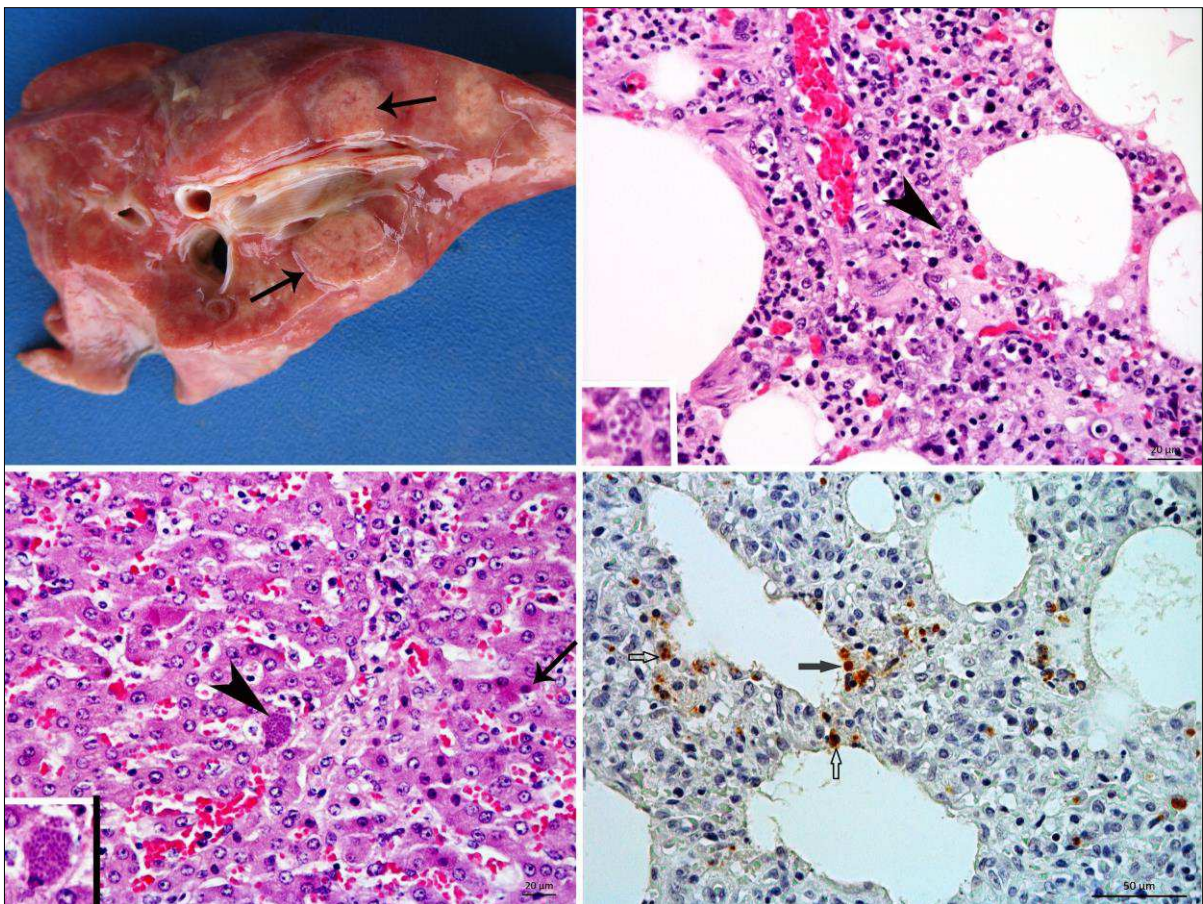


Fig. 2 - Lesões macroscópicas e histológicas de toxoplasmose sistêmica aguda em suínos. (A) A superfície de corte do pulmão é redundada de forma difusa com nódulos esbranquiçados com um diâmetro de 0,5-1,0 cm (setas). (B) Espessamento difuso dos septos alveolares causados por infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas. Os taquizoítos são observados no citoplasma de macrófago alveolar (ponta de seta; no detalhe). HE, bar = 20 μ m. (C) Fígado com bradizoítos de *T. gondii* no citoplasma de um hepatócito (ponta de flecha e inserção). Necrose individual de hepatócitos também é observada (seta); HE, bar = 20 μ m. (D) Pulmão com imunomarcagem forte de taquizoítos livres (seta vazia) nos septos alveolares, citoplasma de macrófagos, brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos. Também é observado imunomarcagem de bradizoítos em septos alveolares (seta). Streptavidina-biotina-peroxidase (IHQ), bar = 50 μ m.

Os achados histopatológicos, nos pulmões dos casos 1 e 2, foram caracterizados por espessamento marcado e difuso dos septos alveolares por infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de áreas multifocais a coalescentes de necrose de septos alveolares e de epitélio de bronquíolos. No caso 2, havia predomínio de neutrófilos, em sua grande maioria degenerados, e macrófagos espumosos espessando os septos alveolares, e na luz de bronquíolos e nos espaços alvéolos associados à fibrina. Nos dois casos, foram visualizadas miríades de estruturas alongadas fortemente basofílicas, isoladas ou em grupos, nos septos alveolares, citoplasma de macrófagos (Fig. 2B), endotélio vascular e em epitélio respiratório. Ocasionalmente, foram observados agregados, delimitados por fina parede, compatíveis com cistos de *T. gondii*, com 6-14 μ m de diâmetro.

Também, no caso 1, havia áreas multifocais com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, principalmente ao redor de ductos, vasos sanguíneos e, áreas de necrose com distribuição multifocal eram evidenciadas no pâncreas. No esôfago, observaram-se hiperplasia na mucosa e degeneração balonosa no estrato espinhoso. Há múltiplas áreas de necrose e infiltrado inflamatório intracorneal de neutrófilos associados a miríades de estruturas leveduriformes de parede fina ovoide medindo de 4-5 μ m de diâmetro, e pseudo-hifas cilíndricas e septadas, de aproximadamente 3 μ m de largura por 50 μ m de comprimento, com parede fina e levemente basofílica corada por hematoxilina e eosina. Através da coloração de PAS e GMS evidenciaram-se estruturas fúngicas compatíveis com *Candida* spp.

No epitélio da mucosa do estômago e no intestino havia áreas multifocais de ulceração e severa gastrite e enterite linfocítica e necrosante, além de numerosos trofozoítos entre os focos de necrose. Há ainda na superfície da mucosa, miríades bacterianas. Os Linfonodos apresentavam hiperplasia linfoide moderada e focos de necrose multifocais e discretos. No fígado, foi evidenciado infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos no espaço porta e ao redor da veia centrolobular, além de bilestase discreta.

No caso 2 observaram-se áreas de necrose hepatocelular aleatória (Fig. 2C) com distribuição multifocal associada à presença de taquizoítos intralesionais, e adjacentes aos focos de necrose havia cistos de bradizoítos no interior do citoplasma de hepatócitos (Fig. 2C). No espaço periportal há moderado infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e escassos eosinófilos. Nos rins foi observada nefrite intersticial mononuclear, multifocal discreta.

Na IHQ realizada em fragmentos de pulmões dos dois animais para *T. gondii*, houve forte imunomarcagem dos taquizoítos livres nas áreas de necrose dos septos alveolares, no

citoplasma de macrófagos, em brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos. Adicionalmente foi observada também imunomarcção de cistos em septos alveolares. Nestes suínos as lesões histológicas foram evidenciadas principalmente nos pulmões, fígado e no trato gastrointestinal pela visualização dos parasitas intralésionais, e através da IHQ anti-*T. gondii* em pulmões observaram-se imunomarcção de taquizoítos e cistos (Fig.1D).

As amostras analisadas foram positivas para *T. gondii* por meio da nPCR. A genotipagem RFLP completa das amostras dos dois animais foi obtida, observando-se os seguintes alelos: *SAG1* = u-1, *SAG2* = II, *alt.SAG2* = II, *SAG3* = III, *BTUB* = III, *GRA6* = II, *c22-8* = II, *c29-2* = III, *L358* = II, *PK1* = II, *Apico* = I. Na análise de 15 MS, que tem um poder de resolução maior que a PCR-RFLP (Ajzenberg et al., 2010), as duas amostras apresentaram exatamente a mesma combinação de alelos, confirmando que os dois suínos foram infectados com o mesmo isolado de *T. gondii*. As amostras foram denominadas PS-TgPigBrPB1 e PS-TgPigBrPB2. O principal meio de infecção entre os suínos é a ingestão de oocistos através de água e alimentos contaminados, juntamente com tecidos contaminados por cistos. No presente estudo, não foi possível determinar a fonte de infecção, mas em ambas as fazendas, os animais eram alimentados com restos de comida que vieram de restaurantes da cidade.

DISCUSSÃO

Em ambos os casos, os achados macroscópicos e microscópicos, incluindo necrose em fígado, pulmão, linfonodos mesentéricos e trato gastrointestinal, foram semelhantes aos relatados na toxoplasmose em suínos (Liao et al. 2006; Klein et al. 2010). Nestas lesões, a observação de taquizoítos de *T. gondii*, livres ou dentro de macrófagos, e com a imunomarcção de tais estruturas indica que foi uma infecção aguda (Jones et al. 2000). A técnica de imuno-histoquímica tem demonstrado ser um método adequado para o diagnóstico de toxoplasmose clínica em animais domésticos e selvagens, devido à elevada acurácia (Gonzales-Viera et al. 2013; Casagrande et al. 2015).

O genótipo não-arquétipo identificado corresponde a ToxoDB RFLP-Genotype #9, que é o mais comumente encontrado no Leste da Ásia, particularmente na China e por isso também conhecido como Chinese 1 (Shwab et al., 2014). No entanto, é um genótipo de circulação mundial, já encontrado também no México (Alvarado-Esquivel et al., 2011; Dubey et al., 2009), Estados Unidos (Dubey et al., 2008; Dubey et al., 2011) e na Colômbia (Dubey

et al., 2007b) em diferentes hospedeiros, incluindo suínos, sem associação confirmada com doença clínica, e em um caso de toxoplasmose humana (Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2010).

É a primeira vez que este genótipo é reportado no Brasil, corroborando mais uma vez a diversidade genética do parasita no país. Em 2007, Dubey et al. (2007) descreveram um isolado de galinha caipira (TgCkBr116) do estado do Pará, Norte do Brasil, com genótipo muito próximo ao encontrado neste estudo, com apenas um marcador (c29-2), sem sucesso na amplificação, para confirmar a mesma identidade. No presente estudo, este genótipo foi associado a quadro de toxoplasmose aguda em suínos. A identificação do genótipo do parasita envolvido nos casos confirmados de toxoplasmose clínica assume atualmente uma grande importância, já que o genótipo de *T. gondii* pode ser um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da doença, além da dose infectante, via de infecção, estágio do parasita e estado imune do hospedeiro.

Adicionalmente, o fato de a doença ter ocorrido em duas fazendas familiares, em que os suínos eram alimentados com restos de comida oriunda de restaurantes da cidade, sugerem um risco significativo para a saúde humana. Além disso, geralmente os suínos dessas fazendas são abatidos sem inspeção veterinária e consumidos localmente pela família ou outras famílias da região.

Nessas pequenas fazendas de suínos, o estabelecimento de medidas de biossegurança é essencial para prevenir a infecção por *T. gondii* de animais e do homem. É necessário evitar o acesso de gatos domésticos e selvagens ao ambiente dos suínos e controlar os roedores, pois são potenciais reservatórios de *T. gondii* e podem contaminar alimentos e água com oocistos. Para evitar a alimentação de suínos com restos de alimentos caseiros e alimentos de restaurantes devem-se cozinhar adequadamente esses resíduos antes do uso deles como alimento para suínos, também são medidas importantes para evitar a infecção. Além disso, as pessoas devem evitar o consumo de carne malcozida ou seus subprodutos produzidos nessas pequenas propriedades familiares.

REFERÊNCIAS

- Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML (2002) Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32:27–38
- Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B, Dardé ML (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 34:1185–1196

- Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML (2010) Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 48:4641–4645
- Alvarado-Esquivel C, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Choudhary S, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Villena I, Dubey JP (2011) Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *J Parasitol* 97:809–812
- Azevedo SS, Pena HFJ, Alves CJ, Guimaraes Filho AAM, Oliveira RM, Maksimov P, Schares G, Gennari SM (2010) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 19:1–5
- Casagrande RA, Pena HFJ, Cabral AD, Rolim VM, Oliveira LGS, Boabaid FM, Wouters ATB, Wouters F, Cruz CEF, Driemeier D (2015) Fatal systemic toxoplasmosis in Valley quail (*Callipepla californica*). *Int J Parasitol Parasites Wildl* 4:264–267
- Dubey JP, Cortés-Vecino JA, Vargas-Duarte JJ, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LM, Polo LJ, Zambrano L, Mora LE, Kwok OCH, Smith T, Su C (2007a) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet Parasitol* 145:45–50
- Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AHH, Farias NAR, Ruas JL, Santos TRB, Cavalcante GT, Kwok OCH, Su C (2007b) Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet Parasitol* 143:182–188
- Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OCH, Majumdar D, Su C (2008) High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol* 38:999–1006
- Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Martínez-García S, González-Herrera A, Ferreira LR, Kwok OC, Su C (2009) Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *J Parasitol* 95:319–322
- Dubey JP, Velmurugan GV, Rajendran C, Yabsley MJ, Thomas NJ, Beckmen KB, Sinnott D, Ruid D, Hart J, Fair PA, McFee E, Shearn-Bochsler V, Kwok OCH, Ferreira LR, Choudhary S, Faria EB, Zhou H, Felix TA, Su C (2011) Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol* 41:1139–1147

- Feitosa TF, Vilela VL, Melo LR, Almeida Neto JL, Souto DV, Morais DF, Athayde AC, Azevedo SS, Pena HF (2014) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Vet Parasitol* 28:305–309
- Gonzales-Viera O, Marigo J, Ruoppolo V, Rosas FC, Kanamura CT, Takakura C, Fernandez A, Catão-Dias JL (2013) Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Parana, Brazil. *Vet Parasitol* 191:358–362
- Howe DK, Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172:1561–1566
- Huson DH (1998) Splits Tree: a program for analysing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14:68–73
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23:254–267
- Jones TC, Hunt RD, King NW (eds) (2000) *Veterinary pathology*, 6th edn. Williams & Wilkins, Baltimore
- Klein S, Wendt SM, Baumgärtner W, Wohlsein P (2010) Systemic toxoplasmosis and concurrent porcine circovirus-2 infection in a pig. *J Comp Pathol* 142:228–234
- Liao SQ, Weng YB, Song HQ, Yang AB, Cui JX, Zhang H, Zhu XQ (2006) Diagnosis of swine toxoplasmosis by specific PCR assay and the isolation of *Toxoplasma gondii* strains. *J Trop Med* 6:969–971
- Luciano DM, Menezes RC, Ferreira LC, Nicolau JL, Neves LB, Luciano RM, Dahroug MAA, Amendoeira MRR (2011) Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet* 20:351–353
- Muraro LS, Caramori Júnior JG, Amendoeira MMR, Pereira JA, Oliveira Filho JX, Vicente RT, Neves LB, Nicolau JL, Igarashi M, Moura ST (2010) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum e Diamantino, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 19:254–255
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C (2008) Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 38:561–569
- Samico Fernandes EF, Samico Fernandes MF, Kim PC, Albuquerque PP, Souza Neto OL, Santos S, Moraes EP, Morais EG, Mota RA (2012) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. *J Parasitol* 98:690–691
- Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C (2014) Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141:453–461

- Su C, Zhang X, Dubey JP (2006) Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36:841–848
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP (2010) Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137:1–11
- Thiptara A, Kongkaew W, Bhumibhamon T, Bilmad U, Anan S (2006) Toxoplasmosis in piglets in southern Thailand. *Ann N Y Acad Sci* 1081:336–338
- Yai LEO, Vianna MCB, Soares RM, Cortez A, Freire RL, Richtzenhain LJ, Gennari SM (2003) Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. *Braz J Vet Res Anim Sci* 40:227–234
- Zhou P, Zhang H, Lin RQ, Zhang DL, Song HQ, Su C, Zhu XQ (2009) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitol Int* 58:193–195
- Zhou P, Nie H, Zhang LX, Wang HY, Yin CC, Su C, Zhu XQ, Zhao JL (2010) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in China. *J Parasitol* 96:1027–1029

CAPÍTULO II

Variola em suínos no Nordeste do Brasil

Roberio G. Olinda, Lisanka A. Maia, Juliana F. Cargnelutti, Rayr C.S. Gois, Jael S. Batista,
Antônio F.M. Dantas, Eduardo F. Flores e Franklin Riet-Correa

Trabalho publicado na Pesquisa Veterinária Brasileira

Varíola em suínos no Nordeste do Brasil¹

Roberio G. Olinda¹, Lisanka A. Maia¹, Juliana F. Cargnelutti², Jael S. Batista³, Antônio F. M. Dantas¹, Eduardo F. Flores², Franklin Riet-Correa^{1*}

¹Veterinary Hospital, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Federal University of Campina Grande, Campus de Patos, Patos, PB, 58700-000, Brazil. *Corresponding author: franklin.riet@pq.cnpq.br

²From the Setor de Virologia, Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota 572, Presidente Costa e Silva, 59.625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte.

RESUMO

Surtos de doença vesicular causadas por vírus da família Poxviridae tem sido relatadas em animais de produção diversos estados do território brasileiro. Este artigo descrever os achados epidemiológicos, clínico-patológicos e moleculares de surtos de infecção pelo vírus da varíola suína na região semiárida do Nordeste, Brasil. Cinco surtos de varíola provocada por SWPV ocorridos em rebanhos suínos em dois municípios do estado do Rio Grande do Norte (2008-2014), com o envolvimento de 120 animais, entre adultos e jovens. A taxa de morbidade geral e mortalidade dos leitões variaram de 33-100% e 0-60% respectivamente. Os sinais clínicos iniciaram com pápulas cinzentas ou esbranquiçadas coalescentes e vesículas que geralmente evoluíram a lesões crostosas, e em alguns casos havia úlceras. O curso clínico aproximado de 15 a 25 dias. Macroscopicamente, foram observados pápulas, pústulas avermelhadas, por vezes recobertas por crostas, afetando mais gravemente as orelhas, região periocular,

abdômen e membros torácicos e pélvicos. Histologicamente, observou-se dermatite proliferativa e ulcerativa com degeneração balonosa das células do epitélio, com inclusões virais eosinofílicas no citoplasma de queratinócitos. No surto cinco em fragmentos de pele submetido a PCR foi amplificado um produto de aproximadamente 540pb e confirmado por sequenciamento e análise filogenética para SWPV. O diagnóstico da infecção pelo SWPV foi realizado com base nos achados epidemiológicos e clínico-patológicos, e foi confirmado pelo exame virológico. Esses resultados confirmam a circulação do SWPV nas criações de suínos na região Nordeste, salientando para necessidade de diagnóstico acurado e adoção de medidas profiláticas e de controle para reduzir as perdas econômicas.

INTRODUÇÃO

A varíola suína é uma doença vesículo-pustular, de ocorrência mundial, e que acomete especificamente os suínos (Afonso et al. 2002). É causada pelo vírus *Swinepox*, pertencente ao gênero *Suipoxvirus* da família *Poxviridae* (ICTV, 2013). Os animais doentes apresentam lesões progressivas e normalmente generalizadas na pele, caracterizadas inicialmente por áreas puntiformes eritematosas que progridem para pápulas, vesículas e pústulas amareladas que eventualmente originam crostas que se desprendem deixando uma zona cicatricial em torno de 15 a 20 dias (Barcellos& Oliveira, 2012). Entretanto, em animais criados em instalações com baixa qualidade higiênica, geralmente predis põem a infecções secundárias bacterianas e parasitárias (Bersano et al. 2003, Medaglia et al. 2011).

Embora a mortalidade seja relativamente baixa, a ocorrência da infecção em um rebanho afetado pode chegar a 100%. Os animais acometidos são principalmente os leitões, que apresentam sinais clínicos mais severos do que os animais adultos (Bersano et al. 2003). A disseminação da infecção no rebanho é rápida e pode ocorrer pelo contato direto entre animais ou pelo contato com vetores mecânicos, como os piolhos e as moscas que ficam no ambiente das instalações com condições sanitárias precárias (Medaglia et al. 2011).

Em geral, as lesões mais graves em infecção por poxviroses em animais de produção estão restritas ao envolvimento da pele. No Brasil já foram relatos casos de poxvírus em bovinos causadas pelo vírus *Vaccinia* (Sant'Ana et al. 2013) e pelo vírus da pseudovariola e estomatite papular (Cargnelutti et al. 2014). Também foram relatados casos em caprinos e ovinos pelo *Parapoxvirus* (Nóbrega et al. 2008; Macêdo et al., 2008), e em equinos por *Orthopoxvirus* (Brum et al. 2010). No Brasil, embora já tenham sido relatados casos de varíola suína (Bersano et al. 2003, Medaglia et al. 2011), existem poucas informações sobre surtos de *Swinepox*, e na região Nordeste não há relato desta doença. Desta forma, o presente artigo teve por objetivo descrever os achados epidemiológicos, clínico-patológicos e moleculares de surtos de infecção pelo vírus da varíola suína na região semiárida do Nordeste, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

As informações incluídas neste estudo foram obtidas através de um levantamento dos casos de varíola diagnosticados em suínos pelo Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande - PB. Foram realizadas visitas às fazendas de criação de suínos no Estado do Rio Grande do Norte, onde ocorreram os surtos para coletar as informações referentes aos principais dados epidemiológicos e os sinais clínicos.

Fragmentos de pele com lesões crostosas foram coletadas (surtos 1, 2, 3 e 5), fixados em formol tamponado a 10%, processados rotineiramente, cortados em secções de 5 µm e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para exame histopatológico.

Fragmentos de pele coletados de lesões vesículo-pustulares de suínos afetados (surto 5) foram submetidos ao isolamento em cultivo celular e à extração de DNA e reação de polimerase em cadeia (PCR) para o vírus da varíola suína (*Swinepox virus*, SWPV). Para o isolamento em cultivo celular, aproximadamente 50mg do tecido foi macerado e ressuspensão

em meio essencial mínimo e antibiótico (10% peso: volume). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada (3000 rpm, 10 min, 4°C) e inoculada em células de linhagem de suíno (PK-15), incubadas em estufa com 5% de CO₂ e monitoradas diariamente por 96 horas. Na ausência de efeito citopático o material foi repassado por três vezes em novos cultivos de PK-15.

A extração de DNA foi realizada com fenol e clorofórmio (Vogel et al. 2003). O DNA total obtido na extração foi diluído em água ultrapura e submetido ao teste de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um segmento de 543pb do gene da DNA polimerase viral (Bracht et al., 2006). A cepa Kasza de SWPV (gentilmente cedida pela Dra. Clarissa Damaso, UFRJ) foi utilizada como controle positivo na reação de PCR. As amostras positivas na PCR foram purificadas e submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos.

As sequências foram analisadas utilizando o programa Staden Package (Staden, 1996) e alinhadas no software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e comparadas com sequências de poxvírus depositadas no GenBank para verificar a identidade entre as sequências.

A árvore filogenética foi construída baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da DNA polimerase viral das amostras amplificadas (SV627/14 A e B) e de poxvírus pertencentes a todos os gêneros (Fig.1). A árvore foi construída no programa MEGA 5.0, utilizando o método *Neighbor-Joining*, com *bootstrap* de 1000 replicatas, sendo que as distâncias evolucionárias foram computadas utilizando o método *p-distance* (Tamura et al., 2011).

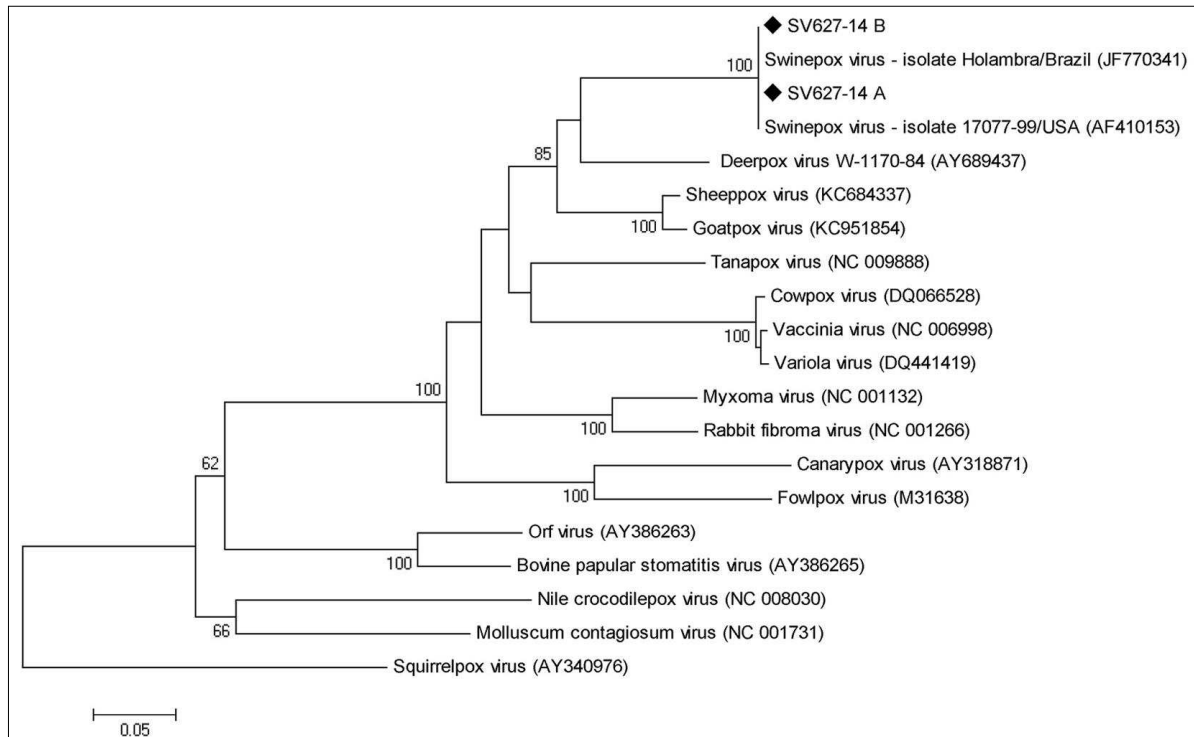


Fig.1. Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da DNA polimerase de diferentes gêneros da família *Poxviridae*: *Avipoxvirus* (números de acesso GenBank AY318871 e M31638), *Capripoxvirus* (KC684337 e KC951854), *Cervidpoxvirus* (AY689437), *Crocodylidpoxvirus* (NC008030), *Leporipoxvirus* (NC001132 e NC001266), *Molluscipoxvirus* (NC001731), *Orthopoxvirus* (DQ066528, NC006998 e DQ441419), *Parapoxvirus* (AY386263 e AY386265), *Suipoxvirus* (JF770341 e AF410153) e *Yatapoxvirus* (NC009888); o grupo externo foi composto pelo respectivo gene de *Squirrelpoxvirus* (AY340976). A árvore foi construída usando o método *Neigbohr-Joining* com 1.000 réplicas de *bootstrap* baseado no método de *p-distance* e implementado pelo MEGA 5.0. Valores >60% são mostrados. A amostra positiva para variola suína do presente relatório é identificada com um losango preto.

RESULTADOS

Os surtos foram diagnosticados em cinco propriedades dos municípios de Jucurutu e Felipe Guerra no Estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil, no período de 2008 a 2014. As lesões foram observadas inicialmente nos animais adultos, e se disseminaram para todos os leitões. Especialmente nos surtos 2 e 4, em que as criações eram próximas (3 a 4 km de distância) e tinham instalações higiênico-sanitária precárias (presença de piolhos e grande quantidade de moscas), os leitões foram severamente afetados, inclusive com

comprometimento dos olhos, pela formação de feridas crostosas, com consequente infecção por larvas de moscas e bactérias, causando cegueira e mortes.

Os sinais clínicos iniciaram com pápulas cinzentas ou esbranquiçadas coalescentes (2-10 mm de diâmetro) (Fig.2A) e vesículas que geralmente evoluíram a lesões crostosas, e em alguns casos havia úlceras (3-10mm de diâmetro), com curso clínico aproximado de 15 a 25 dias. Além das lesões cutâneas os leitões apresentaram apatia, anorexia e febre. A taxa de morbidade geral e mortalidade dos leitões variaram de 33-100% e 0-60% respectivamente. Os demais dados epidemiológicos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos surtos de varíola suína no Nordeste do Brasil.

Surto	Cidade/Estado	Mês/Ano	Faixa etária	Número	Morbidade (%)	Mortalidade (%) ^a
1	Jucurutu/RN	Agosto de 2008	2 - 6 meses	20	100	-
2	Felipe Guerra/RN	Julho de 2013	1 – 8 meses	40	100	60
3	Felipe Guerra/RN	Julho de 2013	4 – 6 meses	30	33.3	-
4	Felipe Guerra/RN	Julho de 2013	1 – 20 meses	35	65.7	55.5
5	Jucurutu/RN	Agosto de 2014	2 – 36 meses	22	100	-

^aTaxa de mortalidade foi calculado incluindo somente os leitões

Macroscopicamente, foram observados pápulas, pústulas avermelhadas, por vezes recobertas por crostas, afetando mais gravemente as orelhas (Fig.2B), região periocular, abdômen e membros torácicos e pélvicos, e moderadamente na região dorsal e lateral do flanco.

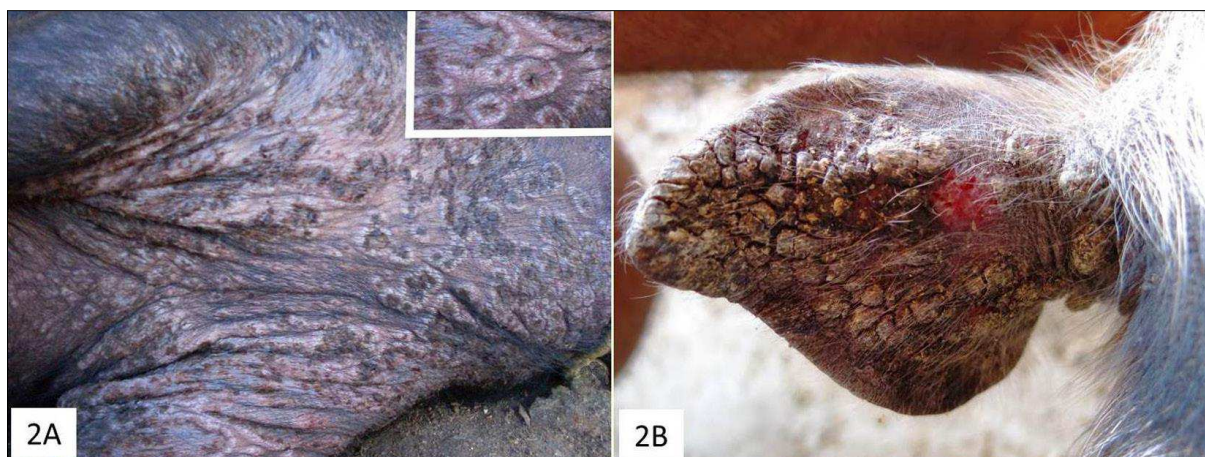


Fig.2. Achados macroscópicos da infecção pelo vírus da varíola suína em suínos. (A) Vesículas e pápulas multifocais a coalescentes no pescoço e membros anteriores. (B) Pavilhão auricular recoberto por crostas acentuadas.

O exame histológico revelou dermatite vesículo-pustulosa proliferativa e ulcerativa com degeneração balonosa das células epiteliais, espongirose, hipergranulose, hiperkeratose paraceratótica ou ortoceratótica e acantose (Fig.3A). Os corpúsculos de inclusões eram circulares, eosinofílicos e intracitoplasmáticos, medindo de 3-8 μ m de diâmetro foram consistentemente observados em queratinócitos, principalmente em áreas de formação de pústulas (Fig.3B). Úlceras focalmente extensas e coalescentes foram observadas. Congestão, hemorragia e infiltrado inflamatório perivascular de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e menos macrófagos foram observados na derme.

A inoculação em cultivo celular das amostras provenientes do surto 5 resultou negativa para efeito citopático após três passagens de cinco dias cada. Porém, no teste de PCR para o SWPV foi possível amplificar um produto de aproximadamente 540pb nas amostras SV627/14 A e B (surto 5), correspondente ao tamanho de banda observado no controle positivo. Após sequenciamento de nucleotídeos, as duas amostras apresentaram 100% de identidade entre elas, e também, com os isolados de SWPV 17077-99 [oriundo de Nebraska, EUA (Afonso et al., 2002) e Holambra [detectado no município de Holambra, São Paulo, Brasil] (Medaglia et al., 2011) depositados no GenBank. A identidade de nucleotídeos entre as amostras investigadas e poxvírus pertencentes a outros gêneros foi inferior a 81%.

A análise filogenética demonstrou que as amostras investigadas (SV627/14 A e B) agruparam juntamente com os isolados de SWPV 17077-99 e Holambra, indicando um ancestral comum. Por outro lado, as amostras SV627/14 A e B agruparam separadamente do vírus Vaccinia (VACV) que pode ser incluído no diagnóstico diferencial de SWPV, por causar lesões semelhantes em suínos.

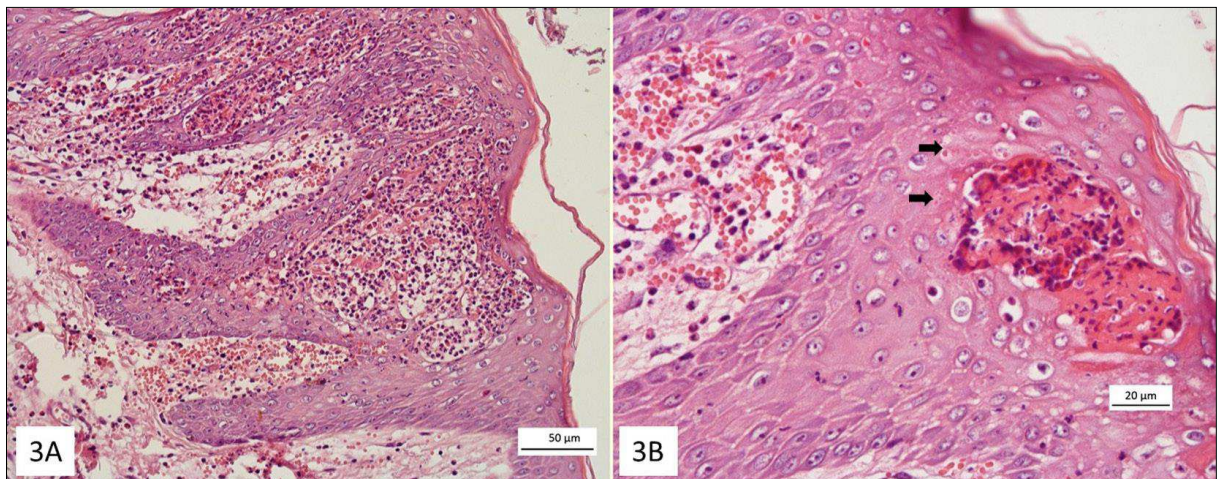


Fig.3. Lesões histológicas da infecção pelo vírus da varíola suína em suínos. (A) Dermatite pustulosa intraepidérmica grave HE, Bar=50µm. (B) Inclusões arredondadas, eosinofílicas, intracitoplasmáticas, com 3-8 µm de diâmetro (setas), são observadas próximas a uma pústula. HE, Bar=20µm.

DISCUSSÃO

O diagnóstico do vírus da varíola suína (SWPV) causado pelo *Swinepox* foi realizado com base nos achados epidemiológicos, clínico-patológicos e confirmado por exames moleculares. As informações disponíveis, na literatura relacionada à ocorrência de *Swinepox* em suínos são escassas no Brasil. Embora existam poucos dados, sabe-se que esta enfermidade tem ocorrência esporádica (Bersano et al. 2003).

Em criações de suínos infectados por poxvírus, as lesões de pele causadas pelos vírus *Vaccinia* e ou *Swinepox* são clinicamente indistinguíveis, e apresentam-se nas formas de lesões proliferativas e com aspectos ulcerados ou crostosos (Bersano et al. 2003, Medaglia et al. 2011). As evidências clínicas e patológicas sugeriram a possibilidade de um agente

etiológico da família Poxviridae. No entanto, somente com a realização dos testes moleculares foi que nos permitiram afirmarmos com acurácia que os surtos relatados neste estudo foram provocados pelo SWPV.

Outros agentes associados à doença vesículo-pustular em suínos (como o VACV) foram analisados pelos dados epidemiológicos (em que a doença foi observada somente na espécie suína) e clínico-patológicos, apesar de que às lesões macroscópicas e microscópicas relacionadas com a infecção por SWPV e VACV são semelhantes (Bersano et al. 2003, Sant'Ana et al. 2013). Posteriormente, descartada pelo exame de PCR para o vírus VACV, que tiveram resultado negativo. O estudo destes vírus, baseado nas lesões macroscópicas e histológicas são úteis para elaboração do diagnóstico morfológico, mas a confirmação virológica através de técnicas moleculares ou de isolamento é essencial para o diagnóstico definitivo.

Neste estudo foi verificada alta taxa de morbidade em todos os rebanhos. No entanto, a alta taxa de mortalidade foi observada exclusivamente na faixa etária dos leitões. Nesta idade a morbidade pode chegar a 100% (Barlow & Grist, 2000). E a taxa de mortalidade pode variar entre 14 a 50% (Beer, 1999). No presente estudo, verificou nos surtos 2 e 4, alta taxa de mortalidade, atribuíam esse alto índice, provavelmente a má higiene das instalações, associada à massiva infestação por ectoparasitas, que serviam de fômites a infecções oportunistas e conseqüentemente causando a morte destes leitões. As lesões provocadas por SWPV devem ser diferenciadas de doenças virais vesículo-pustulares, pitiríase rósea, dermatose vegetante, dermatite estreptocócica, dermatofitose e epidermite exsudativa dos suínos.

Os resultados do presente estudo demonstram que a infecção por SWPV está presente na região Nordeste do Brasil. Além disso, o estudo mostrou que a descrição dos achados clínico-patológicos detalhados associados aos aspectos epidemiológicos, e virológicos são

ferramentas de diagnóstico úteis para a confirmação da infecção SWPV em suínos, e também serviu para excluir a possibilidade de infecção por vírus VACV.

REFERÊNCIAS

- Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Osorio FA, Balinsky C, Kutish GF, Rocha DL. *Journal Virol*. The genome of swinepox virus. 76: 783-90, 2002.
- Barcellos D. & Oliveira S.J. 2012. Varíola suína. p.752-756. In: Sobestiansky J. & Barcellos D. (Eds), *Doenças dos Suínos*. 2ª ed. Cânone Editorial, Goiânia.
- Barlow, A.M. & Grist, C. An outbreak of congenital pig pox. *Pig. J. Proceed. Sec.* v.46, p.118-121, 2000.
- Beer, J. *Doenças infecciosas dos animais domésticos*. São Paulo: Roca, 1999. 394p.
- Bersano JG, Catroxo MH, Villalobos EM, Leme MC, Martins AM, Peixoto ZM, et al. Varíola suína: Estudo Sobre a Ocorrência de surtos nos estados de São Paulo e Tocantins, Brasil. *Arq Inst Biol (São Paulo)*. 70: 269-278, 2003.
- Bracht AJ et al. Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipeds. *Arch Virol*. 2006;151:423-38.
- Brum, M.C.S.; Anjos, B.L.; Nogueira, C.E.W.; Amaral, L.A.; Weiblen, R.; Flores, E.F. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.22, p.143-147, 2010.
- Cargnelutti, J.F.; Santos, B. S.; Lebre, S. N.; Sodre, D. N. A.; Silva, R. M.; Weiblen, R.; Flores, E. F. Pseudovaríola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*, v. 44, p.479-485, 2014.
- Medaglia, M.L.G.; Pereira, A.; Freitas, T.R.P.; Damaso, C. R. Swinepox Virus Outbreak, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, p.1976-1978, 2011.

- Nóbrega Jr J.E., Macêdo J.T.S.A., Araújo J.A.S., Dantas A.F.M., Soares M.P. & Riet-Correa F. 2008. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28:135-139.
- Sant'Ana, F. J. F.; Leal, F.A.A.; Rabelo, R.E.; Vulcani, V.A.S.; Ferreira Junior, J.; Cargnelutti, J.F.; Flores, E.F. Outbreaks of vesicular disease caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p.860-866, 2013.
- Staden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 1996; 5:233–241.
- Tamura K et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 2731-2739.
- Vogel FS et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4512-4520.

CAPÍTULO III

Demodicose Suína: Relato de Caso

Roberio Gomes Olinda, Millena de Oliveira Firmino, Raquel Annes Fagundes Silva, Jovanna Karine Pinheiro, Rodrigo Cruz Alves, Glauco José Nogueira de Galiza e Antônio Flávio Medeiros Dantas

Trabalho submetido na revista *Acta Scientiae Veterinariae*

Demodicose Suína: Relato de Caso

Swine Demodicosis: Case Report

**Roberio Gomes Olinda¹, Millena de Oliveira Firmino¹, Raquel Annes Fagundes Silva¹,
Jovanna Karine Pinheiro¹, Rodrigo Cruz Alves¹, Glauco José Nogueira de Galiza¹ &
Antônio Flávio Medeiros Dantas¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). CORRESPONDENCE: R.G. Olinda [rgumes@hotmail.com]. Av. Universitária s/n. CEP 58708-110 Patos, PB, Brazil.

ABSTRACT

Background: Demodicosis in swine is caused by the mite *Demodex phylloides*, mostly found in hair follicles and at sebaceous glands. The presence of these dust mites on the animals' skin causes important alterations, such as alopecia areas, abscesses, intense pruritus, peeling of the skin and appearance of nodules. This disease causes great economic losses because the injuries found in the skin and in internal organs results in the condemnation of pig meat for human consumption. *Demodex* mites can contaminate all domestic animal species, but records in the literature on their parasitism in swine are rather scarce because of their unusual occurrence. The aim of this study is to report a case of swine demodicosis in the semiarid region of Paraíba, Brazil.

Case: A 1-year-old swine with no defined breed was referred to the Veterinary Hospital of the University Federal of Campina Grande. The animal showed a thickening of the muzzle, multifocal to coalescent firm nodules associated with crusts and moderate alopecia. The lesions were concentrated in the lateral region of the thorax, of the abdomen, in all the limbs, head and ears. We performed an incisional biopsy of the affected area, and sent the tissue to the Laboratory of Animal Pathology for histological examination. Hair follicles were observed with marked distension in transverse and longitudinal sections by eosinophilic thin-walled arthropods, characterizing a chitosan exoskeleton and elongated abdomen with short articulated appendages and in its interior hemocele, striated muscle and reproductive apparatus, morphologically with the compatibilization of *Demodex phylloides*. Microscopic examination of the skin revealed multifocal areas of discrete to moderate inflammatory infiltrate consisting predominantly of lymphocytes, plasma cells, macrophages and occasional eosinophils. There were also multifocal areas of granulomas, consisting of macrophages, plasma cells, lymphocytes and numerous multinucleated giant cells in the superficial dermis. In the cytological examination, structures with three to four pairs of short legs, characterized by their typical form of cigar, were morphologically similar with *D. phylloides*.

Discussion: The diagnosis of demodicosis in this pig was based on macroscopic and microscopic findings, associated to parasitological examination. Parasitism by *Demodex phylloides* in pigs is considered atypical and is related to bad environmental, nutritional and sanitary conditions that result in morbidity and immunosuppression. The mites inhabit the hair follicles, but in some cases, can migrate to more distant sites, reaching the lymph nodes, causing a secondary infection, which can lead to death. Dermatitis caused by *D. phylloides* can compromise the growth of piglets, causing them to grow atrophied. Considering that this disease causes economic losses, it is necessary to have a better understanding about this disease, in order to provide better conditions of prevention and control.

Keywords: *Demodex phylloides*, demodicosis, swine, mites.

INTRODUÇÃO

Demodicose suína é uma doença parasitária considerada rara nesta espécie, sendo causada pelo ácaro *Demodex phylloides*, que abriga o folículo piloso e por vezes as glândulas sebáceas da pele destes animais [9]. A presença destes ácaros escavadores na pele dos animais, se em baixo número, não causa grandes danos e pode transcorrer sem sinais clínicos, porém em altas infestações, provocam importantes alterações, como áreas alopecias, abscessos, intenso prurido, descamação da pele e presença de nódulos, que podem variar de locais a sistêmicos [10,11]. Morfologicamente, *Demodex spp.* são geralmente conhecidos por seu formato semelhante à um “charuto”, seu corpo alongado e seus quatro pares de patas curtas e robustas [2].

Acredita-se que o desenvolvimento da demodicose está relacionado com a imunodepressão, estando os animais subnutridos mais vulneráveis, caracterizando um fator predisponente à infecção [7]. A transmissão desta enfermidade se dá através do contato direto entre os animais, e o parasita completa seu ciclo, que dura em média um mês, dentro do hospedeiro, porém ao sair dele, não sobrevive por mais de dois dias [4]. Os ácaros do gênero *Demodex* podem contaminar todas as espécies de animais domésticos, porém registros na literatura sobre seu parasitismo em suínos são bastante escassos, devido à sua incomum ocorrência [6]. Desta forma, o objetivo deste trabalho é relatar um caso de demodicose suína no semiárido da Paraíba, Brasil.

RELATO DE CASO

Um suíno, sem raça definida, com um ano e três meses de idade, foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, no mês de abril de 2017. Segundo informações do proprietário, o animal chegou a sua propriedade com mais de 6 meses de idade, já apresentando espessamento do focinho, e em cerca de 2 meses após sua chegada, as lesões nodulares tornaram-se difusas por todo o corpo. Foi relatado também que o

animal apresentava tais lesões há aproximadamente 10 meses e que convivia com outros animais contactantes, não vacinados, não vermifugados e sem tratamento prévio. Durante o exame clínico observaram-se nódulos multifocais a coalescentes, firmes, associados a crostas e moderada alopecia (Figura 1A). Quando manipulados, tais nódulos expeliam conteúdo semissólido de coloração amarelada, evidenciando secreção purulenta (Figura 1B). As lesões concentravam-se na região lateral do tórax, do abdômen, em todos os membros, cabeça e orelhas. Foi realizada biópsia incisional e retirado fragmento medindo 3,5x 1,9x 0,5cm de extensão contando margens da lesão e do tecido normal que foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Animal para realização de exame histopatológico.

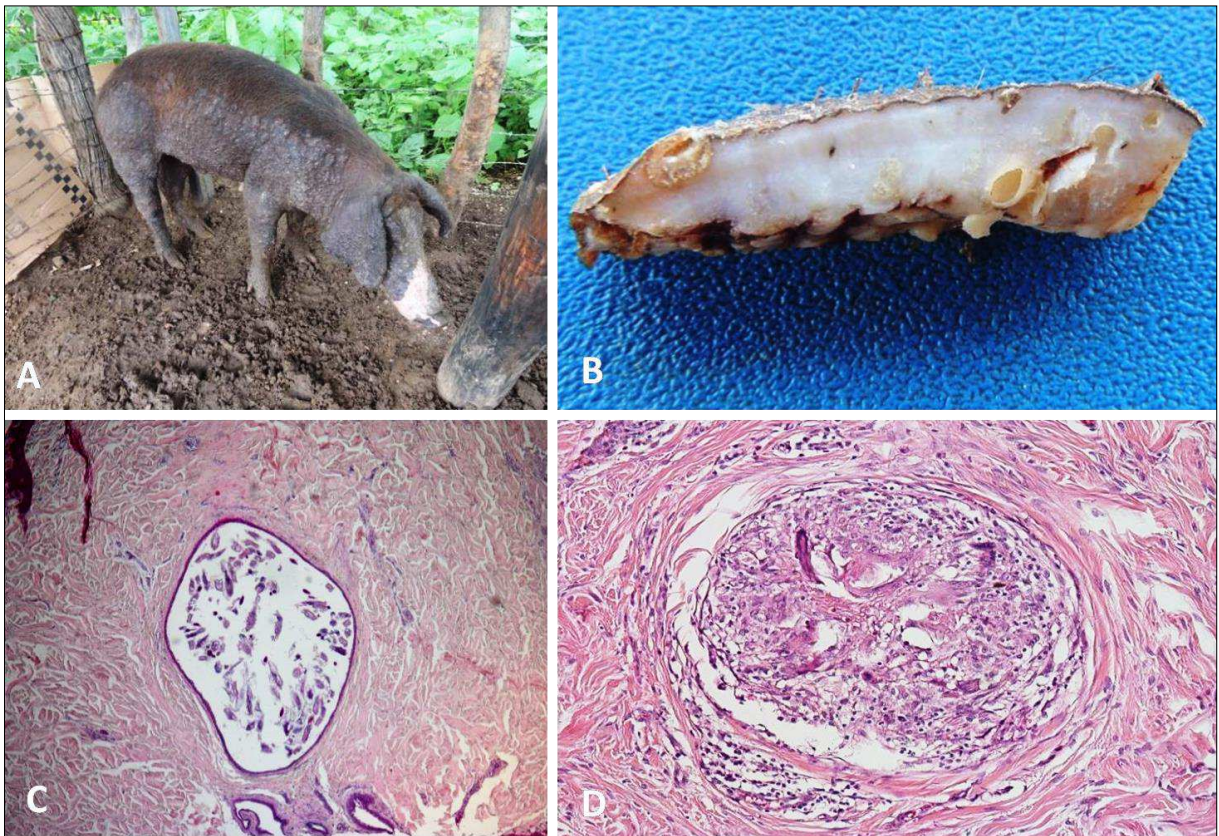


Figura 1 - Demodicose em suíno no Estado da Paraíba. A) Nódulos multifocais a coalescentes, firmes, associados a crostas acinzentadas e moderada alopecia na região lateral do tórax, abdômen, membros, cabeça e orelhas. B) Fragmento de pele hirsuta demonstrando na superfície de corte múltiplas cavitações com material amarelado. C) Observa-se folículo piloso distendido por debris de ceratina e numerosas estruturas parasitárias no lúmen em derme superficial. HE, obj. 20x. D) Derme profunda observa-se um granuloma focal. HE, obj. 20x.

Macroscopicamente observou-se na superfície nódulos irregulares, com múltiplas crostas e descamação. Ao corte exibia superfície esbranquiçada com múltiplas áreas formando cavitações preenchidas com material amarelado.

Na análise microscópica, observou-se em derme folículos pilosos com acentuada distensão luminal por secções transversais e longitudinais de artrópodes de parede fina eosinofílica caracterizando um exoesqueleto quitinoso, com apêndices curtos, articulados e em seu interior hemocele, músculo estriado e com aparelho reprodutivo, morfológicamente compatível com *Demodex phylloides* (Figura 1C). Na derme superficial haviam áreas multifocais de discreto a moderado infiltrado inflamatório constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e ocasionais eosinófilos. Verificou-se também áreas multifocais de granulomas (Figura 1D), constituído por macrófagos, plasmócitos, linfócitos e numerosas células gigantes multinucleadas. As glândulas apócrinas estavam ectásicas. No exame citológico, visualizaram-se estruturas com três a quatro pares de patas curtas em sua porção ventral e terço anterior do corpo, caracterizado por sua forma típica de charuto, morfológicamente compatível com *Demodex phylloides*.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de demodicose neste suíno foi baseado nos achados macroscópicos e microscópicos, associado ao exame parasitológico. O parasitismo por *Demodex phylloides* em suínos é considerado atípico e está relacionado com más condições ambientais, nutricionais e sanitárias, que resultam em morbidade e imunossupressão [5].

A demodicose pode apresentar-se sem sinais clínicos [8]. Os ácaros do gênero *Demodex* spp. escavam as glândulas sudoríparas e sebáceas e as áreas mais profundas dos folículos pilosos, causando proliferação e em seguida, necrose do epitélio, com intensa inflamação da derme subjacente. Esta condição é caracterizada pela presença de pequenos abscessos, granulomas com células gigantes e difusa infiltração inflamatória, como o

observado neste caso [1]. Em alguns casos, os ácaros migram para locais mais distantes, podendo alcançar os gânglios linfáticos, causando uma infecção secundária, que pode levar à óbito [3]. Em relato de caso em suíno, Bersano *et al.* (2016) observaram, em exame histopatológico, intensa hiperplasia dos folículos com presença de material necrótico em seu interior, constituído por fragmentos de parasitos, aglomerados bacterianos e células inflamatórias, com predomínio de mononucleares. A dermatite causada por *Demodex phylloides* pode comprometer o crescimento de leitões, fazendo com que estes cresçam atrofiados [7]. Além disso, as lesões encontradas na pele e em órgãos internos resultaria na condenação de carne e vísceras para consumo humano, trazendo perdas econômicas aos suinocultores. Sendo assim, faz-se necessário um maior entendimento sobre esta enfermidade, afim de proporcionar melhores condições de prevenção e controle.

Esses resultados confirmam a circulação da demodicose nas criações de suínos na região Nordeste, salientando para necessidade de diagnóstico acurado e adoção de medidas profiláticas e de controle para reduzir as perdas econômicas.

REFERÊNCIAS

- 1 **Bersano J.G., Mendes M.C., Duarte F.C., Fava C.D., Oliveira S.M., Spósito Filha E., Pinheiro E.S., Nassar A.F.C., Bilynskyj M.C.V., Ogata R.A.O., Sampaio P.H.S. & Genovezet M.É. 2016.** *Demodex phylloides* infection in swine reared in a peri-urban family farm located on the outskirts of the Metropolitan Region of São Paulo, Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 230, p. 67-73.
- 2 **Bowman D.D. 2010.** *Georgis - Parasitologia Veterinária*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.432.
- 3 **Doster A.R. 1995.** Skin diseases of swine. *Swine Health Prod.*, v.3, p.256-261.
- 4 **Nutting W.B. 1976.** Hair follicle mites (*Demodex* spp.) of medical and veterinary concern. *The Cornell Veterinarian*, v.66, p.214-231.
- 5 **Matthes H.F. 1994.** Investigations of pathogenesis of cattle demodicosis: sites of predilection, habitat and dynamics of demodectic nodules. *Veterinary Parasitology*. 53(4): 283-291.
- 6 **Radostits O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. 2002.** *Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9.Ed. Rio de Janeiro. Guanabara koogan. 1737p

- 7 **Santarem V.A., Farias, M.R. & Tostes R.A. 2005.** Demodectic mange in fattening pigs in Sao Paulo, Brazil. *Veterinary parasitology*, 131(1-2), 169-171.
- 8 **Silveira R.L., Ribeiro R.B., Cruz A.C.M., Almeida L.G. & Carvalho E.C.Q. 2012.** Demodicose suína no norte do estado do Rio de Janeiro: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64(3): 555-558.
- 9 **Smith B.P. 2006.** *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3.Ed. Barueri: Manole, 1728p.
- 10 **Sobestiansky J., Barcellos D.E.S.N., Mores N. et al. 1999.** *Clínica e Patologia suína*. Goiânia: Gráfica, 1999. Art 3. 464p.
- 11 **Wall R. 2007.** Ectoparasites: Future challenges in a changing world. *Veterinary Parasitology*. 148(1): 62-74.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças diagnosticadas em suínos no LPA/HVU/UFCG ocorrem esporadicamente, entretanto causam perdas econômicas significativas na região, principalmente em criações de subsistência. Muitas patologias são de caráter infeccioso e o seu surgimento está relacionado diretamente a falhas de manejo nutricional e sanitário.

Sugere-se que outros trabalhos sejam realizados, principalmente de forma mais abrangente, com o intuito de determinar as patologias que ocorrem em suínos nas diferentes regiões do Nordeste brasileiro, para que sejam sugeridas medidas básicas de controle e prevenção de infecções na suinocultura de subsistência, minimizando as perdas econômicas significativas para os pequenos produtores.