

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

**GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO E
MORTALIDADE PERINATAL EM EQUINOS: LEPTOSPIRA
E HERPESVÍRUS EQUINO - 1 COMO AGENTES CAUSAIS**

ALINE APARECIDA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientadora: Dr^a. Claudia Del Fava

SÃO PAULO
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Silva, Aline Aparecida da.
Gestão sanitária do abortamento e mortalidade perinatal em equinos: *Leptospira* e *Herpesvírus* equino – 1 como agentes causais. / Aline Aparecida da

Silva. -- São Paulo, 2014.

133 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na Produção Animal.

Orientador: Claudia Del Fava.

Versão do título para o inglês: Health management of equine abortion and perinatal mortality: *Leptospira* and Equine *herpesvirus* – 1 as causal agents.

1. HVE-1 2. Aborto equino a vírus 3. Leptospirose 4. Diagnóstico diferencial 5. Imunohistoquímica I. Silva, Aline Aparecida da II. Del Fava, Claudia III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2014/003



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002- São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: ALINE APARECIDA DA SILVA

Título: GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO E MORTALIDADE PERINATAL EM EQUINOS: LEPTOSPIRA E HERPESVÍRUS EQUINO - 1 COMO AGENTES CAUSAIS

Orientadora: Profa. Dra. CLAUDIA DEL FAVA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Dedico este trabalho a Deus que me deu forças e capacidade para fazê-lo, aos meus amados pais pelo incentivo; à Dra Cláudia Del Fava pela excelente orientação e ao Dr Enio e Dra Cláudia Mori por todo o apoio, desde o início para a realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a razão da minha existência e o amado da minha alma; a Jesus meu amado Senhor e Salvador e à doce Presença do meu amado Consolador e Conselheiro o Espírito Santo.

À minha amada mãe por todo amor, compreensão e incentivo e por ser a melhor mãe do mundo!

Ao meu amado pai por seu amor, apoio e incentivo.

Aos meus três irmãos que sempre amei.

À Dra. Cláudia Del Fava, excelente orientadora, que me acompanhou em todas as etapas deste projeto e de todas as formas, incentivando, ajudando e se tornando muito mais que minha orientadora, mas também uma amiga à qual sempre serei grata.

Ao querido Dr. Enio Mori pela oportunidade de estágio, pelo ensino e toda a ajuda neste projeto e pela amizade.

A querida Dra. Cláudia Madalena Cabrera Mori, pelo auxílio ao projeto em toda a parte de inoculação dos controles de HVE-1, pelo grande aprendizado no período de estágio, pela paciência e mansidão, pelo exemplo de dedicação e zelo em tudo que faz.

A querida técnica de laboratório da UFMVZ-USP, Marguiti Izaura Soares Silva com quem pude aprender a técnica de IHQ.

A todos os funcionários do Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico em especial à Dras. Elenice Maria Sequetin Cunha, Maria do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara, Eliana Cassaro Villalobos por nos cederem os isolados de HVE-1 do Instituto Biológico e os resultados das análises de isolamento viral e PCR, enriquecendo o presente trabalho. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar, do Laboratório de Bacteriologia Geral, pelo apoio diagnóstico da PCR do HVE-1.

A todos os funcionários do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico em especial à Dra. Eliana Scarcelli, Rosa Maria Piatti, Vanessa Castro e Aline Feola de Carvalho pelas análises de isolamento bacteriano e PCR, também enriquecendo este estudo e à Dra. Vanessa Castro pelo fornecimento dos controles positivos de *Leptospira*.

À todos os amigo(a)s do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico, em especial à Ariane Dias, Náyra Villar Scattone, João Sérgio Giacomini Castanho, Alessandra Dias Lacerda, Dirlene Marques Justino e Sr. Carlos Augusto Burjato Filho.

Aos professores da pós-graduação por doarem seu tempo oferecendo-nos a oportunidade

de aprender mais com suas experiências, em especial às professoras Claudia Del Fava, Margareth Genovez, Maristela Pituco, Magali D'Angelo (*in memoriam*), Edlayne Gonçalves, Ana Eugênia de Carvalho Campos, Addolorata Colariccio e Luís Otávio S. Beriam e aos professores Marcelo Eiras, Mário Eidi Sato e Sidney Sampaio (*in memoriam*) em especial ao professor Luiz Carlos Luchini, excelente e amável professor.

Às amigas que fiz na pós graduação, pela companhia, em especial a Kelly Montanari, pelos bons momentos juntas e pelas conversas a respeito do Amado Salvador.

Aos meus amados amigos do trabalho, Irineu, Michelly, Joel (Mister Chang), Carlão (Yasufumi Fukuhara), Kátia, Aline, Ana Paula, Leninha, Gisele, Larissa, Maira, Viviane, Mira, Leandro, Ana Maria e Sheila. É muito bom sorrir com vocês todos os dias.

À amada irmã Claudia por todo o apoio e por suas orações (te amo em Cristo nosso Senhor). À classe Rosa de Sarom pelo prazeroso convívio e aprendizado, Deus abençoe vocês e as faça crescer em seus caminhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica no período de 2010 a início de 2012 que possibilitou o início do trabalho com Herpesvírus.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado pelo período de um ano.

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio à Pesquisa nº 2012/00277-0.

Ao Instituto Biológico por sua linda história de produção científica e por suas portas abertas aos estudantes.

“Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.” João 3:16 (Bíblia Sagrada)

“E a vida eterna é esta: que te conheçam, a ti só, por único Deus verdadeiro, e a Jesus Cristo, a quem enviaste.” João 17:3 (Bíblia Sagrada)

RESUMO

SILVA, A. A. GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO E MORTALIDADE PERINATAL EM EQUINOS: *LEPTOSPIRA* E HERPESVÍRUS EQUINO - 1 COMO AGENTES CAUSAIS. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Instituto Biológico)

Os inquéritos soroepidemiológicos indicam que a *Leptospira* spp. e o Herpesvírus Equino tipo 1 (HVE-1) estão disseminados nos plantéis equinos brasileiros, sendo atribuídos a estes patógenos perdas econômicas devido a abortamentos e complicações na eficiência reprodutiva, gastos no diagnóstico e tratamento, e o risco da leptospirose como zoonose. A maioria dos estudos epidemiológicos de leptospirose e HVE-1 utilizam as técnicas de sorodiagnóstico, isolamento e PCR, entretanto, a prova de imunohistoquímica (IHQ) associa três informações importantes: o tipo, localização da lesão e presença do antígeno. Objetivou-se realizar o diagnóstico diferencial das doenças infecciosas em fetos equinos abortados e mortalidade perinatal pelas técnicas histológicas de coloração hematoxilina/eosina, IHQ, isolamento e PCR para pesquisa do HVE-1 e da *Leptospira* spp. Foram avaliados durante o período de janeiro de 2010 a julho de 2013, um total de 105 fetos ou natimortos/potros de até 30 dias encaminhados ao Instituto Biológico de São Paulo. Dois fetos foram positivos para HVE-1 pela PCR (1,90%) e apresentaram as seguintes lesões: pneumonia intersticial não purulenta, meningoencefalite não-purulenta, hiperplasia de polpa branca esplênica e hepatite não purulenta, e destes, o feto 2 apresentou lesões sugestivas de HVE-1 (sincícios e inclusões intranucleares eosinofílicas no epitélio bronquiolar), mas não foi positivo no isolamento e IHQ, enquanto que o feto 1, foi positivo no isolamento e IHQ, demonstrando a necessidade da associação de diferentes técnicas para o diagnóstico de aborto por HVE-1. Nenhum dos animais foi positivo para *Leptospira* spp. Dentre os animais negativos a estes agentes 32,07% (17/53) foram positivos ao exame bacteriológico: *Escherichia coli* (7,54%), *Enterobacter aerogenes* (5,66%), *Escherichia coli* + *Streptococcus* spp.(3,77%), *Staphylococcus* spp. + *Bacillus* spp. (3,77%), e 1,89% para *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinobacillus* spp., *Rhodococcus equi* e Fungo Leveduriforme. Nos animais negativos a todos os agentes pesquisados as lesões predominantes foram hiperplasia de polpa branca esplênica, hiperplasia linfóide tímica e meningoencefalite não purulenta, sugerindo agente infeccioso a esclarecer. A baixa ocorrência do HVE-1 e ausência da *Leptospira* spp. confirmam a endemicidade destes na população estudada, porém os outros patógenos identificados indicam a necessidade de implantação de medidas higiênico-sanitárias no manejo da fêmea em reprodução, a fim de prevenir perdas fetais e natimortalidade.

Palavras-chave: HVE-1, aborto equino a vírus, leptospirose, diagnóstico diferencial, imunohistoquímica.

ABSTRACT

SILVA, A. A. HEALTH MANAGEMENT OF EQUINE ABORTION AND PERINATAL MORTALITY: *LEPTOSPIRA* AND EQUINE HERPESVIRUS - 1 AS CAUSAL AGENTS. 2014. Dissertation (Master in Health, Food and Environmental Safety in Agribusiness - Biological Institute)

The seroepidemiological surveys indicate that *Leptospira* and Equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) are widespread in Brazilian horses. Economic losses due to abortion, and complications in reproductive efficiency, costs with the diagnosis and treatment are attributed to these pathogens, besides the fact of leptospirosis be a zoonosis. Most epidemiological studies of leptospirosis and EHV-1 are made by serological diagnosis, isolation and PCR, however, the immunohistochemistry assay (IHC) combines three important information: type, location of the lesion associated to the presence of antigen. This project aimed to make the differential diagnosis of infectious diseases in aborted equine fetuses associating histological techniques of hematoxylin/eosin and IHC, isolation and PCR for detection of EHV-1 and *Leptospira* spp. from January 2010 to July 2013, a total of 105 fetuses and stillborn/foals up to 30 days, sent to the Biological Institute of São Paulo were evaluated. Two fetuses were positive for EHV-1 by PCR (1.90%) and had the following alterations: not purulent interstitial pneumonia, non-purulent meningoencephalitis, hyperplasia of the splenic white pulp and not purulent hepatitis, one of these (fetus 2) presented lesions suggestive of EHV-1 (syncytia and intranuclear eosinophilic inclusions in bronchiolar epithelium), but it was not positive in virus isolation and IHC, while the fetus 1 was positive in virus isolation and IHC, demonstrating the necessity of the association of different techniques for the diagnosis of EHV-1 abortion. No one animal was positive for *Leptospira* spp. Among EHV-1 and *Leptospira* spp. negative animals 32.07% (17/53) were positive in the bacteriological examination for *Escherichia coli* (7.54%), *Enterobacter aerogenes* (5.66%), *Escherichia coli* + *Streptococcus* spp. (3.77%), *Staphylococcus* spp. + *Bacillus* spp. (3.77%), and 1.89% for *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinobacillus* spp., *Rhodococcus equi* and leveduriform fungi. The predominant lesions in the negative animals were hyperplasia of splenic white pulp, thymic lymphoid hyperplasia and not purulent meningoencephalitis, suggesting other causes. The low frequency of occurrence of EHV-1 and absence of *Leptospira* spp. confirms the endemicity of these agents in the population studied, but other pathogens identified indicate the need for implementation of hygienic-sanitary management of mare in reproduction, in order to prevent fetal loss, stillbirth, and foal mortality.

Keywords: EHV-1, equine abortion viruses (EAV), leptospirosis, differential diagnosis, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Foto de microscopia eletrônica de varredura de <i>Leptospira</i> spp. Fonte: ADLER; MOCTEZUMA (2010).....	04
Figura 2 -	Ciclo epidemiológico simplificado da leptospirose em seres humanos e animais. Fonte: ADLER; MOCTEZUMA (2010).....	06
Figura 3 -	Herpesvírus equino -1. (A) Microscopia de transmissão eletrônica (<i>Animal Health Trust</i>). (B) Esquema da estrutura do HVE-1. Fonte: PAILLOT et al. (2008).....	12
Figura 4 -	Desenho esquemático da replicação viral do Herpesvírus Equino. Fonte: COEN; SCHAFFER, (2003).....	15
Figura 5 -	Representação esquemática dos eventos que ocorrem em uma infecção primária por HVE-1 ou HVE-4 em um animal suscetível. Os números indicam a ordem em que os eventos ocorrem. Fonte: SÁENZ; GÓEZ; HERRERA, (2008).....	17
Figura 6 -	Desenho esquemático da reação de Imunohistoquímica pelo método LSAB. Fonte: RAMOS-VARA (2005).....	20
Figura 7 -	Fluxograma da distribuição e processamento das amostras.....	26
Figura 8 a, b, c, d, e, f -	a - rim de Hamster controle negativo. Sem alterações histopatológicas. b - rim de Hamster inoculado com <i>Leptospira Canicola</i> , estirpe LO4, presença de conteúdo amorfo eosinofílico (proteinúria) no espaço glomerular (seta preta). c - rim de Hamster inoculado com <i>Leptospira Canicola</i> , estirpe LO4, presença de conteúdo amorfo eosinofílico (proteinúria) e túbulos contornados degenerados (seta preta). d - fígado de Hamster controle negativo, sem alterações histopatológicas. e - fígado de Hamster inoculado com <i>Leptospira Canicola</i> , estirpe LO4, tumefação dos hepatócitos (seta preta). f - fígado de Hamster inoculado com <i>Leptospira Canicola</i> , estirpe LO4, congestão dos sinusóides (seta preta). Coloração H.E. - aumento de 400x.....	37

Figura9 a, b,
c, d, e, f-

a- rim de hamster controle negativo (somente com anticorpo secundário) 400x. **b** - rim de hamster controle negativo (reação completa, marcação de fundo devido à alta concentração de anticorpo) (seta)400x. **c-** rim de hamster inoculado com *Leptospira* Canicola, estirpe LO4, leptospiras coradas em castanho no lúmen do túbulo contornado distal (seta), 1000x (óleo de imersão). **d-** rim de hamster inoculado com *Leptospira* Canicola, estirpe LO4, leptospira corada em castanho no lúmem do túbulo contornado proximal (setas) - 400x. **e-** rim de hamster inoculado com *Leptospira* Canicola, estirpe LO4, leptospira no espaço urinário glomerular (seta preta) 1000x (óleo de imersão). **f** - rim de hamster inoculado com *Leptospira* Canicola, estirpe LO4, Leptospira no espaço urinário glomerular (imagem refringente da figura 4 na ponta da seta preta) 1000x (óleo de imersão). Coloração de IHQ.....

38

Figura10 a,
b, c, d, e, f -

a- pulmão de hamster controle negativo inoculado com 50µL de MEM - 3º d.p.i. (vista dorsal), mucosa nasal limpa, sem secreção de muco (seta preta). **b-** controle positivo, cepa A9/92, 3º d.p.i. três hamsters mortos (setas pretas) e um ainda vivo convulsionando (seta vermelha). **c-** controle positivo, cepa AR4, 3º d.p.i. ao corte da traquéia houve extravasamento de conteúdo espumoso (seta preta), caracterizando edema pulmonar. **d** - controle positivo, cepa A3/97, 3º d.p.i. observa-se secreção nasal serosanguinolenta (seta preta), vista ventral. **e-** controle positivo, cepa ISO 72/10, 3º d.p.i. observa-se secreção nasal serosanguinolenta (seta preta), vista lateral. **f** - controle positivo, cepa A4/72, 3º d.p.i. observa-se hamster convulsionando (seta preta), hiperexcitabilidade frente a estímulo externo (seta amarela).....

45

Figura11 a,
b, c, d, e, f -

a - pulmão de hamster controle negativo inoculado com 50µL de MEM, 3º d.p.i. sem alterações macroscópicas (vista dorsal). **b-** pulmão de hamster controle positivo, cepa A9/92, 3º d.p.i. intensa coloração avermelhada nos lobos pulmonares = áreas de hemorragia (vista dorsal). **c-** pulmão de hamster controle positivo, cepa AR4, 3º d.p.i. observa-se alteração de coloração dos lobos pulmonares (hemorragia pulmonar) (seta preta) (vista dorsal). **d-** pulmão de hamster controle positivo, cepa A3/97, 3º d.p.i. alteração da coloração dos lobos pulmonares (lobos avermelhados = áreas de hemorragia pulmonar) (setas pretas) (vista dorsal). **e-** pulmão de hamster controle positivo, cepa ISO 72/10, 3º d.p.i. alteração da coloração dos lobos pulmonares (hemorragia pulmonar) (seta preta) e edema pulmonar (seta amarela) (vista ventral). **f-** pulmão de hamster

controle positivo, cepa A4/72, 3º d.p.i. alteração da coloração dos lobos pulmonares (hemorragia pulmonar) (setas amarelas), áreas rosa claro= lobos pulmonares não hemorrágicos (seta preta) (vista dorsal)..... 46

a - pulmão de hamster controle negativo, epitélio bronquiolar íntegro, não reacional, sem conteúdo ou debris celulares, sem espessamento alveolar 400x. **b** - pulmão de hamster controle positivo, cepa AR4, macrófagos espumosos no lúmen bronquiolar (seta preta) 600x. **c**- pulmão de hamster controle positivo, cepa ISO 72/10, sincício (seta preta) 400x. **d**-microscopia de pulmão de controle positivo, cepa A3/97, hamster 1, edema pulmonar com moderado infiltrado inflamatório (seta preta) e congestão (seta vermelha) 200x. **e** - microscopia de pulmão de hamster controle positivo, cepa A4/72, edema (seta preta), espessamento da parede alveolar intenso (hamster 2) 200x. **f**- pulmão de hamster controle positivo, cepa A9/92, 3º d.p.i. espaço aéreo com conteúdo amorfo eosinofílico, hemácias livres e infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela), desprendimento bronquiolar e debris celulares no lúmen do bronquíolo (seta preta) 200x. Coloração H.E..... 47

Figura 12 a,
b, c, d, e, f -

a- SNC de hamster controle negativo, inoculado com meio de cultivo (MEM), sem alterações histopatológicas 400x. **b**- SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa A9/92 de HVE-1, 3º d.p.i. Inclusão intranuclear eosinofílica em neurônio (seta) 400x. **c** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa AR4 de HVE-1, 3º d.p.i. observa-se aumento do espaço perivascular 400x. **d** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa A3/97 de HVE-1 - 3º d.p.i., área de necrose predominante em região de bulbo olfatório, degeneração neuronal (seta) 400x. **e**- SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa ISO 72/10 de HVE-1, 3º d.p.i., manguito perivascular mononuclear (seta preta) e focos de infiltrado inflamatório mononuclear (seta vermelha) 400x. **f** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa A4/72 de HVE-1, 3º d.p.i., edema do neurópilo (seta) e degeneração neuronal 400x. Coloração H.E..... 48

Figura 13 a,
b, c, d, e, f -

- a, b e c** - IHQ de pulmão de hamster controle positivo – cepa AR8. Anticorpo anti-HVE-1 marcando isolado argentino AR8 controle positivo, marcação caracterizada pela coloração acastanhada de células epiteliais do bronquíolo pulmonar (setas). Aumento de 400x (a) e 200x (b e c). (Carolina Natalia Zanuzzi, 2013, Universidad de La Plata, dados não publicados)..... 49
- Figura 14 a, b, c -
- IHQ utilizando o anticorpo anti-HVE-1 (isolado AR8) **a** - pulmão de hamster controle negativo, inoculado com meio de cultivo (MEM), sem marcação. **b** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa A9/92, sem marcação. **c** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa AR4, sem marcação. **d** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa A3/97, sem marcação. **e** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa ISO 72/10, sem marcação. **f** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa A4/72, sem marcação. Aumento de 400x. 52
- Figura 15 a, b, c, d, e, f -
- IHQ de cortes histológicos de pulmão dos hamsters controles de HVE-1, utilizando o anticorpo comercial anti-HVE-1 VMRD®. **a** - controle negativo, inoculado com meio de cultivo (MEM), sem marcação. **b**- controle positivo, HVE-1 cepa ISO 72/10, sem marcação. **c**- controle positivo, cepa A4/72, sem marcação. **d**- controle positivo, cepa A9/92, sem marcação, leve fundo devido à grande quantidade de hemácias. **e** - controle positivo, cepa AR4, marcação positiva caracterizada pela coloração castanha de células do bronquíolo pulmonar (seta). Aumento de 630x. **f**- controle positivo, cepa A3/97, marcação positiva caracterizada pela coloração castanha de células do bronquíolo pulmonar (seta) 400x..... 53
- Figura 16 a, b, c, d, e, f -
- IHQ de cortes histológicos de SNC dos hamsters controle de HVE-1, utilizando o anticorpo comercial anti-HVE-1 VMRD®. **a** - controle negativo (reação padrão), inoculado com meio de cultivo (MEM), observa-se muito discreta marcação de fundo. **b** - controle positivo, cepa A9/92, sem marcação, leve fundo devido à grande quantidade de hemácias. **c**- controle positivo, cepa A4/72, observa-se moderada marcação de fundo, porém, sem marcação de neurônios em região de bulbo olfatório. **d**- controle positivo, cepa A3/97, marcação positiva (neurônios corados em castanho em bulbo olfatório) (seta). **e**- controle positivo, cepa AR4, marcação positiva (neurônios corados em castanho em região de bulbo olfatório) (seta). **f** - controle positivo, cepa ISO 72/10, observa-se marcação positiva
- Figura 17 a, b, c, d, e, f -

(neurônios corados em castanho em bulbo olfatório) (seta).
Aumento de 630x..... 54

Figura 18 a, b, c, d, e, f -
a - cérebro de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517) positivo ao HVE-1 na PCR e isolamento, meninge e neurópilo congesto (seta) e edemaciado, com discreto infiltrado mononuclear meníngeo. **b**- SNC de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048) positivo para HVE-1 na PCR, congestão e infiltrado mononuclear meníngeo (seta preta) e congestão de neurópilo. **c**- pulmão de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), pleura congesta, edemaciada e com infiltrado inflamatório mononuclear moderado (seta vermelha); interstício congesto, com infiltrado mononuclear e edema no espaço alveolar (seta preta). **d**-pulmão de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), observam-se dois sincícios (seta preta) 400x. **e** - baço de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), hiperplasia de polpa branca (setas) 100x. **f**- baço de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), hiperplasia de polpa branca (setas). Coloração H.E. Aumento de 100x..... 57

Figura 19 a, b, c, d, e, f -
a -fígado de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), múltiplos e pequenos focos de necrose (setas pretas) com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração turva dos hepatócitos (seta amarela) 200x. **b**-fígado de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), sincício (seta preta) 600x. **c** - rim de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), degeneração tubular (seta) e nefrose 600x. **d** -rim de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), corpúsculos de inclusão intranuclear em células do túbulo renal (setas pretas) 600x. Coloração de H.E. **e** - IHQ de pulmão de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), utilizando o anticorpo anti-HVE- 1 produzido a partir do isolado argentino AR8, observa-se discreta marcação positiva em pneumócitos (seta preta) - 400x. **f** - IHQ de pulmão de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), utilizando o anticorpo anti-HVE- 1 produzido a partir do isolado argentino AR8, sem marcação, 400x..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Divisão do número de casos de abortamento e mortalidade perinatal equina, segundo grupo de classificação da causa ou do agente causal (São Paulo, 2014).....	59
Tabela 2 -	Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento viral, PCR, IHQ e histopatologia (H.E.) para diagnóstico do HVE-1 (São Paulo, 2014).....	60
Tabela 3 -	Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento viral, PCR e IHQ para pesquisa de HVE-1, classificados por Estados de origem (São Paulo, 2014).....	62
Tabela 4 -	Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento viral, PCR e IHQ para pesquisa de HVE-1, classificados por idade (São Paulo, 2014).....	63
Tabela 5 -	Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento, PCR e IHQ para diagnóstico da <i>Leptospira</i> spp. (São Paulo, 2014).....	63
Tabela 6 -	Positividade dos fetos /natimortos/potros frente ao isolamento para diagnóstico de bactérias e fungos patogênicos (São Paulo, 2014).....	64
Tabela 7 -	Lesões histopatológicas em órgãos de fetos equinos, natimortos ou potros com até um mês de vida positivos à análise bacteriológica, técnica H.E. (São Paulo, 2014).....	65
Tabela 8 -	Lesões histopatológicas em órgãos de fetos equinos, natimortos ou potros com até um mês de vida negativos às técnicas bacteriológicas, técnica H.E. (São Paulo, 2014).....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Principais herpesvírus de alguns membros da família <i>Equidae</i> (São Paulo – 2012).....	13
Quadro 2 -	Agentes etiológicos de origem não-infecciosa causadores de abortamentos ou partos prematuros em equinos (Adaptado de MOREIRA, 1992; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).....	22
Quadro 3 -	Agentes etiológicos causadores de abortamentos ou partos prematuros de origem infecciosa em equinos (Adaptado de MOREIRA, 1992; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).....	23
Quadro 4 -	Número de animais analisados em diferentes Laboratórios do Instituto Biológico – SP, para diagnóstico de causas de abortamento e mortalidade perinatal equina.....	25
Quadro 5 -	Distribuição dos animais para efetuação dos controles de <i>Leptospira</i> spp.....	28
Quadro 6 -	Cepas virais de HVE-1 utilizadas na produção de controles positivos para a IHQ.....	29
Quadro 7 -	Distribuição dos animais para efetuação dos controles negativos e positivos de HVE-1.....	30
Quadro 8 -	Positividade dos anticorpos (Ac) primários testados frente aos diferentes isolados de HVE-1 analisadas (São Paulo, 2014).....	60
Quadro 9 -	Avaliação da presença de lesões sugestivas de HVE-1 frente aos diferentes isolados estudados nos hamsters inoculados e nos fetos abortados positivos ao HVE-1 (São Paulo, 2014).....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Principais lesões encontradas nos fetos abortados, natimortos e potros até um mês de vida positivos às análises bacteriológicas em destaque as cores azul e rosa representando os órgãos que apresentaram maior ocorrência de lesões (São Paulo, 2014).....	66
Gráfico 2 -	Principais lesões encontradas nos fetos abortados, natimortos e potros até um mês de vida negativos às análises efetuadas, em destaque as cores amarelo e laranja, representando os órgãos que apresentaram maior ocorrência de lesões (São Paulo, 2014).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Gb = glicoproteína B

°C = graus Celsius

% = por cento

CETEA-IB = Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico

CMNSP = células mononucleares do sangue periférico

CPDSA = Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade animal

DAB = diaminobenzidina

DICT = dose infectante em cultura de tecidos

d.p.i = dias pós inoculação

DNA = ácido desoxirribonucléico

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

et al. = e colaboradores

F = frequência de ocorrência

H.E. = Hematoxilina-Eosina

HEPA = *High-efficiency particulate air* (Filtro de alta eficiência das partículas do ar)

HVE-1 = Herpes vírus equino tipo 1

HVE- 4 = Herpes vírus equino tipo 4

HVE-9 = Herpes vírus equino tipo 9

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICTV = Comitê Internacional de Taxonomia Viral

IFD = Imunofluorescência direta

IFI = Imunofluorescência indireta

IHQ = Imunohistoquímica

IM = intramuscular

Kg = quilograma

L. = *Leptospira*

LAP = Laboratório de Anatomia Patológica

LRE = Laboratório de Raiva e Encefalites Virais

LSAB = *Labeled Streptavidin Biotin Method* (Método Streptavidina-biotina)

m = meses

MEH = mieloencefalopatia herpética equina

MEM = meio essencial mínimo

mg = miligrama

MG = Estado de Minas Gerais

min = minuto de hora

mL = mililitro

MS = Estado do Mato Grosso do Sul

NI = não informado

nº = número

OBS = observação

OIE = Organização Internacional de Epizootias

pb = pares de bases

PBS = *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

PCR = *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia pela polimerase)

pH = potencial hidrogeniônico

POS = positivo

PR = Estado do Paraná

® = marca registrada

RJ = Estado do Rio de Janeiro

RS = Estado do Rio Grande do Sul

SAP - sem alterações histopatológicas

SAM = soroagutinação microscópica

SP = Estado de São Paulo

spp. = espécies

SIGA = Sistema de Informações Gerenciais do Agronegócio

SNC = Sistema Nervoso Central

VERO = células de rim de macaco verde

VO = via oral

USA = Estados Unidos da América

µL = microlitro

µm = micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
SUMÁRIO	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 A <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. COMO AGENTE CAUSADOR DE ABORTAMENTOS EM EQUINOS E ZOONOSE.....	04
2.1.1 O agente etiológico.....	04
2.1.2 Vias de transmissão e patogenia da <i>Leptospiras</i> spp.....	05
2.1.3 Epidemiologia da <i>Leptospira</i> spp.....	08
2.1.4 Diagnóstico da <i>Leptospira</i> spp.....	10
2.2.5 Tratamento e profilaxia – <i>Leptospira</i> spp.....	10
2.2 ABORTO EQUINO A VÍRUS (HERPESVÍRUS EQUINO - 1).....	11
2.2.1 O agente etiológico.....	11
2.2.2 Vias de transmissão e patogenia do HVE-1.....	15
2.2.3 Epidemiologia do HVE-1.....	18
2.2.4 Diagnóstico do HVE-1.....	19
2.2.5 Tratamento e profilaxia do Herpesvírus Equino - tipo 1.....	21
2.3 OUTRAS CAUSAS DE ABORTAMENTO EQUINO.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	26
3.1.1 Inclusão em parafina e coloração H.E.....	26
3.1.2 Preparo do material para a IHQ.....	27
3.1.3 Preparo dos controles negativos para <i>Leptospira</i> spp. e HVE-1.....	28

3.1.4 Preparo dos controles positivos de <i>Leptospira</i> spp.....	28
3.1.5 Preparo dos controles negativos de HVE-1.....	29
3.1.6 Preparo dos controles positivos de HVE-1.....	29
3.1.7 Protocolo de IHQ.....	30
3.1.8 Validação da reação para HVE-1 e <i>Leptospira</i> spp.....	32
3.1.9 Preparo da amostra para isolamento e identificação do HVE-1.....	32
3.1.10 Preparo da amostra para isolamento e identificação da <i>Leptospira</i> spp.....	32
3.1.10.1 Meios de cultivo para o isolamento de <i>Leptospira</i> spp.....	32
3.1.10.2 Isolamento de <i>Leptospira</i> spp.....	33
3.1.10.3 Técnica da PCR para <i>Leptospira</i> spp.....	33
3.1.10.4 Bacteriológico diferencial.....	35
3.1.11 Forma de análise dos resultados.....	35
4. RESULTADOS PRELIMINARES.....	36
4.1 CONTROLES DE <i>LEPTOSPIRA</i> spp.....	36
4.1.2 Descrição da análise histopatológica dos controles positivos e negativos para <i>Leptospira</i> sorovar Canicola estirpe LO4.....	36
4.2 CONTROLES DE HVE-1.....	39
4.2.1 Descrição da análise clínica e anatomopatológica e histopatológica dos controles negativos para HVE-1.....	39
4.2.2 Descrição da análise clínica e anatomopatológica e histopatológica dos controles positivos para HVE-1.....	39
4.2.2.1 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 A9/92.....	40
4.2.2.2 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 AR4.....	41
4.2.2.3 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 A3/97.....	42
4.2.2.4 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 ISO72/10.....	43
4.2.2.5 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 A4/72.....	44
4.3 RESULTADO DAS ANÁLISES DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	49
4.3.1 Teste comparativo de IHQ de controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 AR8 frente ao anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	49

4.3.2 Teste comparativo de IHQ de controle positivo inoculado com as diferentes cepas de HVE-1 estudadas.....	50
4.3.2.1 IHQ de Controle negativo frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	50
4.3.2.2 IHQ de Controle positivo – Cepa A9/92 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	50
4.3.2.3 IHQ de Controle positivo – Cepa AR4 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	50
4.3.2.4 IHQ de Controle positivo – Cepa A3/97 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	51
4.3.2.5 IHQ de Controle positivo – Cepa ISO 72/10 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	51
4.3.2.6 IHQ de Controle positivo – Cepa A4/72 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8).....	51
4.4 FETOS EQUINOS ABORTADOS.....	55
4.4.1 Análise microscópica (histopatológica), IHQ e PCR do Feto 1 (LAP 56517).....	55
4.4.2 Análise microscópica (histopatológica), IHQ e PCR do Feto 2 (LAP 58048)...	56
4.5 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS.....	59
4.5.1 Análise dos resultados gerais.....	59
4.5.2 Análise dos resultados obtidos pelas técnicas virológicas.....	59
4.5.3 Análise dos resultados obtidos pelas técnicas bacteriológicas.....	63
4.5.4 Análise dos animais negativos às técnicas bacteriológicas.....	66
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1 <i>LEPTOSPIRA</i> spp.....	69
5.2 HERPES VÍRUS EQUINO TIPO 1.....	73
5.3 FETOS NEGATIVOS PARA HERPESVÍRUS EQUINO TIPO – 1 E LEPTOSPIRA ÀS ANÁLISES EMPREGADAS.....	79
5.4 GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO EQUINO.....	83
6. CONCLUSÕES.....	87
7. BIBLIOGRAFIA BÁSICA.....	89

ANEXOS..... 103

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura constitui um importante segmento do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil possuidor do terceiro maior plantel equino do mundo, ficando atrás apenas do México e da China (SANTOS, 2007). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o plantel equino do Brasil, em 2010, foi estimado em 5.514.253 cabeças, sendo que grande parte desse rebanho, ou seja, 1.359.087 (24,6%) era criada ou mantida na Região Sudeste do país, contando o Estado de São Paulo com uma cifra equivalente a 379.379 (6,8% do total) espécimes.

Atualmente, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014), somando-se os equinos, muares e asininos, o Brasil possui aproximadamente oito milhões de cabeças, movimentando, somente com a produção de cavalos, por volta de R\$ 7,3 bilhões e sendo responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no país. A maior população equina no país encontra-se na região Sudeste, seguida das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte.

Em relação aos índices de exportação, o país apresentou elevada expansão nos últimos anos, sendo atualmente o oitavo maior exportador de carne equina para países como Bélgica, Holanda, Itália, Japão e França, movimentando cerca de US\$ 4,4 milhões em 2009 (BRASIL, 2014).

O Herpesvírus Equino tipo 1 (HVE-1), causador de sintomas respiratórios, neurológicos, aborto e morte neonatal têm sido isolados de fetos equinos abortados no país e em outras regiões do mundo (NILSSON; CORRÊA, 1966; HONG et al., 1993; MOREIRA et al., 1998; LAUGIER et al., 2011). As lesões histopatológicas dos cortes de fígado, rins, coração, pulmão, baço e cérebro de fetos abortados pelo HVE-1 demonstram infiltrado inflamatório mononuclear em diversos órgãos e inclusão intranuclear eosinofílica em hepatócitos e neurônios (DEL PIERRO, 1999), sendo consideradas características de HVE-1 e não patognomômicas, portanto, o diagnóstico final deverá ser apoiado por um teste laboratorial específico (SCHULTHEISS; COLLINS; CARMAN, 1993). Métodos imunohistoquímicos podem facilitar a identificação do vírus em amostras de tecidos arquivados ou em casos clínicos em que os métodos tradicionais de detecção de HVE-1 não apresentam bons resultados (OIE, 2008).

A *Leptospira* spp., bactéria do tipo espiroqueta é causadora de abortamento em diversas espécies, com atenção especial às espécies de produção, dentre as quais equina, bovina, ovina, caprina e suína (FAINE, 1999). Dentre os diferentes sorovares de *Leptospira* spp., os mais prevalentes em equinos são: Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae,

Pomona, Wolffi; Hardjo; Grippotyphosa; Canicola, Bratislava; Sentot; Castellonis; Autumnalis e Pyogenes (SWERCZEK, 1991; LINHARES, 2005; HASHIMOTO, 2010; CASELANI, 2012).

O sorovar Canicola é descrito como um sorovar altamente patogênico, com o desenvolvimento de síndrome hemolítica grave e morte do hospedeiro (TERCILLA et al., 2006), além de sua capacidade de produzir o efeito prozona, em que os títulos de anticorpos gerados são tão altos que acabam não sendo detectados pela técnica de soroaglutinação microscópica, sendo necessário o emprego de outros testes diagnósticos em sua pesquisa, como a PCR, que é sensível e específica (GENOVEZ et al., 2006b).

A principal fonte de infecção é a urina de animais infectados de várias espécies uma vez que a leptospirúria pode prolongar-se por vários meses após a exposição e posterior infecção do animal, entretanto, materiais oriundos de abortamento (o feto abortado, placenta e envoltórios fetais) também atuam como importantes fontes de transmissão da doença entre os animais de produção (MOREIRA, 1992).

O diagnóstico baseia-se no histórico, contexto epidemiológico e exame físico do animal aliado a provas sorológicas como ELISA ou soroaglutinação microscópica (SAM), moleculares (PCR) e/ou bacteriológicas (isolamento) (MORIKAWA, 2010). Outras técnicas como a imunofluorescência direta e a imunohistoquímica também vêm sendo empregadas em casos em que o material enviado se mostra impróprio às técnicas convencionais (PESCADOR et al., 2004; HAANWINCKEL et al., 2007; MARCOLONGO- PEREIRA et al., 2012).

A equideocultura vem crescendo no país, movimentando milhões de reais todos os anos, mostrando-se um importante setor do agronegócio brasileiro. Considerando que o tempo gestacional destes animais é longo, e que alguns deles são de alto valor econômico, assim como seus conceitos, é de grande importância o estudo das principais patologias causadoras de abortamento nesta espécie, bem como o estudo de técnicas laboratoriais que possibilitem a identificação do agente no menor espaço de tempo possível.

Tendo em vista a importância destes agentes como causadores de problemas reprodutivos em equinos e a necessidade de se realizar o diagnóstico diferencial de enfermidades infecciosas em fetos abortados, objetivou-se:

- Padronizar a técnica de Imunohistoquímica (IHQ) em cortes de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina para detecção de diferentes cepas de HVE-1 e *Leptospira* spp. LO4 Canicola em fetos equinos abortados, utilizando hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) inoculados experimentalmente como controles positivos.

- Avaliar a frequência de ocorrência do HVE-1 e da *Leptospira* spp. em fetos equinos abortados por meio da IHQ, PCR e isolamento, correlacionando as técnicas empregadas com idade do aborto e local de procedência.
- Verificar as lesões histopatológicas causadas pelo HVE-1 e pela *Leptospira* spp. em cortes de tecido equino incluídos em parafina e corados pela hematoxilina/eosina com a finalidade de enriquecer o conhecimento do estudo de lesões histológicas causadas por estes agentes, tendo em vista que a literatura possui poucas descrições especificamente em fetos equinos abortados.
- Verificar as lesões histopatológicas causadas pelas diferentes cepas de HVE-1 e pela *Leptospira* spp. em hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) inoculados experimentalmente como controles positivos.
- Realizar diagnóstico diferencial de causas infecciosas e não infecciosas em casos de abortamento e natimortalidade equina.
- Recomendar o manejo sanitário reprodutivo em plantéis equídeos baseado nos achados microbiológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A *LEPTOSPIRA* SPP. COMO AGENTE CAUSADOR DE ABORTAMENTOS EM EQUINOS E ZONOSE

2.1.1 O agente etiológico

A leptospirose é uma zoonose de grande importância social e econômica, por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, custo hospitalar elevado, e alta taxa de letalidade em humanos, que pode chegar a 40%, nos casos mais graves (BRASIL, 2010). A doença foi descrita pela primeira vez por Weil em 1886, porém o agente infeccioso somente foi observado em 1907, por Stimson e posteriormente cultivado por Inada em 1915 (FARRAR, 1991 *apud* REZENDE et al., 1997).

Em animais infectados por um sorovar ao qual a população esteja adaptada, de forma endêmica, a doença se manifesta de forma discreta ou instala-se o estado de portador renal, sendo capaz de eliminar as leptospiRAS na urina por longo período de tempo; já os hospedeiros acidentais (animais não adaptados ao sorovar) podem desenvolver as formas graves da doença (VANASCO et al., 2003).

A *Leptospira* spp., bactéria helicoidal (espiroqueta), aeróbica obrigatória, pertencente à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e compreende dois gêneros: *Leptospira* e *Leptonema* (LEVETT, 2004). Morfologicamente a *Leptospira* pode apresentar uma ou suas duas extremidades em forma de gancho, sua medida é de aproximadamente 10 a 20 μm de comprimento; apresenta dois filamentos axiais, denominados flagelos periplásmicos no envelope externo que permitem a sua movimentação (ELLIS, et al., 1983; FAINE et al., 2000; BRASIL, 2010) (Figura 1).



Figura 1 – Foto de microscopia eletrônica de varredura de *Leptospira* spp. **Fonte:** ADLER; MOCTEZUMA (2010).

Mais de 200 sorovares já foram identificados, e cada um tem o seu hospedeiro preferencial, podendo acometer diversas espécies de mamíferos e mesmo animais de sangue frio podem ser hospedeiros naturais da *Leptospira* spp., disseminando a infecção entre outros animais e no homem (BRASIL, 2010; ROMERO et al., 1994).

Com o advento e avanço da biologia molecular foi possível classificar as *Leptospiras* não apenas por suas características sorológicas (fenotípicas) e de virulência, mas também por meio de seu material genético, utilizando técnicas de hibridização do DNA, subdividiu o gênero em 17 genomoespécies; atualmente registra-se a existência de 20 espécies do gênero *Leptospira*, dentre as quais se subdividem em sete espécies não patogênicas, cinco espécies intermediárias e oito espécies patogênicas (YASUDA et al., 1987; AHMED et al., 2006; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009; SMYTHE et al., 2012).

2.1.2 Vias de transmissão e patogenia da *Leptospira* spp.

Os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita) constituem os reservatórios essenciais para a persistência de focos da infecção por *Leptospira* spp., sendo que o *R. norvegicus* é o portador principal do sorovar Icterohaemorrhagiae, um dos mais patogênicos para o homem (BRASIL, 2010). Animais domésticos das espécies canina, suína, bovina, equina, ovina e caprina também podem atuar como reservatórios de importância, uma vez que à semelhança dos roedores passam a eliminar as leptospirosas vivas no ambiente através da urina durante meses, anos ou até mesmo durante toda a vida (dependendo da espécie animal e do sorovar envolvido) (BRASIL, 2010).

A permanência da *Leptospira* spp. em um determinado ambiente depende diretamente dos fatores ambientais que favoreçam a sobrevivência e multiplicação das mesmas, alguns fatores como clima, solo, animais susceptíveis que atuaram como hospedeiros e reservatórios do agente em questão (FAINE et al., 1999).

A infecção humana é resultante principalmente da exposição direta ou indireta à urina de animais infectados. As leptospirosas penetram ativamente no organismo através de lesões cutâneas (escoriações, abrasões e feridas), ou mesmo pele íntegra quando imersa por longos períodos em água contaminada; ou ainda, através da mucosa oral, nasofaríngea, conjuntival, esofágica e, possivelmente, também a vaginal (REZENDE et al., 1997; BRASIL, 2010). A exposição a tecidos e sangue de animais infectados, a

transmissão acidental em laboratórios e a ingestão de água ou alimentos contaminados são formas de contágio de menor frequência; e a transmissão entre humanos é muito rara (BRASIL, 2010). Nos animais de produção, as principais fontes de contaminação são o contato com o solo ou água contaminados, ou contato direto com a urina ou líquidos e tecidos provenientes de abortamentos ocasionados pelo agente (FAINE et al., 1999) (Figura 2).

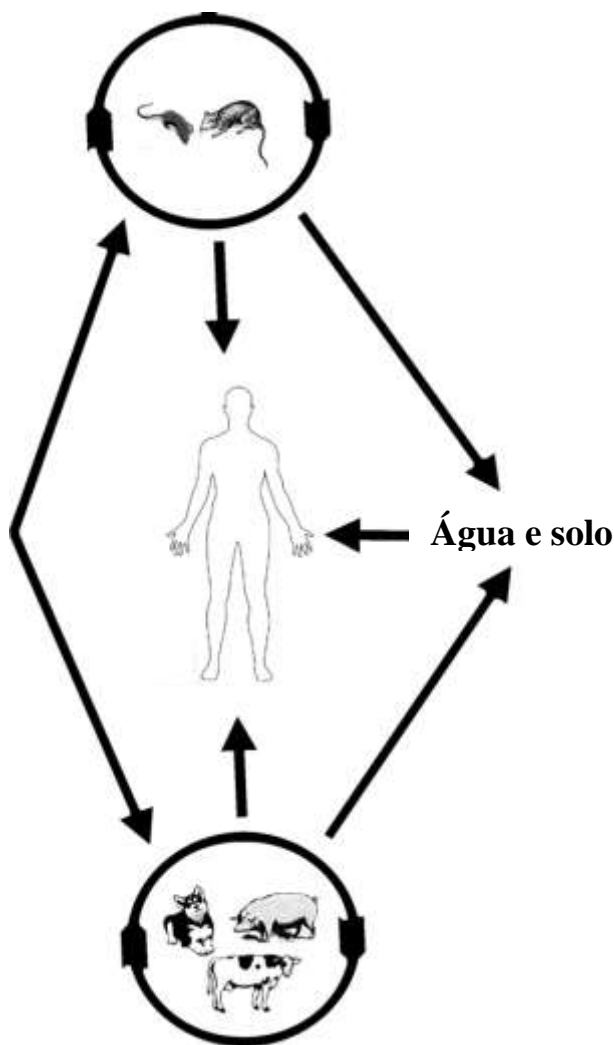


Figura 2 – Ciclo epidemiológico simplificado da leptospirose em seres humanos e animais.
Fonte: ADLER; MOCTEZUMA (2010).

Em seres humanos, ao atingir a corrente sanguínea, a *Leptospira* spp. replica e se instala em diferentes órgãos ou sistemas, representando o primeiro estágio da doença, ou fase precoce que dura em torno de sete dias. A doença se manifesta com início súbito de febre, cefaléia, mialgia, anorexia, náuseas e vômitos. Esta fase tende a ser autolimitada e

regride em três a sete dias, sem deixar sequelas. Após a primeira semana da doença, em aproximadamente 15% dos pacientes com leptospirose ocorre a evolução para manifestações clínicas graves, cuja manifestação clássica é conhecida como síndrome de Weil, caracterizada pela tríade de icterícia rubínica, insuficiência renal aguda e hemorragias, mais comumente pulmonar (REZENDE et al., 1997; BRASIL, 2010).

Monaham et al. (2009) classificam a doença em duas fases: fase aguda em que há leptospiremia (com duração de aproximadamente dez dias) e sintomas clássicos de leptospirose (descritos anteriormente), e fase crônica em que ocorre colonização dos túbulos renais pelas leptospiras levando à leptospirúria e consequente eliminação das leptospiras para o ambiente pela micção. O desenvolvimento da fase crônica é decorrente da ação da resposta imune do hospedeiro sobre o agente, não sendo capaz de eliminá-lo totalmente, mas mantendo-o em um sítio que permita a sobrevivência do agente e do hospedeiro simultaneamente (BHARTI et al., 2003).

As lesões encontradas em fetos equinos em decorrência de infecção por *Leptospira* spp. descritas na literatura são, na análise macroscópica: icterícia e hemorragias (petéquias, equimoses e sufusões) distribuídas difusamente sobre a pele, mucosa oral, tecido subcutâneo, serosas estomacais e também nos cascos do feto; fígado aumentado de tamanho, friável e de coloração amarelada a intensamente alaranjada; serosa e mucosa intestinal intensamente avermelhadas além de hemorragias puntiformes na serosa do ceco; nos rins, as regiões cortical e medular podem apresentar-se pálidas e hemorragias petequiais podem estar presentes na superfície capsular; esplenomegalia, hidrotórax, hemorragias petequiais e equimóticas na superfície epicárdica, bem como edema pulmonar e sufusões na pleura visceral (HODGIN et al., 1989; POONACHA et al., 1993; PESCADOR et al., 2004; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012).

Microscopicamente, são descritas as seguintes lesões: dissociação difusa de hepatócitos, hepatite linfoplasmocitária e pericolangite mononuclear difusa subaguda discreta, nefrite intersticial com moderada dilatação, hemorragias nas mucosas intestinais e edema discreto nos alvéolos pulmonares. Também são descritas lesões na placenta (em maior grau no córion), com infiltrado inflamatório perivascular com predominância de células mononucleares no alantocóron e áreas de degeneração celular (HODGIN et al., 1989; SWERCZEK, 1991; MACRUZ, 1991; POONACHA et al., 1993; PESCADOR et al., 2004; MARCOLONGO- PEREIRA et al., 2012).

2.1.3 Epidemiologia da *Leptospira* spp.

A distribuição das leptospirosas é universal, endêmica no Brasil, e apresenta maior prevalência nas zonas tropicais e subtropicais, devido aos fatores ecológicos e climáticos dessas regiões (longos períodos chuvosos), que favorecem a sua sobrevivência, particularmente nas capitais metropolitanas de baixa renda, onde as enchentes, associadas às condições de higiene e saneamento básico precário e à alta infestação de roedores infectados levam ao aumento do número de casos em seres humanos (REZENDE et al., 1997; BRASIL, 2010).

No Brasil, o primeiro caso de aborto equino por leptospirose foi notificado por Freitas, Gomes e Lacerda (1958). Nos equinos, a leptospirose pode se apresentar de duas formas: assintomática, ou com sintomatologia aguda bem marcante, sendo uma das principais causas da uveíte recorrente equina, que ao longo dos últimos anos tem sido apontada como causa frequente de abortos em éguas (PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005). A uveíte recorrente equina causa grandes perdas econômicas decorrentes da interrupção no treinamento, queda de performance e desqualificação dos animais de competição devido a sequelas geradas pela doença, bem como pela medicação utilizada (GILGER, 2003). De acordo com Sellnow (1999), após a entrada da bactéria no útero prenhe ocorre a infecção fetal que pode resultar no aborto, natimorto ou neonato fraco, dependendo da fase de gestação.

A importância econômica e epidemiológica da leptospirose em animais domésticos, incluindo a íntima relação ecológica com o homem, tem sido relatada em diversos países. Na equinocultura, sua importância está ligada às perdas decorrentes da infecção, da falta de uma vacina específica para a espécie no mercado e pelo fato de se tratar de uma zoonose (BRASIL, 2010; ROMERO et al., 1994; PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005).

Embora a imunização possa minimizar o surgimento de sinais clínicos, como abortamentos e nascimentos prematuros, uma vez instalado o quadro de portador renal crônico, não é capaz de eliminá-lo, atuando este animal como um importante reservatório, se mantido no plantel. Outra característica que deve ser levada em consideração em relação à leptospira é que as vacinas existentes no mercado são sorovar-específicas, não conferindo proteção frente a sorovares diferentes dos utilizados na fabricação da mesma, sendo fundamental o conhecimento do sorovar circulante na região, para que o esquema de vacinação seja efetivo (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

No Brasil, foram confirmados 17.416 casos de leptospirose em humanos (média anual de 3.483 casos) no período de 2004 a 2008, variando entre 3.084 (2008) a 4.390

casos (2006). Nesse mesmo período foram informados 1.856 óbitos, com média de 371 óbitos/ano (BRASIL, 2010).

Giorgi et al. (1981) relataram o primeiro isolamento de *Leptospira* spp. em feto equino no Brasil, realizado nos rins de um feto abortado de seis meses de idade da raça Quarto-de-Milha, por meio da técnica de cultura em meio Fletcher e a bactéria foi classificada como *L. icterohaemorrhagiae*. Posteriormente, exames histológicos nos rins, utilizando a técnica de Levaditti confirmaram a presença das leptospiros nestes órgãos.

Pires Neto, Hesse e Oliveira (2005) realizaram um levantamento sorológico envolvendo 1.169 amostras de soro equino encaminhadas ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (RS) no período de 2000 a 2003. Destas, 871 (74,51%) foram reagentes, sendo *L. Bratislava* o sorovar predominante (19,92%) e apenas 298 (25,49%) não reagiram com os sorovares testados.

Em um estudo utilizando a técnica de SAM para diagnóstico de leptospirose em águas de seis fazendas no Rio de Janeiro, obteve-se resultado de 42,96% (235/547) de positividade para diluição mínima 1:100 contra um ou mais sorovares; sendo que o sorovar predominante foi *L. icterohaemorrhagiae* - 43,40% (102), seguido por *L. Bratislava* - 27,23% (64) (LILENBAUM, 1998). Vários outros estudos também apontam o sorovar *L. icterohaemorrhagiae* como sendo o de maior frequência em equinos no Brasil (ROMERO et al., 1994; FAVERO et al., 2002; LINHARES et al., 2005).

Em um trabalho realizado na região de Nhecolândia, Corumbá, Estado de Mato Grosso do Sul, foram examinadas pela técnica de SAM para leptospirose 315 amostras de soros sanguíneos de diversas espécies de animais em estado feral e silvestres, obtendo o resultado de 20,3% (64/315) amostras reagentes para pelo menos um sorovar de leptospira patogênica. Neste mesmo trabalho, em 12 animais que vieram a óbito durante a captura, foram realizadas análises histopatológicas e imunohistoquímicas: o fígado de um porco-monteiro foi positivo na IHQ e foram observadas alterações histopatológicas nos rins deste mesmo animal (GÍRIO et al., 2003).

2.1.4 Diagnóstico da *Leptospira* spp.

O diagnóstico é realizado de acordo com a fase da doença em que o paciente se encontra: na fase precoce, técnicas de visualização das leptospiras no sangue, cultura em meios apropriados e inoculação em hamsters e reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizadas; na fase tardia, as leptospiras podem ser encontradas na urina, cultivadas ou inoculadas (BRASIL, 2010).

Embora os métodos acima citados apresentem maior sensibilidade e especificidade ao agente, devido às dificuldades em realizá-los ou a lentidão para a obtenção dos resultados (como no caso da cultura em que o resultado só é obtido após algumas semanas), são mais comumente utilizados no país os métodos sorológicos ELISA-IgM e SAM (BRASIL, 2010).

Exames complementares de maior complexidade como a IHQ, técnicas baseadas em PCR e tipagem de isolados clínicos também podem ser realizados (BRASIL, 2010).

A coloração de Warthin-Starry, técnica que cora as leptospiras por meio da impregnação pela prata em cortes histológicos de tecidos incluídos em parafina, também é frequentemente utilizada no diagnóstico de *Leptospira* apresentando bons resultados (HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004; LIMA et al., 2009; MARCHIORI FILHO, 2007).

Em um trabalho mais recente, também realizado por Haanwinckel, Cavalheiro e Oliveira (2007) para a detecção de *Leptospira* spp. em tecido renal de camundongos experimentalmente infectados, a técnica de imunoperoxidase mostrou-se pouco mais sensível em relação ao cultivo, embora ambas tenham apresentado bons resultados.

2.2.5 Tratamento e profilaxia – *Leptospira* spp.

O tratamento é sintomático, com utilização de fluidoterapia controlada e a antibioticoterapia (dihidro-estreptomicina) dos animais portadores da infecção. O sucesso no tratamento depende do estágio de evolução da doença, sendo importante iniciá-lo frente à primeira suspeita da doença, uma vez que, no tratamento tardio, em geral não se obtém bons resultados devido ao alto grau de comprometimento dos tecidos hepático e renal e as complicações causadas pelo mal funcionamento destes órgãos (MARTINS; PENNA; LILENBAUM, 2010).

O controle da doença envolve cuidados na aquisição dos animais, sempre atentando à procedência dos mesmos e manejo adequado do ambiente, uma vez que a sobrevivência das *Leptospiras* spp. está direta e fortemente ligada às condições ambientais. Deve-se ter atenção na identificação e eliminação de possíveis fontes de infecção dentro da propriedade, e atenção a fatores de atração e proliferação de roedores no local, tais como: local e condições de armazenamento incorretos dos alimentos dos animais (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

A vacinação sistemática de animais domésticos (cães, bovinos e suínos) não impede que os mesmos se infectem, apenas evita que eles adoeçam pelos sorovares componentes da vacina. Sendo assim, estes animais mesmo vacinados ainda podem apresentar leptospirúria, tornando-se fontes de infecção, porém em um grau mais leve e por um período menor que o observado na infecção por animais não vacinados. Ainda não existe vacina contra leptospirose para humanos (BRASIL, 2010).

2.2 ABORTO EQUINO A VÍRUS (HERPESVÍRUS EQUINO - 1)

2.2.1 O agente etiológico

O Herpesvírus Equino tipo 1 (HVE-1) é classificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2014) como DNA-vírus envelopado, com capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 3), pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. Trata-se de um vírus cosmopolita, endêmico e com elevado potencial de disseminação sendo considerado importante patógeno nas populações de cavalos em todo o mundo (CRABB; STUDDERT, 1995; CARVALHO et al., 2000a).

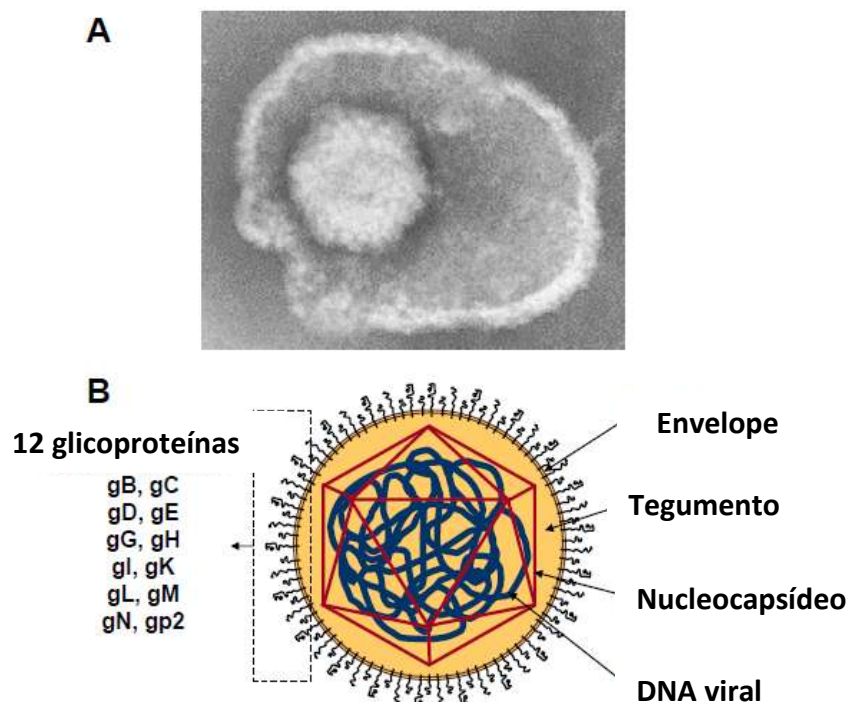


Figura 3: Herpesvírus equino -1. **(A)** Microscopia de transmissão eletrônica (*Animal Health Trust*). **(B)** Esquema da estrutura do HVE-1. Fonte: PAILLOT et al. (2008).

Existem cinco diferentes espécies de herpesvírus para as quais o cavalo doméstico é o hospedeiro natural: dentre estas cinco espécies os subtipos 2 e 5 são classificados na subfamília *Gamaherpesvirinae*, enquanto que os subtipos 1, 4 e 3 pertencem à subfamília *Alfaherpesvirinae*, que se compõe de espécies cujo ciclo replicativo é relativamente curto e apresentam rápida disseminação em cultivos celulares (Quadro 1).

O HVE é um agente de fácil inativação, por se tratar de um vírus envelopado, sendo sensível a éter, altas temperaturas, pH ácido e desinfetantes comuns que contém surfactantes, iodo e fenóis (CARVALHO, 2005; ROIZMANN et al., 1992; WEIBLEN et al., 1994).

Quadro 1 - Principais herpesvírus de alguns membros da família *Equidae* (São Paulo – 2012).

Vírus	Sinônimos	Subfamília	Gênero	Hospedeiro natural	Doença
EHV-1	Vírus do abortamento equino (antigo EHV-1 subtipo 1)	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equuscaballus</i>	Respiratória, abortamento, neurológica
EHV-2	Antigo citomegalovírus equino	γ	<i>Percavirus</i>	<i>Equuscaballus</i>	Rinite e conjuntivite
EHV-3	Vírus do exantema coital equino	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equuscaballus</i>	Exantema coital
EHV-4	Vírus da rinopneumonite equina (antigo EHV-1 subtipo 2)	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equuscaballus</i>	Respiratória
EHV-5	Antigo citomegalovírus equino	γ	<i>Percavirus</i>	<i>Equuscaballus</i>	NA
EHV-6	Herpesvírus asinino tipo 1 (AHV-1 ou AsHV-1)	α	<i>Varicellovirus(?)</i>	<i>Equusasinus</i>	Exantema coital
EHV-7	Herpesvírus asinino tipo 2 (AHV-2 ou AsHV-2)	γ	NC	<i>Equusasinus</i>	NA
EHV-8	Herpesvírus asinino tipo 3 (AHV-3 ou AsHV-3)	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equusasinus</i>	Rinite
EHV-9	Herpesvírus de gazela (GHV) Herpesvírus de zebra	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equusgrevyi</i>	Neurológica
AHV-4	Herpesvírus asinino tipo 4 (AHV-4 ou AsHV-4)	γ	NC	<i>Equusasinus</i>	Pneumonia
AHV-5	Herpesvírus asinino tipo 5 (AHV-5 ou AsHV-5)	γ	NC	<i>Equusasinus</i>	Pneumonia
AHV-6	Herpesvírus asinino tipo 6 (AHV-6 ou AsHV-6)	γ	NC	<i>Equusasinus</i>	Pneumonia

ZHV ou EzebGHV-1	Herpesvírus de zebra tipo 1 ou <i>Equus zebra gammaherpesvirus 1</i> (antigo <i>Equus zebra rhadinovirus 1</i>)	γ	NC	<i>Equus zebra</i>	NA
WAHV	Herpesvírus de jumento selvagem	γ	NC	<i>Equussomalicus</i>	NA

α : Alphaherpesvirinae; γ :Gammaherpesvirinae; NC: não classificado; NA: não associado.

Fonte: dados brutos - King et al. (2011) *apud* Mori, 2012b.

O processo de replicação viral (Figura 4) ocorre por meio da ligação do vírus à membrana citoplasmática e sua posterior entrada no citoplasma por meio de glicoproteínas de membrana do vírus que se ligam aos receptores da membrana citoplasmática da célula hospedeira, iniciando a fusão das duas membranas. Nucleocapsídeos desencapsulados, contendo o genoma viral (hexágonos vermelhos) são liberados para o citoplasma e transportados para os poros da membrana nuclear. Em seguida, o DNA viral é liberado no núcleo.

Na transcrição, três classes de genes virais são transcritos e traduzidos em proteínas imediatas, mediatas e tardias; as proteínas imediatas-primárias (amarelo) participam na transcrição adicional. A replicação ocorre por meio das proteínas mediatas (verde), que sintetizam novas moléculas de DNA virais utilizando o DNA de entrada circulante como modelo. A montagem e aquisição de capsídeos, e saída nuclear ocorrem por meio das proteínas tardias (azul), que montam o capsídeo, e incorporam o DNA viral recém-replicado. Após esta etapa, nucleocapsídeos deixam o núcleo por brotamento através da membrana nuclear interna (em um processo denominado envelopamento) para o espaço perinuclear. Finalmente, por meio de um complexo processo de perda e reaquisição do envelope, as partículas do vírus maduro alcançam as vesículas exocíticas, que se fundem com a membrana plasmática e partículas de novos vírus são liberadas no espaço extracelular.

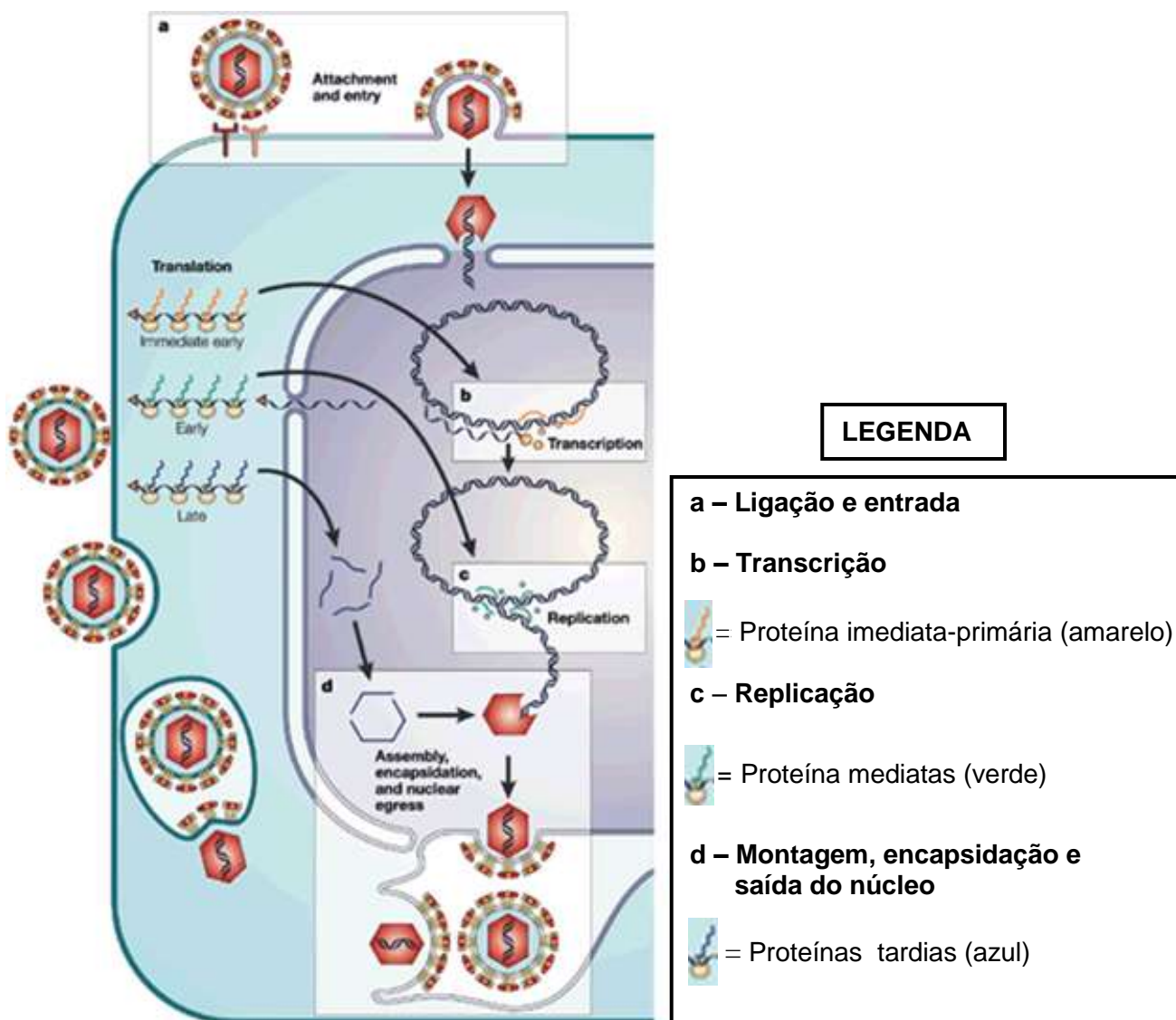


Figura 4 – Desenho esquemático da replicação viral do Herpesvírus Equino. **Fonte:** COEN; SCHAFFER (2003).

2.2.2 Vias de transmissão e patogenia do HVE-1

A principal porta de entrada do HVE-1 é o epitélio da mucosa do trato respiratório superior, na qual a infecção primária se instala pela multiplicação viral local (ALLEN, 2002; KOTAIT, 1991; OSTLUND, 1994). Em seguida ocorre viremia primária de células mononucleares do sangue periférico (CMNSP), principalmente linfócitos B e T, que permite que o vírus atinja outros sistemas orgânicos, sendo transportado pelos leucócitos até o útero por via hematogena (Figura 5) (SÁENZ; GÓEZ; HERRERA, 2008).

As alterações causadas pela atividade viral nos vasos sanguíneos do endométrio produzem um quadro de vasculite severa e trombose multifocal, causando abortos no último terço da gestação (entre o 7º e o 11º meses), morte perinatal e mieloencefalopatia herpética, caracterizada por síndromes neurológicas. Estes diferentes tipos de enfermidades podem ocorrer associados ou não (ALLEN; BRYANS, 1986; BRYANS; ALLEN, 1989; CRABB; STUDDERT, 1995). O aborto normalmente ocorre após infecção respiratória leve; o feto e a placenta são expulsos não autolisados, e não há retenção de placenta nem lesão no trato reprodutivo da fêmea (SILVEIRA, 2005). O feto morre no início da expulsão, devido à repentina separação placentária do endométrio e ao edema pulmonar (MILLER; TURK, 1993; ALLEN, 2002).

Na necropsia de fetos abortados, normalmente são observadas a presença de edema e congestão dos pulmões, com acúmulo de fluido pleural e ascite, além de focos necróticos de coloração cinza no fígado, pulmões, baço e nos centros germinativos dos linfonodos, com tamanho variando entre dois e quatro milímetros. Estes fetos equinos são capazes de produzir anticorpos para HVE-1 por volta dos 200 dias de gestação, permitindo o diagnóstico laboratorial (MCKINNON; VOSS, 1993).

Em potros recém-nascidos acometidos pela doença perinatal, a necropsia frequentemente revela um quadro severo de pneumonia intersticial, lesões no fígado, no tecido linforreticular e glândulas adrenais (TIMONEY, 1992).

O vírus aloja-se nos linfonodos e no nervo trigêmeo, no qual permanece em estado de latência; a reexposição ao vírus ou fatores estressantes pode levar a novos quadros da infecção durante toda a vida do animal (EDINGTON; WELCH; GRIFFITHS, 1994; WELCH et al., 1992).

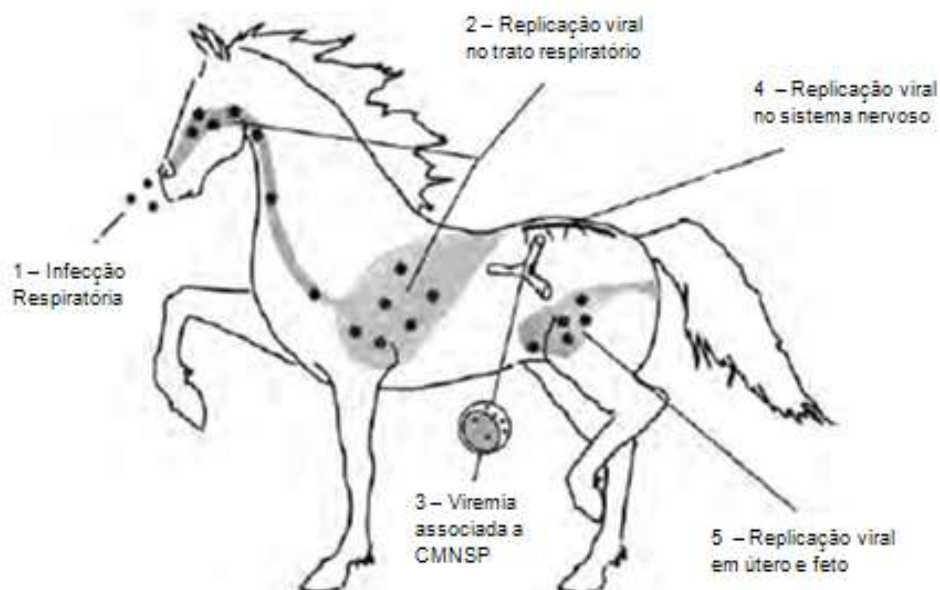


Figura 5 - Representação esquemática dos eventos que ocorrem em uma infecção primária por HVE-1 ou HVE-4 em um animal suscetível. Os números indicam a ordem em que os eventos ocorrem. **Fonte:** SÁENZ; GÓEZ; HERRERA, (2008).

Embora mais raramente, há registros de que algumas espécies não equídeas – como bovinos, lhamas, alpacas, gazelas e antílopes – foram infectados pelo HVE-1, desenvolvendo enfermidades como o abortamento e encefalite (CRANDELL et al., 1979; FUKUSHI et al., 1997).

A literatura destaca três principais fontes de infecção natural do HVE-1: animais ativamente infectados, que eliminam o vírus nas secreções respiratórias da nasofaringe e/ou fômites contaminados (ALLEN; BRYANS, 1986; KOTAIT, 1991); fetos abortados e seus envoltórios, ou secreções provenientes do trato reprodutivo de éguas imediatamente após o abortamento (NORDENGRAHN, 2000), e a infecção por meio da reativação endógena do vírus, em indivíduos portadores de infecção latente (CRABB; STUDDERT, 1995; KOTAIT, 1991). Segundo Carvalho et al. (2000b), o sêmen de garanhões persistentemente infectados é um potencial transmissor do HVE-1, durante a cópula ou pela inseminação artificial.

2.2.3 Epidemiologia do HVE-1

Alguns fatores interferem e complicam a epidemiologia do HVE-1, como por exemplo, a reatividade antigênica cruzada entre o HVE-1 e o HVE-4 através do diagnóstico sorológico convencional (técnica de vírusneutralização) e a possibilidade do vírus latente estar presente em animais sorologicamente negativos (ALLEN; BRYANS, 1986).

No Brasil, a primeira descrição do HVE-1 relacionada ao abortamento, ocorreu em 1964 por Corrêa e Nilsson, porém somente em 1966 é que o vírus foi isolado e identificado (CORRÊA; NILSSON 1964; NILSSON; CORRÊA, 1966).

Cunha et al. (2009) realizaram um estudo sobre a prevalência de agentes virais em equídeos do Vale do Ribeira - Estado de São Paulo, em que 26% (42/163) dos animais testados apresentaram anticorpos contra o HVE-1 pela técnica de vírusneutralização.

Ainda utilizando esta mesma técnica, outros estudos obtiveram os seguintes resultados: Weiblen et al. (1994) relataram que o diagnóstico sorológico para detecção do HVE-1 realizado no Rio Grande do Sul revelou uma prevalência de 84,7% (295/348) das amostras testadas, enquanto Aguiar et al. (2008), num estudo realizado no município de Monte Negro em Rondônia, Amazônia Ocidental, observaram que entre as 47,7% (32/67) das propriedades que possuíam equídeos, um total de 22,7% (40/176) dos animais eram soropositivos para HVE-1. No Estado do Pará, a soroprevalência observada foi 17,71 % e no Paraná 14,3 % utilizando a técnica de vírusneutralização em cultivo viral (LARA et al., 2003).

No Estado de Minas Gerais, Lara et al. (2010) num estudo de equídeos criados em dez Delegacias Regionais do Estado de Minas Gerais: Almenara, Bambuí, Curvelo, Governador Valadares, Montes Claros, Oliveira, São Gonçalo do Sapucaí, Teófilo Otoni, Unaí e Viçosa, os autores encontram frequência de 18,7% (140/749) de equinos positivos ao HVE-1, por meio da técnica de vírusneutralização, demonstrando que o encontra-se amplamente disseminado no Estado uma vez que todas as regiões estudadas apresentaram animais sororreagentes.

Lara et al. (2006), em estudo sobre a detecção de HVE em cavalos carroceiros de Curitiba e região metropolitana do Paraná constataram que apesar destes animais realizarem tráfego diário em centros urbanos e terem pouco acesso à assistência veterinária, os mesmos apresentavam taxas de infecção por HVE-1, menores 5,1% (5/97) quando comparados a estudos sorológicos realizados em cavalos de alto valor utilizados para esportes, exposições e reprodução, provavelmente devido ao manejo destes animais (proximidade uns dos outros em virtude de leilões, torneios e exposições), que seria um facilitador para a transmissão do vírus por aerossóis. Além disso, os proprietários destes

animais geralmente possuem apenas um animal, e o mesmo transita sempre em áreas urbanas, o que também diminui a probabilidade de contato deste animal com outros possivelmente infectados.

No seu conjunto, as informações disponíveis indicam que o HVE-1 está circulando de forma endêmica nas populações equinas do Sul e do Sudeste brasileiros (CARVALHO, 2005).

2.2.4 Diagnóstico do HVE-1

O diagnóstico *post-mortem* pode ser realizado por meio das técnicas de imunofluorescência, imunoperoxidase, isolamento do agente, testes sorológicos (vírusneutralização e ELISA) e PCR (THOMSON et al., 1976; DUTTA; TALBOT; MYRUP, 1983; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1990).

Existem diversos fatores que complicam o diagnóstico da ocorrência do EHV-1 ou 4, incluindo-se a sobreposição de certos sinais clínicos àqueles induzidos por outros patógenos equinos (WEIBLEN, 1998). São exemplos o vírus da influenza equina (subtipos 1 e 2) para as infecções respiratórias, o vírus da arterite equina (doença respiratória e abortos), o protozoário da mieloencefalopatia *Sarcocystis neurona* causador de alterações neurológicas (FERNANDES, 1999; SILVEIRA, 2005), e o *Toxoplasma gondii*, agente causal de abortamento e encefalite (VILLALOBOS, 2012).

Atualmente, as técnicas de PCR e imunoperoxidase estão sendo largamente utilizadas, visando uma melhoria na detecção do herpesvírus equino. Ainda, de acordo com Mackie et al. (1996), a técnica de PCR pode comprovar a presença viral avaliando a presença do DNA do herpes vírus. Vários *loci* têm sido descritos para a amplificação pela PCR a partir de fontes distintas de material biológico, como amostras clínicas, cultivos celulares e cortes histológicos parafinados (RIMSTAD; EVENSEN, 1993; MACKIE et al., 1996). Este método diagnóstico apresenta alta sensibilidade e especificidade, rapidez na obtenção dos resultados (um a dois dias), possibilidade de detecção da expressão de proteínas ou ácido nucléico em amostras nas quais o vírus não permanece viável e capacidade de diferenciar os tipos de herpes vírus (SMITH, 1993; STUDDERT et al., 2003; MORI, 2005; MORI et al. 2009).

A IHQ utiliza enzimas conjugadas a um anticorpo secundário para detecção do anticorpo primário. A enzima reage com um substrato colorimétrico formando um precipitado que pode ser visto com luz de microscópio padrão (OAKS, 2007). Por meio das

técnicas imunoenzimáticas, pode-se realizar conjuntamente a identificação do agente infeccioso (IHQ) e a avaliação das lesões histopatológicas (OIE, 2008) (Figura 6).

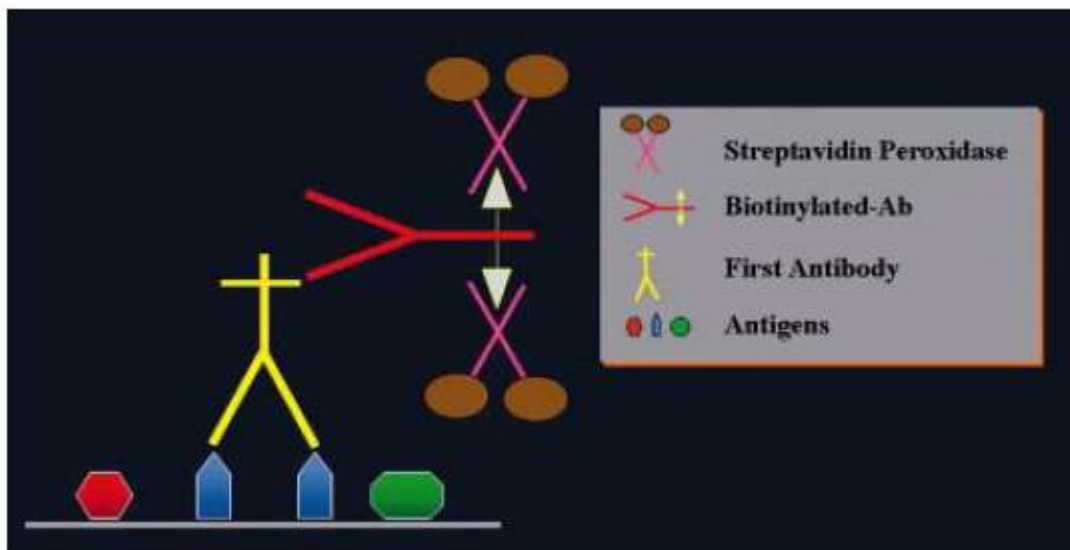


Figura 6 - Desenho esquemático da reação de Imunohistoquímica pelo método LSAB.

Fonte: RAMOS-VARA (2005).

Segundo Schultheiss, Collins e Carman (1993), a imunoperoxidase em cortes de tecidos emblocados em parafina é um teste específico e sensível para o HVE-1, entretanto, observou-se que nem sempre a correlação foi 100% entre a imunoperoxidase e o isolamento viral. Os autores avaliaram 20 casos de aborto equino, onde 7 (35%) foram positivos na imunoperoxidase, isolamento viral e imunofluorescência, bem como apresentavam lesões histopatológicas típicas. Um total de 6 (30%) casos foram negativos em todos os testes. O caso número 20 foi considerado negativo a despeito de marcação positiva para imunoperoxidase no timo, porque todos os outros testes foram negativos. Dos seis casos restantes, três foram positivos no isolamento viral e apresentaram lesões típicas histológicas, e dois foram positivos na imunoperoxidase e tinham lesões histológicas no pulmão, fígado ou placenta. O caso número 17 foi positivo para imunoperoxidase e as outras análises não foram feitas devido autólise.

Tecidos fixados em formol e posteriormente emblocados em parafina são mais facilmente processados e apresentam melhor morfologia, em relação a cortes de tecidos congelados para imunofluorescência direta (IFD), além disso, as reações cromogênicas são tecnicamente mais fáceis de interpretar que as reações de imunofluorescência, cuja

maioria dos ensaios tem demonstrado sensibilidade e especificidade limitadas quando comparadas às técnicas atuais de IHQ (OAKS, 2007).

Segundo a OIE (2008), métodos imuno-enzimáticos ou métodos de coloração (por exemplo, imunoperoxidase) podem facilitar a identificação do vírus em amostras de tecido de arquivamento, ou em casos clínicos em que os métodos tradicionais de isolamento, PCR, virusneutralização para detecção de HVE não apresentam bons resultados em função do envio inadequado dos materiais para as referidas análises (por exemplo, materiais fixados em formol). Como tecidos processados (tecidos de arquivamento) apresentam boa durabilidade, estudos retrospectivos também podem ser realizados por meio da IHQ (SCHULTEISS; COLLINS; CARMAN, 1993).

Estudo realizado por Easton et al. (2009), no Uruguai, utilizando a IHQ, revelou que o HVE-1 estava associado a lesões teciduais em um feto equino abortado. Em um trabalho realizado por Szeredi, Aupperle e Steiger (2003), de 11 casos positivos para HVE-1, em cinco amostras de membranas fetais (45% das amostras), o antígeno pôde ser detectado pela IHQ. Em casos em que não há ocorrência de alterações histopatológicas específicas nas membranas fetais, esta técnica pode ser de grande valor diagnóstico.

As lesões histopatológicas do HVE-1 em cortes de fígado, rins, coração, pulmão, baço e cérebro têm sido descritas por alguns autores, causando infiltrado inflamatório mononuclear em diversos órgãos e inclusão intranuclear eosinofílica em hepatócitos e neurônios (OSTLUND, 1994; DEL PIERRO, 1999).

Segundo Schultheiss, Collins e Carman (1993), em geral as lesões histopatológicas são consideradas características de HVE-1 e não patognomônicas, portanto, o diagnóstico final deverá ser apoiado por um teste laboratorial específico, como a IHQ.

2.2.5 Tratamento e profilaxia do Herpesvírus Equino - tipo 1

A vacinação é recomendada na profilaxia do HVE-1, há duas vacinas fabricadas a partir de vírus vivo (não disponível no Brasil), ou agentes virais inativados, entretanto, a imunidade induzida pela vacina é de curta duração e nenhuma das vacinas é capaz de propiciar total proteção contra todas as formas de HVE devido à variabilidade antigênica, sendo recomendada a revacinação anual para cavalos jovens e no 5º, 7º e 9º mês de prenhez para éguas prenhes. A imunidade passiva (anticorpos colostrais) é capaz de

oferecer proteção por um período muito curto, sendo necessária também a vacinação dos potros paridos por éguas vacinadas aos três meses de idade (SMITH, 1993).

A profilaxia consiste no isolamento dos animais suspeitos da doença ou com sintomatologia característica de infecção herpética. Em casos de abortamento, deve-se isolar o feto e as membranas fetais em recipiente adequado, não deixando nenhum material contaminante no chão e desinfetar o local imediatamente. A revacinação é recomendada a fim de prevenir novos surtos da doença (OSTLUND, 1994).

Os animais com sintomas respiratórios ou de abortamento devem ficar isolados em baias distantes dos demais, aquecidas e sem corrente de ar. A oferta de água deve ser constante e em casos febris (40,5°C), faz-se necessária fluidoterapia com a associação de antipiréticos e anti-inflamatórios não-esteroidais, por exemplo, fenilbutazona 3mg/Kg VO a cada 12 ou 24 horas ou flunixin meglumine 1,1 mg/Kg IM a cada 12 ou 24 horas, o animal deve ficar em repouso até seu completo restabelecimento (WEIBLEN, 1998; ALLEN, 2002). Drogas antivirais, como por exemplo, análogos acíclicos de nucleosídeos (10-15 mg/Kg VO a cada 8 horas) também podem ser utilizados (DEL PIERO; 1999).

2.3 OUTRAS CAUSAS DE ABORTAMENTO EQUINO

Segundo Grunert, Birgel e Vale (2005), a etiologia e patogenia do abortamento e parto prematuro em equinos pode ser causada por inúmeros agentes não infecciosos (Quadro 2) e infecciosos (Quadro 3).

Quadro 2 – Agentes etiológicos de origem não-infecciosa causadores de abortamentos ou partos prematuros em equinos (Adaptado de MOREIRA, 1992; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Agentes Tóxicos	Medicamentos	Fatores Mecânicos
-Endotoxemia	-Estrógenos -Prostaglandinas -Corticosteróides -Ocitocina	-Iatrogênicos (exame vaginal) -Gestação gemelar -Enfermidades (torção uterina) -Traumas -Carências (progesterona; idade) -Malformações congênitas -Anormalidades do cordão umbilical -Asfixia perinatal -Prenhez de corpo uterino

Quadro 3 - Agentes etiológicos causadores de abortamentos ou partos prematuros de origem infecciosa em equinos (Adaptado de MOREIRA, 1992; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

AGENTES BACTERIANOS	Frequentes	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Salmonella abortus equi</i> -<i>Streptococcus zooepidemicus</i> -<i>Leptospira interrogans</i>, sorovar <i>Pomona</i> -<i>Taylorella equigenitalis</i>
	Esporádicos	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Staphylococcus</i> spp. -<i>Rhodococcus equi</i> -<i>Streptococcus</i> spp. -<i>Streptococcus equi</i> -<i>Escherichia coli</i> -<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -<i>Corynebacterium equi</i> -<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> -<i>Actinobacillus equii</i> -<i>Klebsiella</i> spp. -<i>Pasteurella hemolytica</i> -<i>Brucella abortus</i> -<i>Listeria monocytogenes</i> -<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> -<i>Sarcina</i> spp. -<i>Taylorella equigenitalis</i> -<i>Campylobacter</i> spp. -<i>Mycoplasma</i> spp.
FUNGOS E LEVEDURAS		<ul style="list-style-type: none"> -<i>Aspergillus fumigatus</i> -<i>Mucorales</i> sp. -<i>Allescheria boydii</i> -<i>Coccidioides immitis</i> -<i>Cryptococcus</i> spp.
VÍRUS		<ul style="list-style-type: none"> -Herpesvírus tipo 1 -Vírus da arterite dos equinos -Vírus da anemia infecciosa
PROTOZOÁRIOS		<ul style="list-style-type: none"> -<i>Trypanosoma equiperdum</i> -<i>Babesia equi</i> -<i>Babesia caballi</i> -<i>Bedsonia</i> spp. -<i>Sarcocystis</i> spp.

Em diversos estudos, as principais causas de abortamento foram infecções de origem bacteriana. Laugier et al. (2011) relataram um total de 38,1% (695/1.822) fetos abortados por infecções bacterianas e 35,0% (638/1822) casos de abortamento por placentite e septicemia fetal; o *Streptococcus* sp., representado principalmente pelo tipo Beta hemolítico, foi causador de 40,1% dos abortamentos de origem bacteriana, seguido de agentes como *S. zooepidemicus* 27,3%; *Staphylococcus* sp. 15,0% (sendo *Staphylococcus aureus* causador de 9,6% dos casos de estafilococose), *Escherichia coli* (11,7%); *Klebsiella pneumoniae* (11,2%).

Moreira et al. (1998) encontraram em 38 amostras de fetos equinos 44,7% (17) *Streptococcus* Beta hemolítico (17,6%), *Klebsiella* spp. (11,8%), *Escherichia coli* (11,8%), *Pseudomonas* spp. (11,8%) e *Staphylococcus* spp. (11,8%).

Genovez et al. (1995) relataram taxa de abortamento por agentes bacterianos de 19,8% (21/106), com maior frequência de isolamento dos seguintes agentes: *Streptococcus* Beta hemolítico (14,3%), *Leptospira* spp. (9,5%), *Rodococcus equi* (9,5%), *Salmonella* spp. (4,8%), *Listeria monocytogenes* (4,8%), *Klebsiella oxytoca* (4,8%), *Escherichia coli* (4,8%).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados no presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB), registrado sob o número do protocolo CETEA 106/10, aprovado em 26 de outubro de 2010 (ANEXO 1). O projeto também foi registrado no Sistema de Informações Gerenciais do Agronegócio (SIGA) recebendo o Número de Registro de Projeto (NRP) 3773. Este projeto recebeu o Auxílio à Pesquisa Fapesp 2012/00277-0.

Foram avaliados no período de janeiro/2010 a julho de 2013 pelas técnicas histológicas de coloração H.E. e IHQ, e pelas técnicas virológicas de isolamento viral e identificação pela PCR e bacteriológicas de isolamento bacteriano e PCR, um total de 105 fetos ou natimortos/potros até 30 dias encaminhados ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo para diagnóstico diferencial de causas infecciosas de abortamento.

Foram coletados fragmentos de cérebro, fígado, coração, rim, pulmão, linfonodos, baço, placenta e cordão umbilical (quando enviados) e aliqüotados para análise histopatológica e virológica para pesquisa de HVE-1. Para pesquisa de *Leptospira* foram coletados fígado e rim para análise histopatológica e bacteriológica. Para a pesquisa de outras bactérias ou fungos foram coletados fragmentos de cérebro, fígado, coração, rim, pulmão, baço e aliqüotados para análise histopatológica e bacteriológica. O conteúdo estomacal também foi colhido para a pesquisa de agentes bacterianos (técnicas bacteriológicas). As análises foram realizadas em diferentes Laboratórios do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo (Quadro 4) e as amostras foram distribuídas para os diferentes laboratórios de acordo com o Fluxograma abaixo (Figura 7):

Quadro 4 – Número de animais analisados em diferentes Laboratórios do Instituto Biológico – SP, para diagnóstico de causas de abortamento e mortalidade perinatal equina.

Laboratório – Instituto Biológico de São Paulo	Tipo de técnica laboratorial	Nº de animais analisados
Laboratório de Raiva e Encefalites	Técnicas virológicas	105
Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução	Técnicas bacteriológicas	53
Laboratório de Anatomia Patológica	Técnicas histopatológicas	105

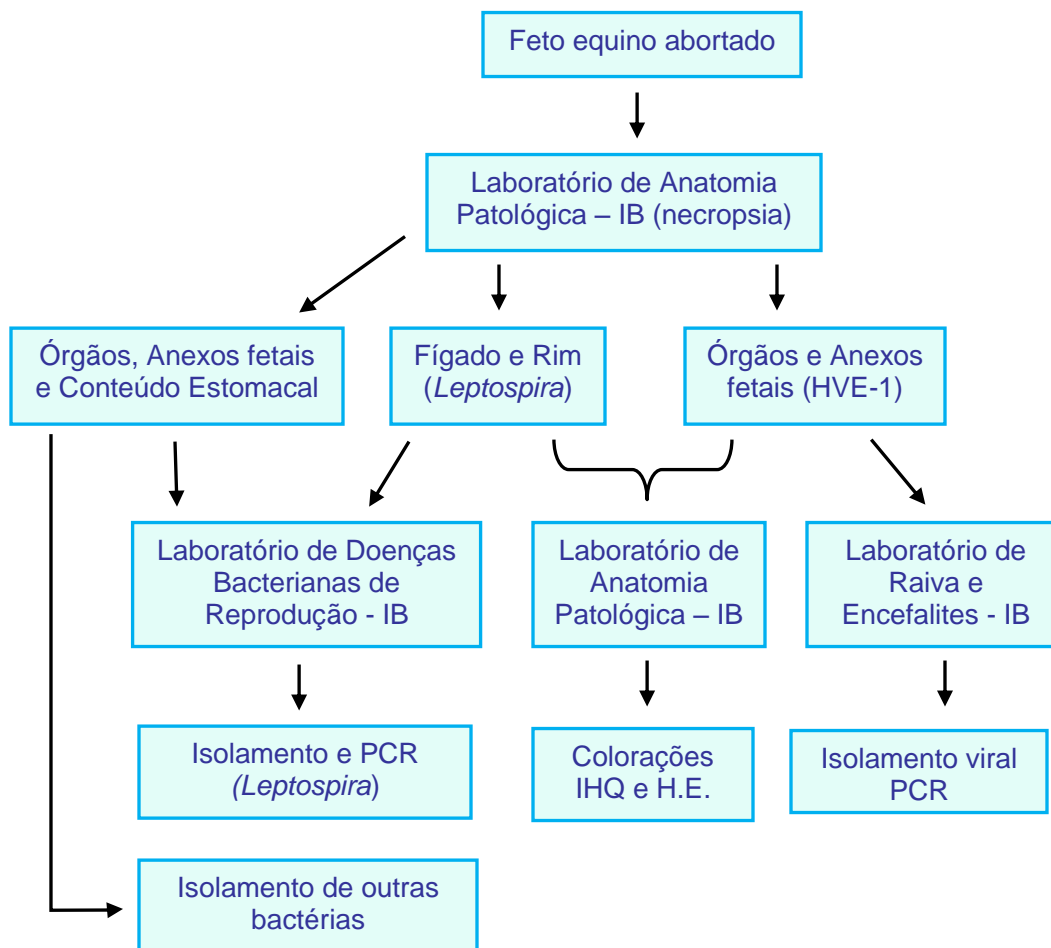


Figura 7: Fluxograma da distribuição e processamento das amostras.

3.1 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS:

3.1.1 Inclusão em parafina e coloração H.E.

Os diversos órgãos foram fixados em solução de formol tamponado a 10%, por um período de 48 horas. Posteriormente foi realizada a bateria de desidratação onde o material passou por soluções de crescentes concentrações de álcool etílico, diafanização pelo xilol, impregnação em parafina líquida e inclusão em parafina (PROPHET, 1995).

O tecido incluído em parafina foi cortado em micrótomo (3 µm de espessura), estendido em banho-maria (60°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com albumina, para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina. Em seguida, a lâmina ficou em estufa 65°C com ventilação forçada para início da desparafinização e posterior coloração pela hematoxilina/eosina (ALLEN, 1995).

3.1.2 Preparo do material para a IHQ

A produção do anticorpo primário utilizado na IHQ para *Leptospira* spp. foi realizada segundo protocolo de Faine (1994), onde a fração globulínica utilizada como anticorpo primário foi separada dos outros componentes séricos por meio de sulfato de amônio, título 12.400 para *Leptospira* sorovar Canicola, estirpe LO4. O bloco controle positivo para IHQ utilizou a mesma estirpe de *Leptospira*. Este anticorpo primário, bem como o bloco controle positivo para IHQ foram produzidos com verba do Auxílio Pesquisa Fapesp 2009/13864-8.

Para a IHQ de HVE-1 foi utilizado anticorpo primário comercial, fabricado pela empresa VMRD[®] Inc. catálogo 210-70-VER. Um desafio de IHQ adicional foi realizado nos controles para HVE-1 e nos fetos positivos na PCR, utilizando o anticorpo primário anti-HVE-1 policlonal produzido em coelhos a partir da inoculação do isolado AR8 da Universidade de La Plata (GALOSI et al., 1998; OCAMPOS; BARBEITO, GALOSI, 2011) a fim de verificar a sensibilidade deste anticorpo primário frente aos isolados brasileiros.

A reação de IHQ para utilização em cortes de parafina pela técnica histológica descrita anteriormente seguiu o protocolo de Haanwinckel, Megid e Souza (2004). A IHQ tanto para *Leptospira* quanto HVE-1 empregaram o kit de anticorpos secundários LSAB da DAKO[®] e o kit cromógeno revelador DAB da DAKO[®], segundo protocolo do fabricante. Cortes de sistema nervoso central (SNC) e pulmões incluídos em parafina foram processados para IHQ de HVE-1 e cortes de fígado e rim incluídos em parafina foram processados para IHQ de *Leptospira*. Cada bateria de lâminas processadas pela IHQ conteve um controle positivo e dois controles negativos.

3.1.3 Preparo dos controles negativos para *Leptospira* spp.

Para o grupo controle negativo de *Leptospira* spp. dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com três semanas de idade, pesando entre 40 e 50 g (gramas), não inoculados serviu de controle negativo para o estudo da *Leptospira* spp.

Controle negativo *Leptospira* spp. – fragmentos de rins e fígado de hamsters não inoculados. Para o estudo da *Leptospira* spp. optou-se por focar somente nos órgãos de predileção da bactéria (fígado e rim).

3.1.4 Preparo dos controles positivos para *Leptospira* spp.

Um grupo de quatro hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com três semanas de idade, pesando entre 40 e 50 g, sob anestesia inalatória com sevoflurano foram inoculados via intraperitoneal com 50 µL de meio de cultivo com cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, estirpe LO4. Foram efetuadas passagens sucessivas para ativar a virulência da cepa, o que pode ser verificado com o óbito do hamster em três dias.

Controle positivo *Leptospira* - fragmentos de rins e fígado de hamsters inoculados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4, virulenta. Estes controles foram produzidos com o Auxílio Fapesp 2009/13864-8 pelo Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo.

Os animais controles de *Leptospira* spp. foram distribuídos de acordo com o quadro abaixo (Quadro 5).

Quadro 5 – Distribuição dos animais para efetuação dos controles de *Leptospira* spp.

Espécie	Grupo	Nº de animais	Inóculo	Volume	Via de inoculação
Hamster	Controle	2	Não inoculado	NA	NA
Hamster	Infectado	4	<i>Leptospira interrogans</i> sorovar Canicola, estirpe LO4	50 µL	Intraperitoneal

3.1.5 Preparo dos controles negativos de HVE-1

Para o grupo controle de HVE-1, quatro hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com três semanas de idade, pesando entre 40 e 50 g (gramas), sob anestesia inalatória com sevoflurano foram inoculados por via intranasal com um volume de 50µL de meio Eagle (meio essencial mínimo – MEM) não infectado.

Controle negativo HVE-1 – fragmento de pulmão e SNC de hamsters inoculados com meio de cultivo (MEM).

3.1.6 Preparo dos controles positivos de HVE-1

Grupos de quatro hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, com três semanas de idade, pesando entre 40 e 50 gramas, sob anestesia inalatória com sevoflurano, foram inoculados por via intra-nasal com um volume de 50µL de meio Eagle MEM contendo suspensão do EHV-1 estirpes brasileiras A4/72, A9/92, A3/97, ISO/72 (Laboratório de Raiva, do Instituto Biológico, SP/Brasil) e estirpe argentina AR4 (cedido pela Dra. Cecilia Mónica Galosi, Cátedra de Virologia da Universidade de La Plata, Argentina) (Quadro 6). O título de desafio viral foi de 10^4 DICT50/25µL (dose infectante 50% em cultura de tecidos).

Controle positivo HVE-1 – fragmentos de pulmão e SNC de hamsters inoculados com HVE-1 (isolados brasileiros A3/97; A9/92; A4/72; ISO 72/10 e isolado argentino AR4).

Quadro 6 – Cepas virais de HVE-1 utilizadas na produção de controles positivos para a IHQ.

ESTIRPE VIRAL/MATERIAL DO ISOLAMENTO	AUTOR	Nº DE PASSAGENS/ MEIO DE CULTIVO
A4/72 (feto abortado)	Reiner et al. (1972)	21 ^a – VERO
A9/92 (potro 10 dias idade)	Cunha et al. (1993)	6 ^a – VERO
A3/97 (feto abortado)	Carvalho et al. (2000)	5 ^a – ED
ISO 72/10 (feto abortado)	Dados não publicados, Laboratório de Raiva e Encefalites, IB, 2010.	1 ^a – ED
AR4 (feto abortado)	Galosi et al. (1998); Ocampus, Barbeito e Galosi (2011)	2 ^a - RK13

(ED) células de fibroblasto equino derivado da derme; (VERO) células de rim de macaco; (RK 13) células de rim de coelho.

Os animais controles de HVE-1 foram distribuídos de acordo com o quadro abaixo (Quadro 7).

Quadro 7 – Distribuição dos animais para efetuação dos controles negativos e positivos de HVE-1.

Espécie	Grupo	Nº de animais	Inóculo	Volume	Via de inoculação
Hamster	Controle	4	Meio Eagle (MEM) não infectado	50 µL	Intranasal
Hamster	Grupo 1	4	Meio Eagle + suspensão ISO 72/10	50 µL	Intranasal
Hamster	Grupo 2	4	Meio Eagle + suspensão A3/97	50 µL	Intranasal
Hamster	Grupo 3	4	Meio Eagle + suspensão AR4	50 µL	Intranasal
Hamster	Grupo 4	4	Meio Eagle + suspensão A9/92	50 µL	Intranasal
Hamster	Grupo 5	4	Meio Eagle + suspensão A4/72	50 µL	Intranasal

Os animais foram colocados em micro-isolador conectado a um sistema com ventilação individual para cada gaiola e filtros HEPA na entrada e saída do ar. Os hamsters foram pesados e avaliados duas vezes ao dia até o aparecimento dos primeiros sintomas graves, quando foram então, submetidos à eutanásia e posteriormente necropsiados para coleta dos órgãos, juntamente com seus respectivos controles negativos.

3.1.7 Protocolo de IHQ

- Desparafinização das lâminas em xilol na estufa a 65°C por 30 minutos;
- Diafanização e desidratação das lâminas:

Solução	Tempo	Temperatura
Xilol I	15 minutos	Ambiente
Xilol II	15 minutos	Ambiente
Xilol + Álcool Etílico Absoluto	10 minutos	Ambiente
Álcool Etílico Absoluto I	5 minutos	Ambiente
Álcool Etílico Absoluto II	5 minutos	Ambiente
Álcool Etílico 95%	5 minutos	Ambiente
Álcool Etílico 70%	5 minutos	Ambiente
PBS	5 minutos	Ambiente

- Fazer o bloqueio da peroxidase em solução de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) 5%, diluído em metanol, durante 30 minutos;

- Desmascaramento em Tampão Citrato 1x (pH 6,0) em PBS, durante 15 minutos ou em Tampão Bórico 0,2 M (pH 7,2), durante 12 minutos, no forno microondas. Deixar resfriar em temperatura ambiente;
- 3 lavagens com PBS por 5 minutos cada;
- Bloqueio de reações inespecíficas com solução de leite desnatado 5%, diluído em PBS por 1 hora em temperatura ambiente;
- 3 lavagens com PBS (5 minutos cada), com suave agitação;
- Incubação das lâminas com o Anticorpo Primário diluído em solução de leite desnatado (1:1000 para o anticorpo anti-HVE-1 VMRD e 1:40 para o anticorpo anti-Leptospira), em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Utilizar 100-200µL/lâmina.
- 3 lavagens com PBS (5 minutos cada), com suave agitação;
- Incubação com Anticorpo Secundário Biotinilado (amarelo), durante 45 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente;
- 3 lavagens com PBS (5 minutos cada), com suave agitação;
- Incubação com o complexo Estreptavidina-Biotina (vermelho), durante 45 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente;
- Revelação pela Diaminobenzidina (DAB), observando-se a coloração; ao atingir uma coloração amarronzada (aproximadamente 14 segundos) pausar a reação mergulhando a lâmina em solução de PBS (mantê-la imersa até a etapa de lavagem). Utilizar 100 µL/lâmina e fazê-las individualmente;
- 3 lavagens com PBS (5 minutos), com suave agitação;
- Coloração de fundo com Hematoxilina de Harrys, por 8 segundos e lavagem em água corrente durante 6 a 8 minutos;
- Desidratação, diafanização.

Solução	Tempo	Temperatura
Álcool Etílico 70%	5 minutos	Ambiente
Álcool Etílico 95%	5 minutos	Ambiente
Álcool Etílico Absoluto	5 minutos	Ambiente
Álcool Etílico Absoluto	5 minutos	Ambiente
Xilol + Álcool Etílico Absoluto	10 minutos	Ambiente
Xilol I	10 minutos	Ambiente
Xilol II	10 minutos	Ambiente

- Montagem com lamínula e Entellan.

3.1.8 Validação da reação para HVE-1 e *Leptospira* spp.

A validação da reação foi efetuada da seguinte forma:

- Omissão do anticorpo primário em lâminas do controle positivo e negativo, sendo considerada satisfatória a ausência de marcação de qualquer estrutura;
- Reação completa (padrão) em ambos os controles (positivo e negativo), sendo considerada satisfatória a ausência de marcação no controle negativo.

3.1.9 Preparo da amostra para isolamento e identificação do HVE-1:

Suspensões a 20% (2 gramas de cada órgão foram macerados com 8 mL de solução EAGLE MEM) de fragmentos de órgãos fetais foram inoculadas em cultivo de células VERO, bem como para extração de ácidos nucleicos. O isolamento viral em cultivo celular foi realizado segundo o protocolo da OIE (2008). Foram feitas três passagens cegas com intervalo de sete dias. As amostras que causaram efeito citopático (arredondamento, refringência, formação de sincícios), foram colhidas e submetidas à reação de PCR para identificação viral, com a utilização de *primers* específicos selecionados para a região do gene que codifica a glicoproteína B (gB) (região conservada), descritos por Kirisawa et al. (1993). As análises de isolamento viral e PCR foram realizadas pelo Laboratório de Raiva e Encefalites do CPDSA do Instituto Biológico.

3.1.10 Preparo da amostra para isolamento e identificação da *Leptospira* spp.

3.1.10.1 Meios de cultivo para o isolamento de *Leptospira* spp.:

Foram utilizados meios de cultivo específicos para *Leptospira* spp.: EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium /Difco®-USA) e Fletcher suplementados com 15% de soro estéril de coelho e inativado a 56°C por 30 minutos, enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina com e sem adição de antibiótico (5- Fluoruracil, 400mg/L Sigma®-USA) (ALVES et al., 1996).

3.1.10.2 Isolamento de *Leptospira* spp.:

O procedimento empregado para o cultivo dos materiais recebidos foi:

- A) Flambar a superfície do órgão, e macerar um fragmento do tecido (fígado e rim) em solução salina estéril; centrifugar a 2000 rotações/minuto. O exame direto foi realizado em microscópico óptico Jena Zeiss com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 10x/0,20 e de ocular 20 (200X) e inocular a amostra (1 mL) nos tubos com meios EMJH e Fletcher com adição de antibióticos (meios A e B), fazendo diluições seriadas em mais 3 tubos de cada meio.
- B) Os inóculos em meio de cultura acrescidos de antibióticos foram repicados após 48h em meio EMJH e Fletcher sem adição dos antibióticos (meios C e D).
- C) As leituras dos cultivos foram feitas a cada sete dias por um período de 60 dias. As amostras suspeitas foram novamente repicadas para eliminação de contaminações secundárias, até a obtenção de cultura pura de *Leptospira* spp.

3.1.10.3 Técnica da PCR para *Leptospira* spp.

Preparo das amostras para a PCR: Fragmentos dos órgãos (aproximadamente 2 gramas de cada) foram macerados no homogeneizador (Stomacher 80[®]) de forma a obter-se um “pool” e este ressuspendido em tampão TE (10% p/v) e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA.

Protocolo de extração do DNA com o reagente comercial DNAzol (Invitrogen[®]) adaptado de CHOMCZYNSKI (1993): as amostras (1 mL de cada) foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos para precipitar debris celulares; foram adicionados 100 µL da amostra a 1 mL do reagente DNAzol (GIBCO BRL[®]). As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 10.000 x g /10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” adicionar 500 µL de etanol absoluto e deixado à temperatura ambiente por 1 a 3 minutos para precipitar o DNA do lisado; centrifugado a 4000 x g/ 2min e descartado o sobrenadante. Foram realizadas duas lavagens do “pellet” de DNA com 850 µL de etanol absoluto, aguardando-se 1 minuto para sua precipitação; Centrifugado a 4000 x g/ 2min. Retirado todo o etanol com a pipeta e aguardar aproximadamente 20 segundos para secar o DNA Dissolvido o DNA em 100 µL de NaOH (8 mM), passando o

“pellet” através de uma pipeta. Adicionar 40 µL de solução Hepes 0,1 M para ajustar a solução de DNA para pH neutro.

Metodologia para emprego da técnica de PCR para diagnóstico da Leptospirose (MÉRIEN et al., 1992): Primers empregados: gênero específico *Leptospira* spp - fragmento de 331 bp (Lep 1: 5' GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3' e Lep 2: 3' TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5')

Amplificação do DNA: Para uma reação final de 50µL, foram adicionados 17,2 µL de água, 5 µL de tampão 10 X (500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 8 µL da mistura de dNTPs (200 µ M de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 5 µL dos primers a 10 pM (Lep 1 e Lep 2), 0,4 µL de Taq DNA polimerase e 10 µL da amostra de DNA extraído.

Ciclo empregado (Termociclador): Inicialmente as amostras foram submetidas à desnaturação de 95°C por 5 minutos e a seguir empregados 29 ciclos de amplificação divididos em quatro fases: desnaturação (94°C /60s), hibridização (63°C /90s), extensão (72°C /120s), extensão final (72°C/ 10min).

Como controle da extração foram contaminadas experimentalmente amostras de órgãos com 100 µL de cultura pura 10⁸ de *Leptospira* sorovar Canicola. Como controle positivo para a leptospirose foi utilizado o sorovar Canicola. Como controle negativo da PCR foi utilizado a mistura da reação da PCR sem DNA, contendo 10 µL de água ultrapura.

Análise do produto amplificado: foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA, pH 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. O padrão de peso molecular empregado foi de 100 bp. O gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom[®]) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science[®]).

3.1.10.4 Bacteriológico diferencial

No exame bacteriológico diferencial foram processados conteúdo estomacal e órgãos de fetos equinos abortados, que foram submetidos às técnicas bacteriológicas para isolamento e identificação de bactérias aeróbias (Enterobactérias e cocos gram-positivos) e microaerófilas (*Campylobacter* spp., *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*), segundo Kirkbride (1990), Genovez et al. (1995) e OIE (2012). Foram considerados como possíveis causas de abortamento os microrganismos isolados em cultura pura ou preponderantes (KIRKBRIDE, 1990).

3.1.11 Forma de análise dos resultados

Dados relacionados à frequência de ocorrência (F) de fetos equinos infectados, bem como a idade dos fetos e Estado de origem foram tabulados e calculada a frequência de ocorrência para cada técnica, segundo Côrtes (1993):

$$F = \frac{\text{Número de casos de uma doença existentes num dado momento e local}}{\text{População existente naquele momento e local}}$$

Foi tabulada a frequência do padrão de lesões histológicas e órgãos acometidos em cortes de tecidos corados por H.E. para fetos positivos para leptospirose e HVE-1.

4. RESULTADOS

4.1 CONTROLES DE *LEPTOSPIRA* SPP.

4.1.2 Descrição da análise histopatológica dos controles positivos e negativos para *Leptospira* sorovar Canicola estirpe LO4

Os animais inoculados com *Leptospira* sorovar Canicola, estirpe LO4, apresentaram na análise de histopatologia de lâminas com coloração H.E. as seguintes alterações: no rim intensa congestão no interstício e conteúdo amorfo eosinofílico no espaço glomerular (proteinúria) (Figuras 8 b, c); o fígado apresentou intensa congestão dos sinusóides, degeneração vacuolar e tumefação dos hepatócitos, bem como áreas multifocais de necrose de coagulação (Figuras 8 e, f). Os hamsters controle negativo (inoculados somente com meio de cultivo - MEM), não apresentaram lesões em fígado e rim (Figuras 8 a, d).

Na análise de IHQ o controle positivo do rim de hamster inoculado com *Leptospira* Canicola, estirpe LO4, marcou em castanho espirilos enovelados no lúmen dos túbulos contornados distais (Figura 9 c), proximais (Figura 9 d) e espaço urinário (Figura 9 e). O controle negativo utilizando somente o anticorpo secundário não apresentou nenhuma marcação de fundo (Figura 9 a), já o controle negativo utilizando o teste padrão (com anticorpo primário na diluição de 1:40) apresentou marcação de fundo em algumas estruturas (túbulos contornados) provavelmente devido à alta concentração do anticorpo (Figura 9 b).

Há necessidade de efetuar micrometragem durante a leitura de lâminas de *Leptospira* em aumento de 1000x (com óleo de imersão) para melhor visualização das mesmas (Figura 9 f), sendo importante atentar para o formato do agente em questão (espirilo), que apresenta refringência.

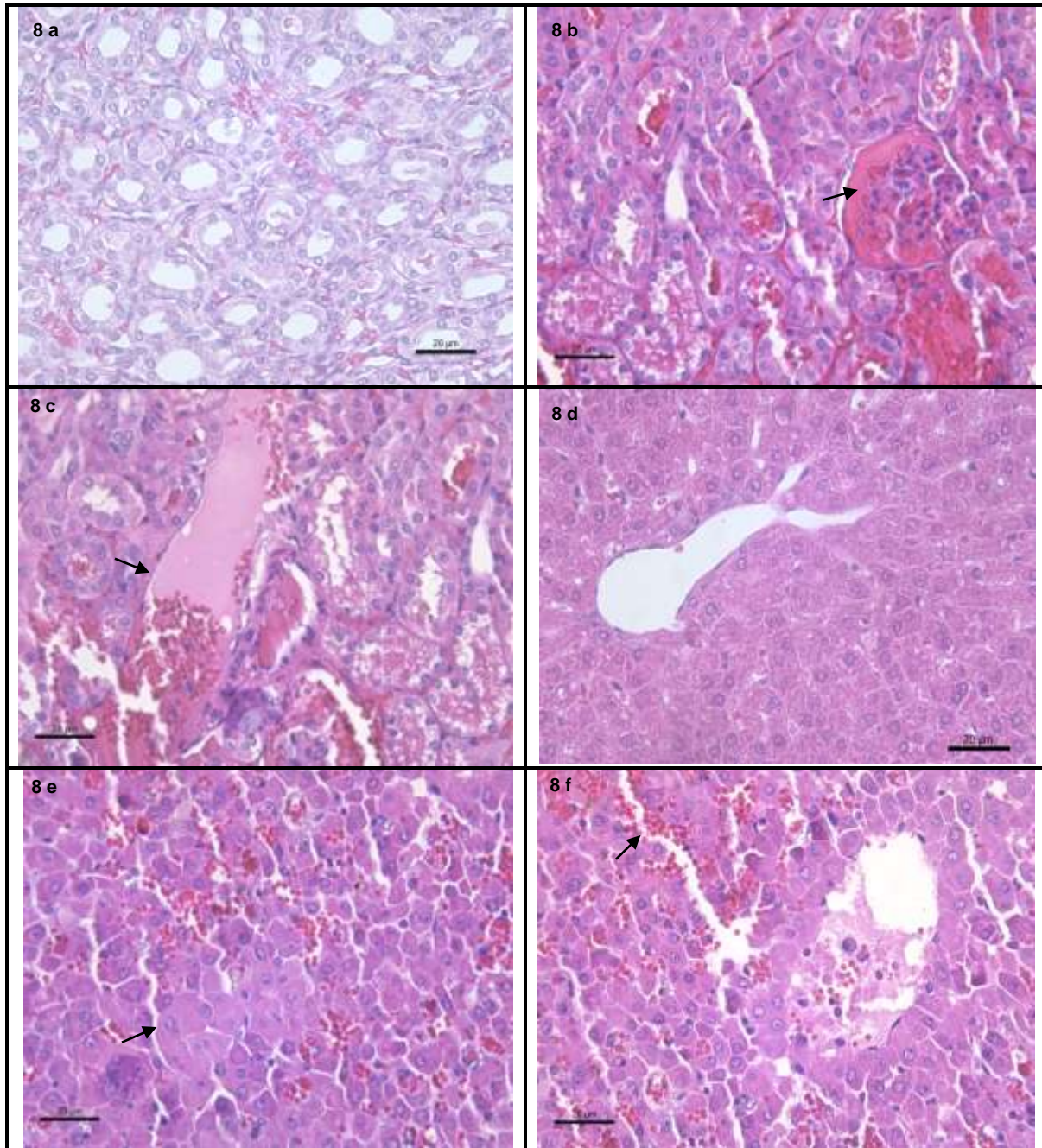


Figura 8. **a** - rim de Hamster controle negativo. Sem alterações histopatológicas. **b** - rim de Hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, presença de conteúdo amorfo eosinofílico (proteinúria) no espaço glomerular (seta preta). **c** - rim de Hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, presença de conteúdo amorfo eosinofílico (proteinúria) e túbulos contornados degenerados (seta preta). **d** - fígado de Hamster controle negativo, sem alterações histopatológicas. **e** - fígado de Hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, tumefação dos hepatócitos (seta preta). **f** - fígado de Hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, congestão dos sinusóides (seta preta). Coloração H.E. - aumento de 400x.

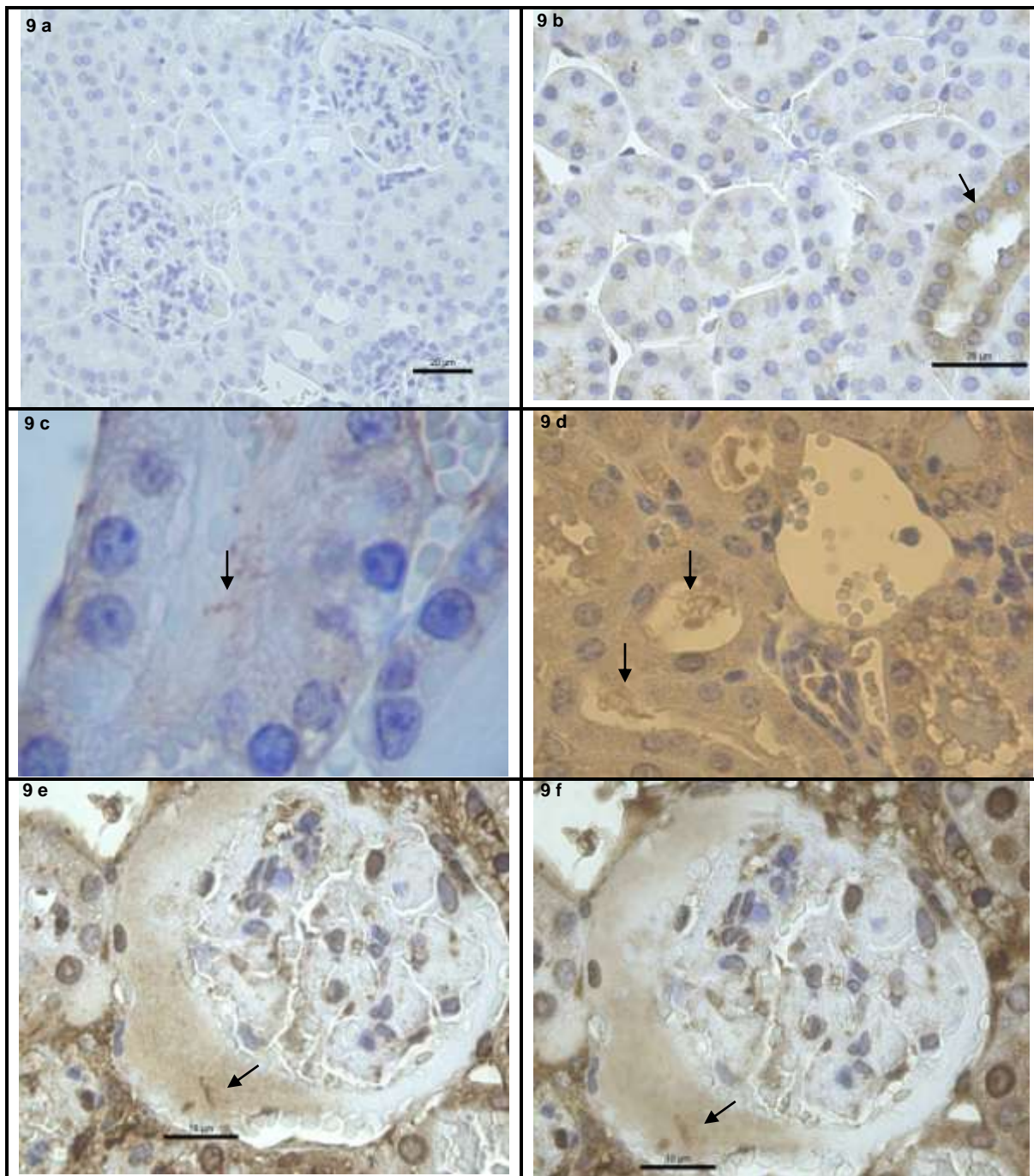


Figura 9. **a** - rim de hamster controle negativo (somente com anticorpo secundário) 400x. **b** - rim de hamster controle negativo (reação completa, marcação de fundo devido à alta concentração de anticorpo) (seta) 400x. **c** - rim de hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, leptospiros coradas em castanho no lúmen do túbulo contornado distal (seta), 1000x (óleo de imersão). **d** - rim de hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, leptospira corada em castanho no lúmen do túbulo contornado proximal (setas) - 400x. **e** - rim de hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, leptospira no espaço urinário glomerular (seta preta) 1000x (óleo de imersão). **f** - rim de hamster inoculado com *Leptospira Canicola*, estirpe LO4, Leptospira no espaço urinário glomerular (imagem refringente da figura 4 na ponta da seta preta) 1000x (óleo de imersão). Coloração de IHQ.

4.2 CONTROLES DE HVE-1

4.2.1 Descrição da análise clínica e anatomopatológica e histopatológica dos controles negativos para HVE-1

Os animais do controle negativo não apresentaram quaisquer alterações de comportamento, nem tampouco sintomatologia respiratória e/ou neurológica. Mucosa nasal limpa, sem secreções (Figura 10 a). Observou-se também boa quantidade de gordura corpórea e intestino repleto, o que demonstra que os animais estavam se alimentando normalmente; não foram encontradas lesões macroscópicas nos órgãos da cavidade abdominal e nenhuma alteração nos sistemas respiratório e nervoso.

Ao exame macroscópico do pulmão (Figura 11 a) e SNC não observou-se nenhuma alteração de coloração ou morfologia.

Na análise histopatológica (coloração H.E.), observou-se no pulmão, pleura normal, sem edema, congestão, fibrina ou infiltrado; espaço aéreo livre, sem conteúdo ou infiltrado inflamatório; epitélio bronquiolar íntegro, não reacional, sem conteúdo ou debris celulares; parênquima pulmonar normal, sem focos hemorrágicos, edema ou enfisema. Não foram observados sincícios no parênquima. Não foram visualizados sincícios ou corpúsculos de inclusão intranuclear em nenhuma das lâminas analisadas (Figura 12 a).

Em SNC (Figura 13 a), coração, fígado e rins não foram observadas alterações histopatológicas. Em baço e timo foi observada discreta reação de polpa branca e hiperplasia linfóide tímica.

4.2.2 Descrição da análise clínica e anatomopatológica e histopatológica dos controles positivos para HVE-1

Nos hamsters inoculados, observou-se evolução aguda da doença com perda de peso no 2º d.p.i dos animais inoculados com a estirpe A9/92 e no 3º d.p.i. nas demais estirpes e com o surgimento de sintomas neurológicos como perda da propriocepção, andar em círculos, paralisia espástica e convulsões no 2º d.p.i. para os animais inoculados com a cepa A9/92 e no 3ºd.p.i, para as cepas ISO 72/10, A4/72 indicando alto grau de neuroinvasividade e neurotropismo destes agentes. As cepas A3/97 e AR4 apresentaram sintomatologia predominantemente respiratória: apatia, dispnéia e descarga nasal serosanguinolenta, enquanto as demais cepas apresentaram sintomatologia

predominantemente neurológica com sinais de apatia, tremores, convulsões e morte no 3º d.p.i.

4.2.2.1 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 A9/92

Os animais inoculados com a cepa A9/92 apresentaram ganho de peso somente até o 1º d.p.i.; já no 2º d.p.i apresentavam sinais de apatia e anorexia; no 3º d.p.i, houve evolução aguda da doença com sinais de ataxia, paralisia, e convulsões em um dos animais e óbito de três (Figura 10 b). O exame macroscópico revelou hepatomegalia, alteração na coloração dos lobos pulmonares (coloração avermelhada representando áreas de hemorragia pulmonar) (Figura 11 b) e moderada a intensa congestão das meninges no SNC.

No exame histopatológico (H.E.) observou-se no pulmão intenso infiltrado inflamatório difuso misto com predomínio de mononucleares, intensa congestão, focos hemorrágicos (Figura 12 f), parede alveolar espessada, intensa infiltração de macrófagos espumosos no lúmen alveolar, presença de hemácias livres e edema alveolar, pleura discretamente edemaciada, debris celulares e hemácias livres no lúmen bronquiolar, desprendimento do epitélio bronquiolar, enfisema moderado. Não foram observados sincícios no parênquima. Não foram visualizados corpúsculos de inclusão intranuclear.

No SNC observou-se meninge congesta com infiltrado mononuclear, no neurópilo, áreas focais hemorrágicas, necrose com infiltrado mononuclear, degeneração neuronal e inclusões intranucleares eosinofílicas em neurônios e células da glia (Figura 13 b).

No coração e rins não foram observadas alterações histopatológicas. Em fígado observou-se discreta congestão dos sinuzóides hepáticos no Hamster 1 e tumefação dos hepatócitos no Hamster 4.

Em baço foi observada moderada a intensa reação de polpa branca esplênica, congestão e edema e em timo observou-se hiperplasia linfóide tímica.

4.2.2.2 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 AR4

Os animais inoculados com a cepa AR4 apresentaram ganho de peso até o 3º d.p.i., entretanto, já se apresentavam quietos, amontoados e sonolentos, no 4º d.p.i. apresentavam sinais clínicos de hiperexcitabilidade frente a estímulos externos, dispneia intensa e descarga nasal serosanguinolenta.

O exame macroscópico revelou edema pulmonar (Figura 10 c) e alterações na coloração dos lobos pulmonares (coloração avermelhada representando áreas de hemorragia pulmonar) (Figura 11 c) e moderada a intensa congestão das meninges no SNC.

Na análise histopatológica (coloração H.E.) observou-se nos pulmões, áreas pneumônicas restritas; pleura normal a discretamente espessada; infiltrado inflamatório misto, discreto e difuso, com predomínio de células mononucleares; discreta congestão e focos hemorrágicos; parede alveolar espessada com a presença de macrófagos espumosos (Figura 12 b), células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) e hemácias livres; discreto edema no lúmen alveolar; epitélio bronquiolar íntegro, com discreta produção de muco e discreta presença de debris celulares no lúmen bronquiolar; parênquima pulmonar apresentando moderado enfisema e edema pulmonar, sem a presença de fibrina. Foram observados sincícios e corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílica em algumas lâminas.

Nas lâminas dos hamsters inoculados com a cepa AR4, observou-se que havia áreas normais do pulmão e áreas pneumônicas restritas.

A análise histopatológica de SNC revelou focos de infiltrado inflamatório em neurópilo, meninges e bulbo olfatório, áreas de necrose e edema perivascular (Figura 13 c).

Em coração, fígado e rins não foram observadas alterações histopatológicas. Em timo e baço foi observada moderada reação de polpa branca esplênica e hiperplasia linfóide tímica.

4.2.2.3 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 A3/97

Os animais inoculados com a cepa A3/97 apresentaram-se normais e ganhando peso até o 3º d.p.i., no 4º d.p.i. pela manhã os animais apresentavam sinais clínicos de tremores, apatia, anorexia, salivação intensa e dispnéia, além de convulsões (em um grau aparentemente mais leve que os demais grupos), e descarga nasal serosanguinolenta em dois animais (Figura 10 d).

O exame macroscópico revelou alterações na coloração do fígado de um dos animais analisados (discretas manchas brancas em alguns lobos), alterações na coloração dos lobos pulmonares (manchas vermelhas representando áreas de hemorragia pulmonar) (Figura 11 d) e no SNC discreta a moderada congestão meníngea.

Ao exame microscópico observou-se no pulmão: áreas pneumônicas restritas; pleura normal; infiltrado inflamatório misto, discreto e difuso, com predomínio de células mononucleares e discreta congestão em áreas restritas; parede alveolar normal a discretamente espessada com presença discreta de macrófagos espumosos e células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares); discreto edema no lúmen alveolar; epitélio bronquiolar íntegro, com discretíssima produção de muco, sem a presença de debris celulares no lúmen bronquiolar; parênquima pulmonar apresentando discreto a moderado enfisema e edema pulmonar, sem a presença de fibrina. Não foram observados sincícios em nenhuma das lâminas analisadas. Foram observados corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílica em células do epitélio bronquiolar em uma das lâminas dos pulmões analisados.

Nas lâminas dos hamsters inoculados com a cepa A3/97, observou-se que havia áreas praticamente normais do pulmão e áreas pneumônicas focais restritas (Figura 12 d). Lâminas com padrão lesional mais leve, lembrando o padrão observado nas lâminas dos controles negativos.

A análise histopatológica de SNC revelou discreta congestão e infiltrado inflamatório mononuclear meníngeo, focos de edema e degeneração neuronal (Figura 13 d), principalmente em região de bulbo olfatório e discreto manguito perivascular mononuclear.

Em coração e rins não foram observadas alterações histopatológicas. Em timo e baço foi observada moderada reação de polpa branca esplênica e hiperplasia linfóide tímica. Em fígado foi observada discreta tumefação difusa de hepatócitos (Hamster 2).

4.2.2.4 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 ISO72/10

Os animais inoculados com a cepa ISO 72/10 apresentaram-se normais e ganhando peso até o 3º d.p.i.; no 4º d.p.i. pela manhã, os animais apresentavam sinais clínicos de salivação intensa, dispnéia, tremores e convulsões frente a estímulos externos, e descarga nasal serosanguinolenta (Figura 10 e).

O exame macroscópico revelou alterações na coloração dos lobos pulmonares (manchas vermelhas representando áreas de hemorragia pulmonar) (Figura 11 e) e edema pulmonar; no SNC observou-se moderada a intensa congestão meníngea.

Na análise histopatológica (coloração H.E.) observaram-se no pulmão, áreas pneumônicas restritas; pleura normal a discretamente espessada; infiltrado inflamatório misto, moderado a discreto, difuso, com predomínio de células mononucleares; discreta a moderada congestão, com raros focos hemorrágicos; parede alveolar discretamente espessada, com presença discreta de macrófagos espumosos e células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares); discreto edema no lúmen alveolar; epitélio bronquiolar íntegro, alguns bronquíolos limpos - sem conteúdo e outros com discreta produção de muco, sem a presença de debris celulares no lúmen bronquiolar; parênquima pulmonar moderado enfisema e discreto edema pulmonar, sem a presença de fibrina. Foram observados vários sincícios em uma das lâminas de pulmão analisadas (Figura 12 c). Foram observados corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílica em uma das lâminas analisadas.

Nas lâminas dos hamsters inoculados com a cepa ISO 72/10, observou-se que havia áreas normais do pulmão e áreas pneumônicas restritas. Em coração e rins não foram observadas alterações histopatológicas.

A análise histopatológica de SNC revelou necrose de liquefação, edema de neurópilo, degeneração neuronal e congestão dos vasos, múltiplos focos de infiltrado inflamatório mononuclear e manguito perivascular mononuclear (Figura 13 e).

Em fígado não foram observadas alterações histopatológicas. Em timo e baço foi observada moderada reação de polpa branca esplênica e hiperplasia linfóide tímica.

4.2.2.5 Controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 A4/72

Os animais inoculados com a cepa A4/72 apresentaram-se normais e ganhando peso até o 3º d.p.i. No 4º d.p.i. pela manhã, os animais apresentavam sinais clínicos predominantemente neurológicos com tremores e convulsões frente a estímulos externos (Figura 10 f).

O exame macroscópico revelou alterações na coloração dos lobos pulmonares (áreas de coloração avermelhada representando hemorragia pulmonar) (Figura 11 f) e moderada a intensa congestão meníngea em SNC.

A análise histopatológica (coloração H.E.) revelou nos pulmões, áreas pneumônicas restritas; pleura normal a moderadamente espessada; infiltrado inflamatório misto, discreto a moderado, difuso, com predomínio de células mononucleares; discreta congestão; parede alveolar discreta a moderadamente espessada, presença moderada de macrófagos espumosos e células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares); discreto edema no lúmen alveolar; epitélio bronquiolar íntegro com discreta a moderada produção de muco, sem a presença de debris celulares no lúmen bronquiolar; parênquima pulmonar apresentando moderado enfisema e edema pulmonar, sem a presença de fibrina. Não foram observados sincícios em nenhuma das lâminas analisadas. Foram observados corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílica em células do epitélio bronquiolar em uma das lâminas de pulmão analisadas.

Em uma das lâminas dos hamsters inoculados com a cepa A4/72 (Hamster 2), observou-se padrão de lesão severo – pneumonia grave (semelhante ao padrão lesional observado nos hamsters inoculados com a cepa A9/92) (Figura 12 e); as demais lâminas apresentaram padrão de lesões discreto a moderado. A análise histopatológica de SNC revelou infiltrado inflamatório mononuclear edema de neurópilo (Figura 13 f), degeneração neuronal e congestão dos vasos.

Em coração, fígado e rins não foram observadas alterações histopatológicas. Em timo e baço foi observada moderada reação de polpa branca esplênica e hiperplasia linfóide tímica.



Figura 10. **a** - pulmão de hamster controle negativo inoculado com 50 μ L de MEM - 3^o d.p.i. (vista dorsal), mucosa nasal limpa, sem secreção de muco (seta preta). **b** - controle positivo, cepa A9/92, 3^o d.p.i. três hamsters mortos (setas pretas) e um ainda vivo convulsionando (seta vermelha). **c** - controle positivo, cepa AR4, 3^o d.p.i. ao corte da traquéia houve extravasamento de conteúdo espumoso (seta preta), caracterizando edema pulmonar. **d** - controle positivo, cepa A3/97, 3^o d.p.i. observa-se secreção nasal serosanguinolenta (seta preta), vista ventral. **e** - controle positivo, cepa ISO 72/10, 3^o d.p.i. observa-se secreção nasal serosanguinolenta (seta preta), vista lateral. **f** - controle positivo, cepa A4/72, 3^o d.p.i. observa-se hamster convulsionando (seta preta), hiperexcitabilidade frente a estímulo externo (seta amarela).

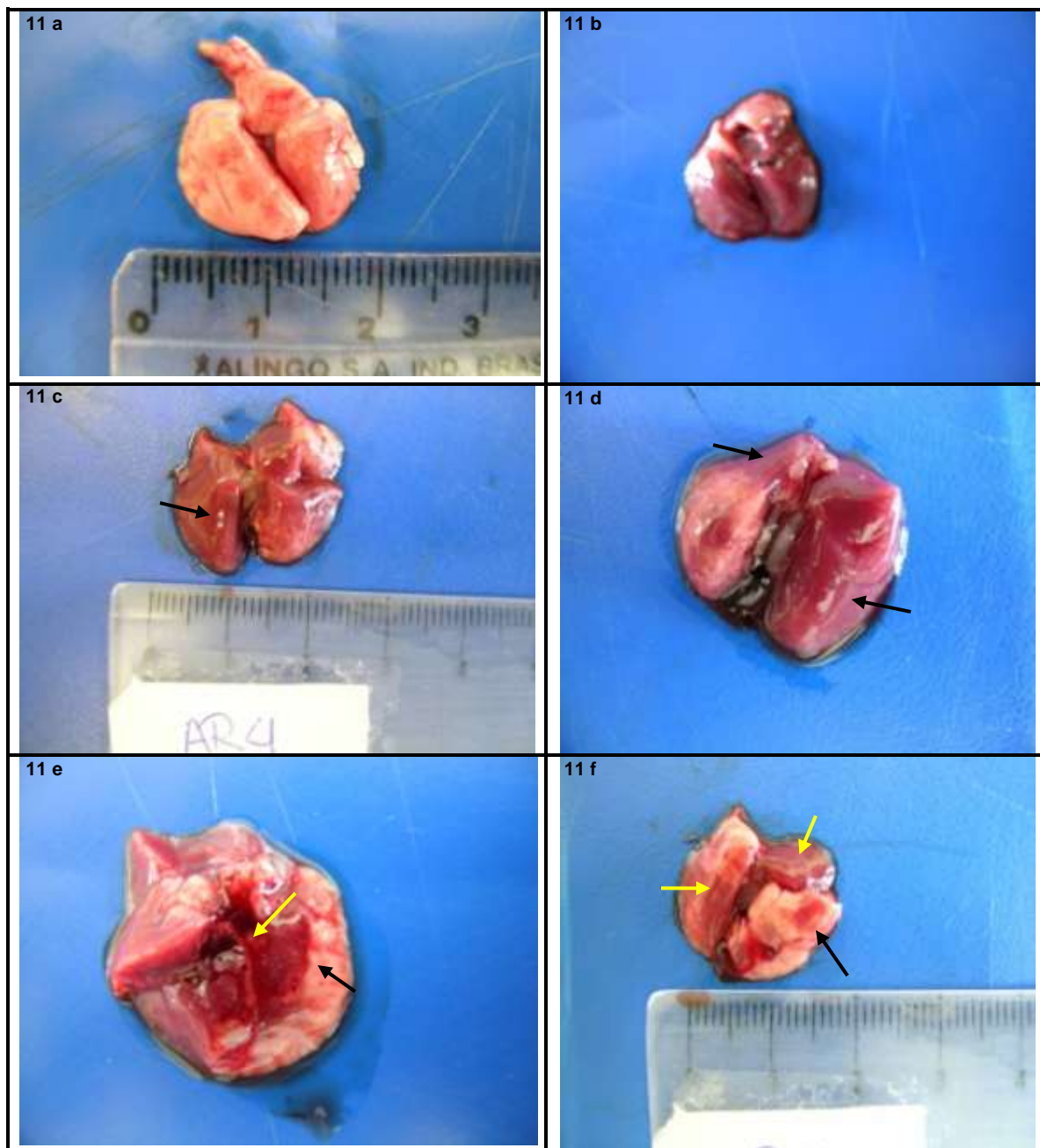


Figura 11. **a** - pulmão de hamster controle negativo inoculado com 50 μ L de MEM, 3^o d.p.i. sem alterações macroscópicas (vista dorsal). **b** - pulmão de hamster controle positivo, cepa A9/92, 3^o d.p.i. intensa coloração avermelhada nos lobos pulmonares = áreas de hemorragia (vista dorsal). **c** - pulmão de hamster controle positivo, cepa AR4, 3^o d.p.i. observa-se alteração de coloração dos lobos pulmonares (hemorragia pulmonar) (seta preta) (vista dorsal). **d** - pulmão de hamster controle positivo, cepa A3/97, 3^o d.p.i. alteração da coloração dos lobos pulmonares (lobos avermelhados = áreas de hemorragia pulmonar) (setas pretas) (vista dorsal). **e** - pulmão de hamster controle positivo, cepa ISO 72/10, 3^o d.p.i. alteração da coloração dos lobos pulmonares (hemorragia pulmonar) (seta preta) e edema pulmonar (seta amarela) (vista ventral). **f** - pulmão de hamster controle positivo, cepa A4/72, 3^o d.p.i. alteração da coloração dos lobos pulmonares (hemorragia pulmonar) (setas amarelas), áreas rosa claro = lobos pulmonares não hemorrágicos (seta preta) (vista dorsal).

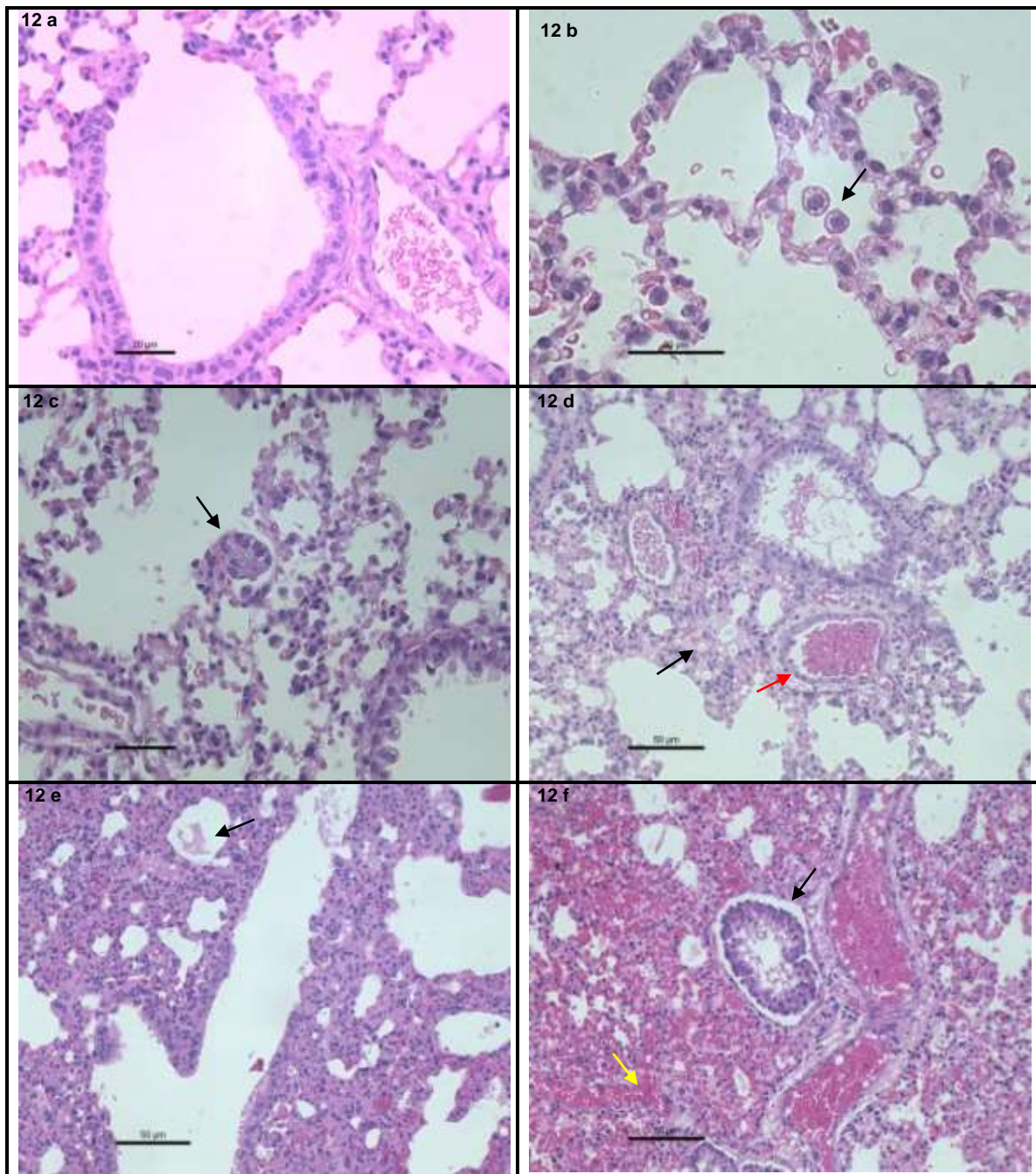


Figura 12. **a** - pulmão de hamster controle negativo, epitélio bronquiolar íntegro, não reacional, sem conteúdo ou debris celulares, sem espessamento alveolar 400x. **b** - pulmão de hamster controle positivo, cepa AR4, macrófagos espumosos no lúmen bronquiolar (seta preta) 600x. **c** - pulmão de hamster controle positivo, cepa ISO 72/10, sincício (seta preta) 400x. **d** - microscopia de pulmão de controle positivo, cepa A3/97, hamster 1, edema pulmonar com moderado infiltrado inflamatório (seta preta) e congestão (seta vermelha) 200x. **e** - microscopia de pulmão de hamster controle positivo, cepa A4/72, edema (seta preta), espessamento da parede alveolar intenso (hamster 2) 200x. **f** - pulmão de hamster controle positivo, cepa A9/92, 3º d.p.i. espaço aéreo com conteúdo amorfo eosinofílico, hemácias livres e infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela), desprendimento bronquiolar e debris celulares no lúmen do bronquíolo (seta preta) 200x. Coloração H.E.

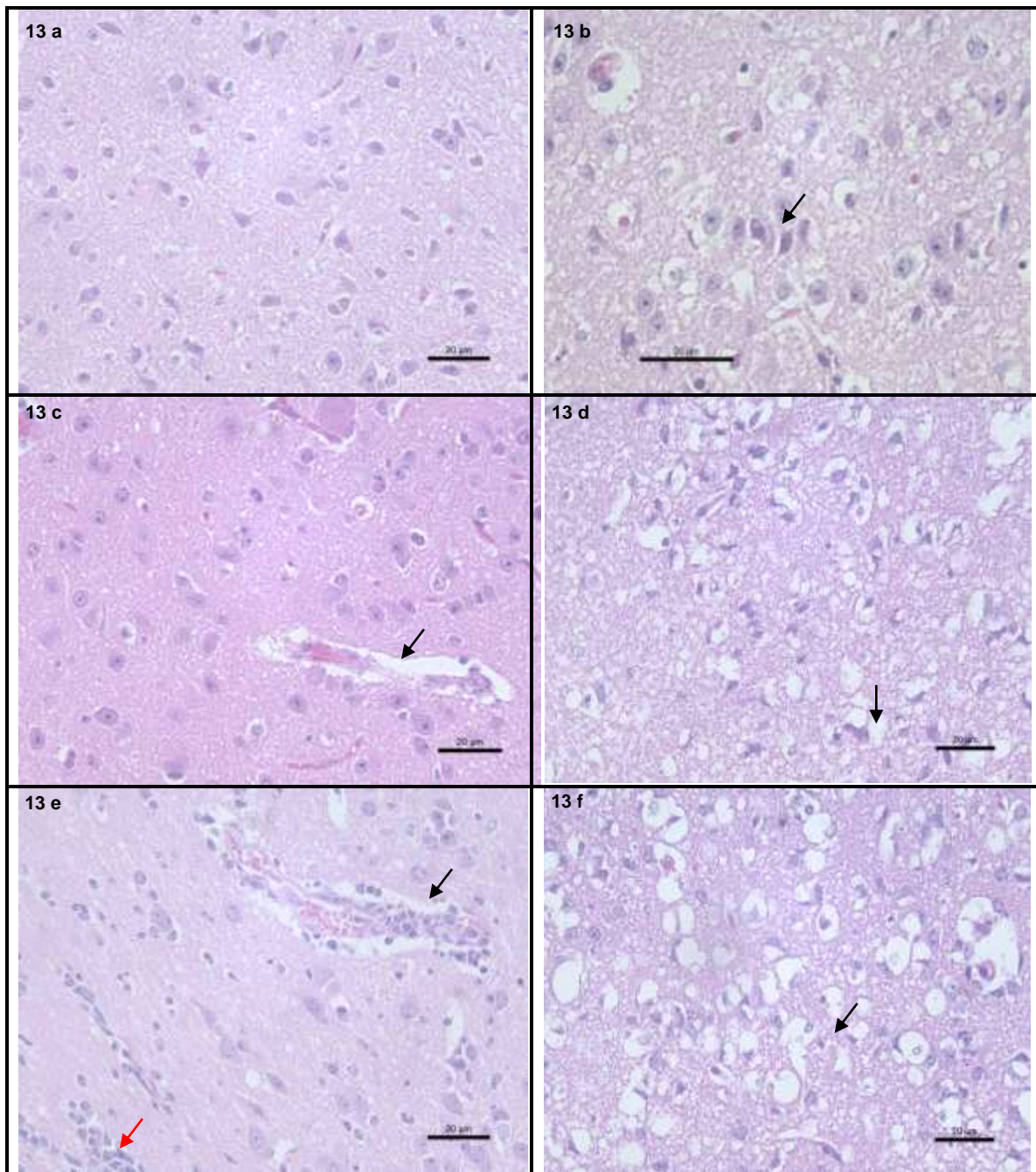


Figura 13. **a** - SNC de hamster controle negativo, inoculado com meio de cultivo (MEM), sem alterações histopatológicas 400x. **b** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa A9/92 de HVE-1, 3^o d.p.i. Inclusão intranuclear eosinofílica em neurônio (seta) 400x. **c** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa AR4 de HVE-1, 3^o d.p.i. observa-se aumento do espaço perivascular 400x. **d** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa A3/97 de HVE-1 - 3^o d.p.i., área de necrose predominante em região de bulbo olfatório, degeneração neuronal (seta) 400x. **e** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa ISO 72/10 de HVE-1, 3^o d.p.i., manguito perivascular mononuclear (seta preta) e focos de infiltrado inflamatório mononuclear (seta vermelha) 400x. **f** - SNC de hamster controle positivo, inoculado com a cepa A4/72 de HVE-1, 3^o d.p.i., edema do neurópilo (seta) e degeneração neuronal 400x. Coloração H.E.

4.3 RESULTADO DAS ANÁLISES DE IMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.1 Teste comparativo de IHQ de controle positivo inoculado com a cepa viral de HVE-1 AR8 frente ao anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

Foi realizado um desafio de IHQ para teste do anticorpo argentino anti-HVE-1 produzido pela Universidade de La Plata – Argentina, a partir do isolado de HVE-1 – AR8, Galosi (1996) *apud* Ocampus, Barbeito e Galosi (2011); protocolo de IHQ realizado segundo Zanuzzi et al. (2013), em amostra de pulmão de hamster inoculado com o isolado argentino AR8. Houve marcação positiva caracterizada pela coloração acastanhada de várias células do epitélio bronquiolar (Figuras 14 a, b e c).

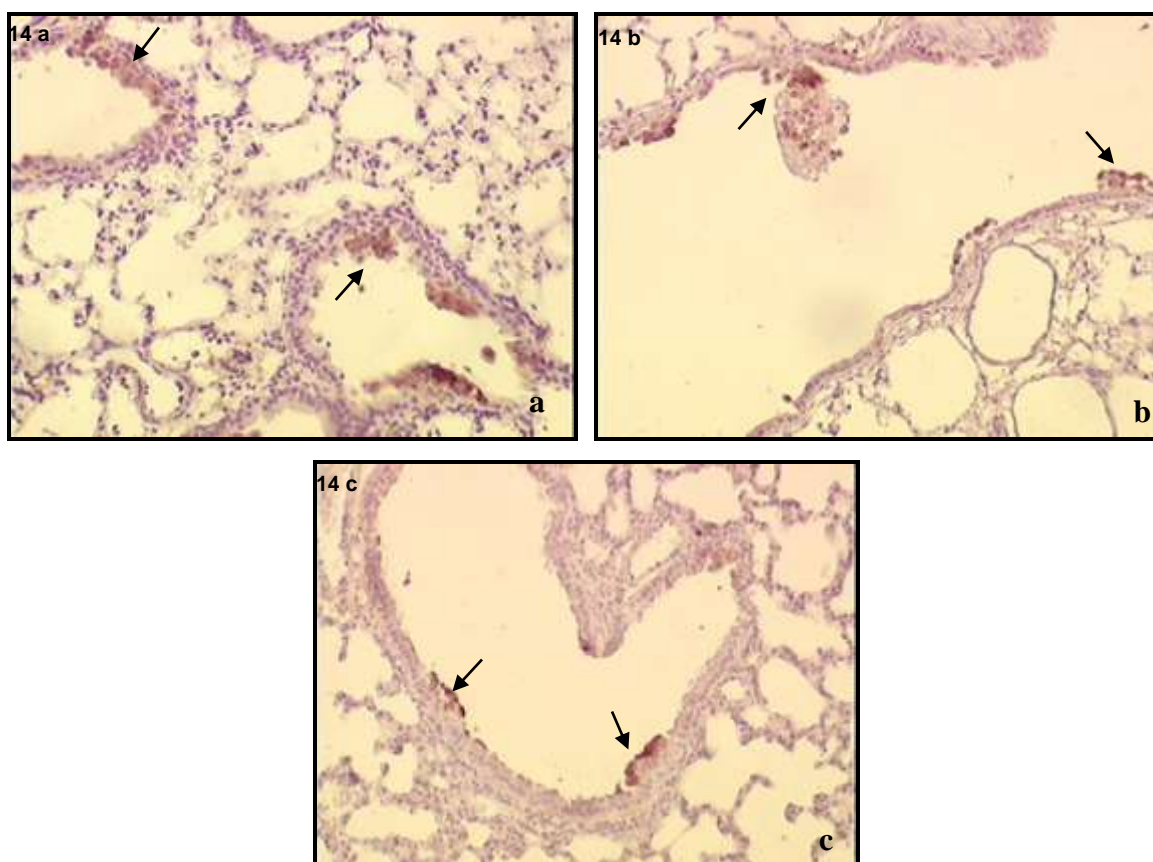


Figura 14 a, b e c - IHQ de pulmão de hamster controle positivo – cepa AR8. Anticorpo anti-HVE-1 marcando isolado argentino AR8 controle positivo, marcação caracterizada pela coloração acastanhada de células epiteliais do bronquíolo pulmonar (setas). Aumento de 400x (a) e 200x (b e c) (Carolina Natalia Zanuzzi, 2013, Universidad de La Plata).

4.3.2 Teste comparativo de IHQ de controle positivo inoculado com as diferentes cepas de HVE-1 estudadas

Foram efetuados testes a fim de se verificar a sensibilidade dos anticorpos utilizados frente às diferentes estirpes virais estudadas. Para o anticorpo VMRD[®] foram efetuadas análises em pulmão e SNC, enquanto com o anticorpo anti-AR8 foram efetuados testes somente em tecido pulmonar.

4.3.2.1 IHQ de Controle negativo frente ao anticorpo VMRD[®] e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

A IHQ em cortes de tecido parafinado de pulmão de controle negativo (animal inoculado somente com meio de cultivo), não apresentou marcação frente a ambos os anticorpos testados utilizando-se hamsters como controle (Figuras 15 a, 16 a). Em SNC com o anticorpo VMRD[®] observou-se discreta marcação de fundo, que não alterou a leitura dos resultados por ser facilmente distinguível de uma marcação positiva (Figura 17a). Foram realizados anteriormente testes com controles de camundongo que apresentaram marcação de fundo em células do epitélio bronquiolar (mesmo quando efetuada a reação somente com anticorpo secundário), demonstrando que para o protocolo efetuado, a utilização de hamsters mostrou-se mais satisfatória.

4.3.2.2 IHQ de Controle positivo – Cepa A9/92 frente ao anticorpo VMRD[®] e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

A IHQ em cortes de tecido parafinado de pulmão e SNC de controle positivo inoculado com a cepa A9/92 de HVE-1 apresentou resultado falso negativo na análise de IHQ, não havendo marcação com nenhum dos anticorpos testados (Figuras 15 b, 16 d, 17 b).

4.3.2.3 IHQ de Controle positivo – Cepa AR4 frente ao anticorpo VMRD[®] e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

A IHQ em cortes de tecido parafinado de pulmão e SNC de controle positivo inoculado com a cepa AR4 de HVE-1 apresentou resultado positivo na análise de IHQ, utilizando o anticorpo VMRD[®], havendo marcação em células do epitélio bronquiolar

(Figura 16 e) e em células do bulbo olfatório (neurônios e células da glia) (Figura 17 b). Também foi observada marcação em alguns neurônios muito próximos à área do bulbo olfatório, porém, em outras áreas do SNC não foi observada marcação. Quando efetuado o teste utilizando o anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8), não foi observada nenhuma marcação em células do epitélio bronquiolar (Figura 15 c).

4.3.2.4 IHQ de Controle positivo – Cepa A3/97 frente ao anticorpo VMRD[®] e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

A IHQ em cortes de tecido parafinado de pulmão e SNC de controle positivo inoculado com a cepa A3/97 de HVE-1 apresentou resultado positivo na análise de IHQ, utilizando o anticorpo VMRD[®], havendo marcação em células do epitélio bronquiolar (Figura 16 f). Semelhante ao observado no teste utilizando a cepa AR4, também foi observada marcação em neurônios e células da glia restritas à região de bulbo olfatório (Figura 17 d) e áreas muito próximas (região de pólo frontal), porém, em outras áreas do SNC não foi observada marcação. Quando efetuado o teste utilizando o anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8), não foi observada nenhuma marcação em células pulmonares (Figura 15 d).

4.3.2.5 IHQ de Controle positivo – Cepa ISO 72/10 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

A IHQ em cortes de tecido parafinado de pulmão e SNC de controle positivo inoculado com a cepa ISO 72/10 de HVE-1 apresentou resultado positivo na análise de IHQ, utilizando o anticorpo VMRD, havendo marcação em células do bulbo olfatório (neurônios e células da glia) (Figura 17 f), e em grupos de células de regiões distantes do bulbo olfatório, a saber, região de septo estriado e diencéfalo caudal, entretanto, não foi observada marcação em células do epitélio bronquiolar (Figura 16 b). Quando efetuado o teste utilizando o anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8), não foi observada nenhuma marcação em células SNC e pulmão (Figura 15 e).

4.3.2.6 IHQ de Controle positivo – Cepa A4/72 frente ao anticorpo VMRD e anticorpo anti-HVE-1 (produzido a partir do isolado AR8)

A IHQ em cortes de tecido parafinado de pulmão e SNC de controle positivo inoculado com a cepa A4/72 de HVE-1 apresentou resultado falso negativo na análise de IHQ, não havendo marcação com nenhum dos anticorpos testados (Figuras 15 f, 16 c e 17 c).

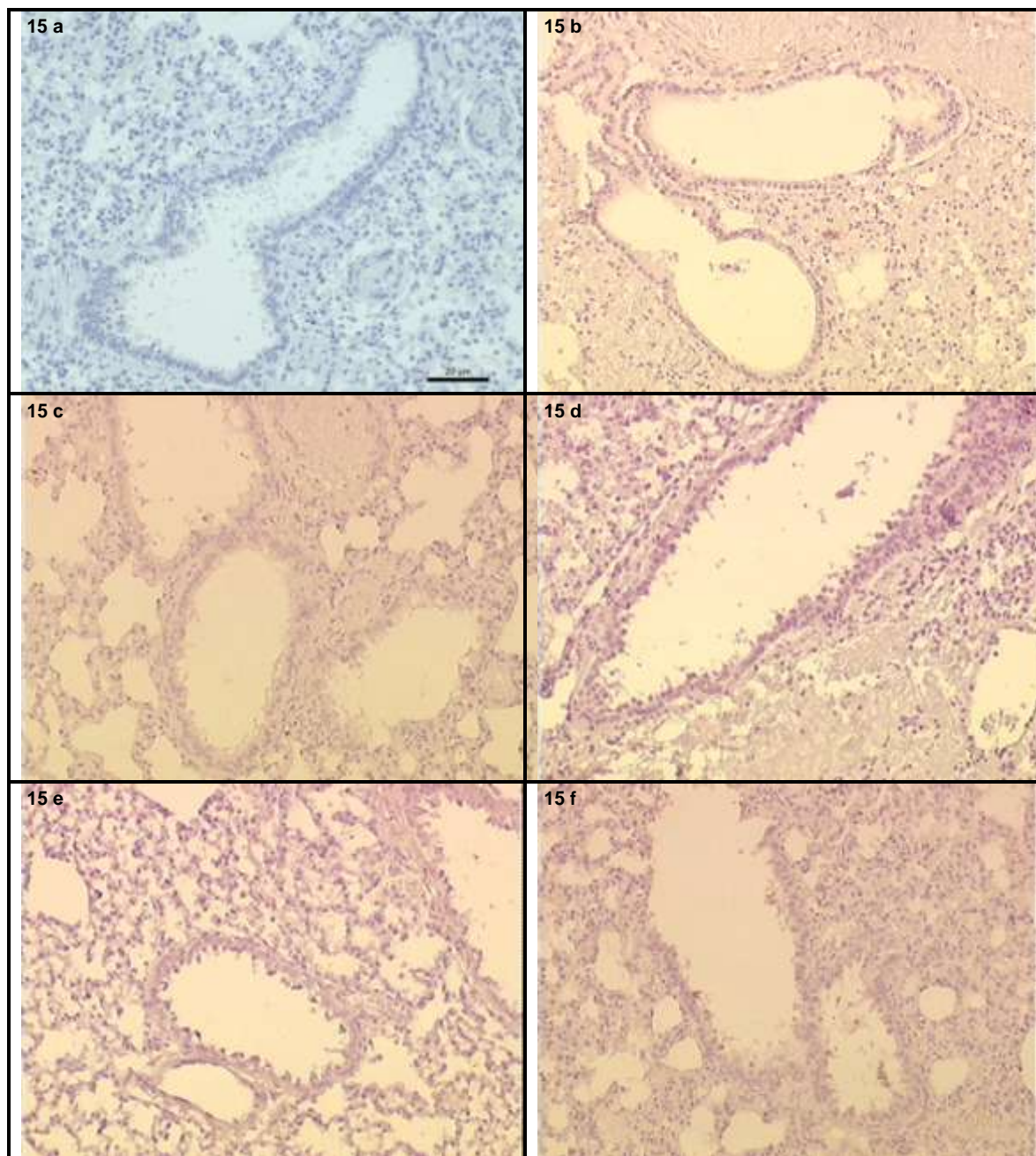


Figura 15. IHQ utilizando o anticorpo anti-HVE-1 (isolado AR8) **a** - pulmão de hamster controle negativo, inoculado com meio de cultivo (MEM), sem marcação. **b** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa A9/92, sem marcação. **c** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa AR4, sem marcação. **d** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa A3/97, sem marcação. **e** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa ISO 72/10, sem marcação. **f** - pulmão de hamster controle positivo, HVE-1 cepa A4/72. sem marcação. Aumento de 400x.

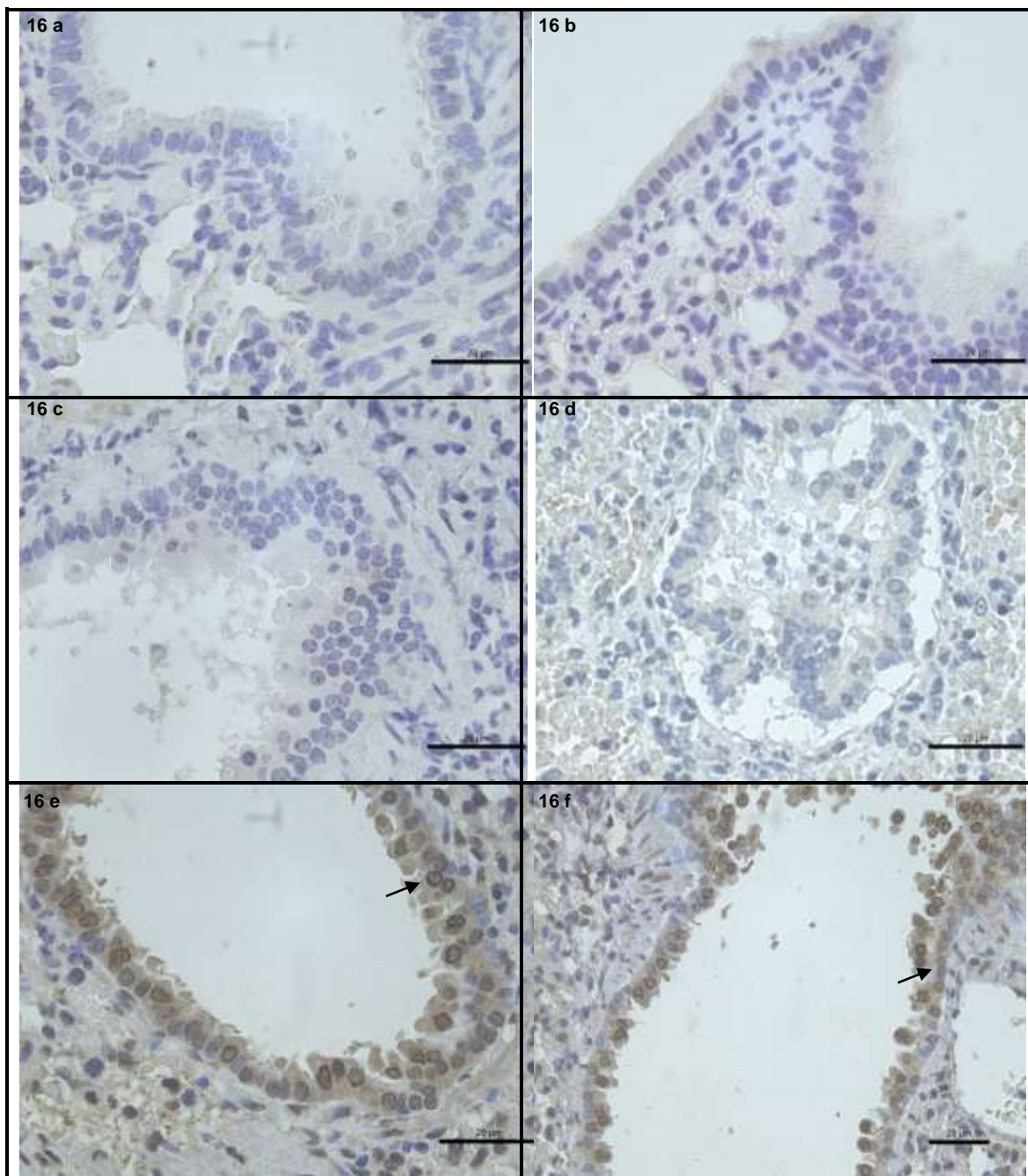


Figura 16. IHQ de cortes histológicos de pulmão dos hamsters controles de HVE-1, utilizando o anticorpo comercial anti-HVE-1 VMRD[®]. **a** - controle negativo, inoculado com meio de cultivo (MEM), sem marcação. **b** - controle positivo, HVE-1 cepa ISO 72/10, sem marcação. **c** - controle positivo, cepa A4/72, sem marcação. **d** - controle positivo, cepa A9/92, sem marcação, leve fundo devido à grande quantidade de hemácias. **e** - controle positivo, cepa AR4, marcação positiva caracterizada pela coloração castanha de células do bronquíolo pulmonar (seta). Aumento de 630x. **f** - controle positivo, cepa A3/97, marcação positiva caracterizada pela coloração castanha de células do bronquíolo pulmonar (seta) 400x.

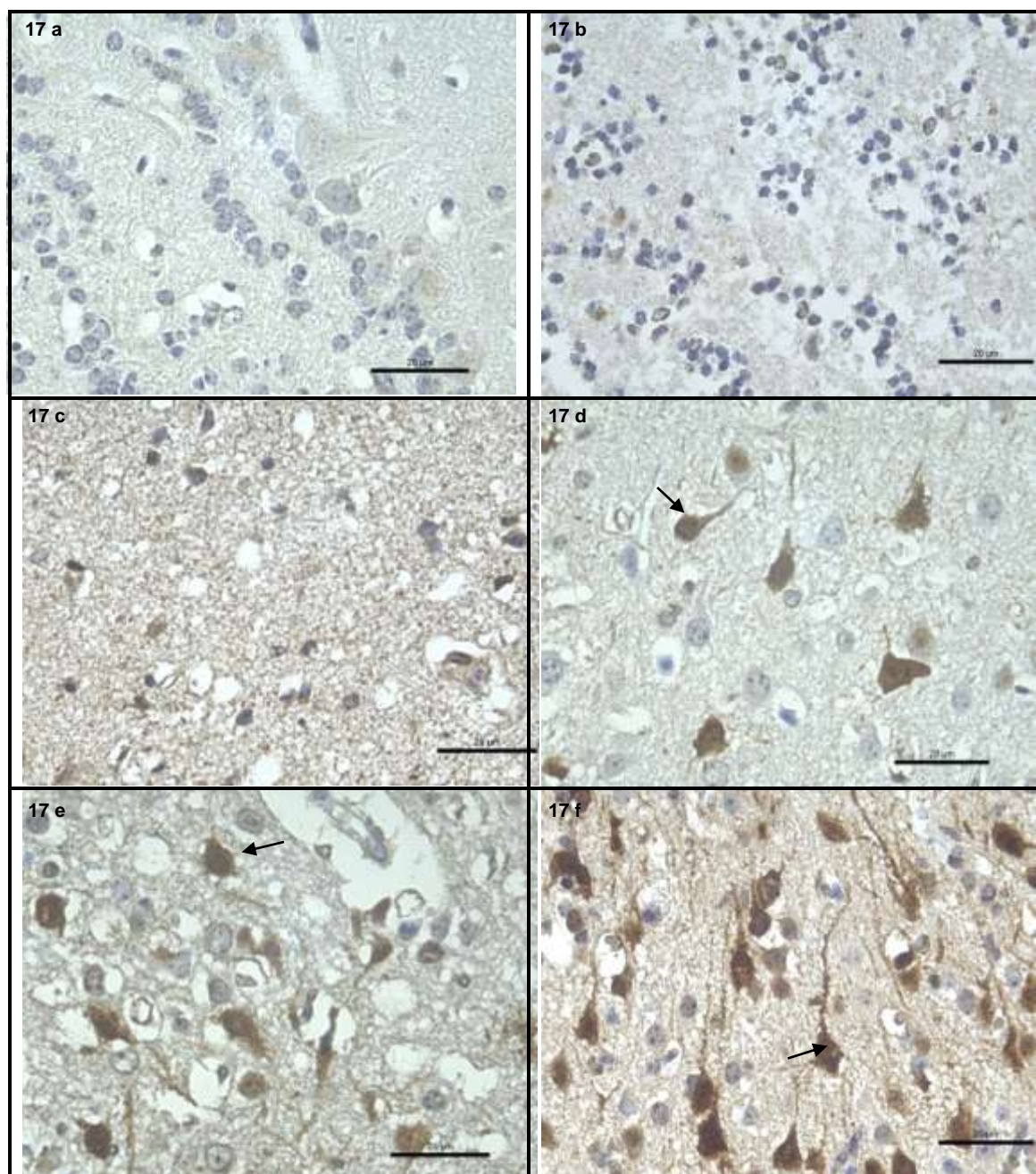


Figura 17. IHQ de cortes histológicos de SNC dos hamsters controle de HVE-1, utilizando o anticorpo comercial anti-HVE-1 VMRD®. **a** - controle negativo (reação padrão), inoculado com meio de cultivo (MEM), observa-se muito discreta marcação de fundo. **b** - controle positivo, cepa A9/92, sem marcação, leve fundo devido à grande quantidade de hemácias. **c** - controle positivo, cepa A4/72, observa-se moderada marcação de fundo, porém, sem marcação de neurônios em região de bulbo olfatório. **d** - controle positivo, cepa A3/97, marcação positiva (neurônios corados em castanho em bulbo olfatório) (seta). **e** - controle positivo, cepa AR4, marcação positiva (neurônios corados em castanho em região de bulbo olfatório) (seta). **f** - controle positivo, cepa ISO 72/10, observa-se marcação positiva (neurônios corados em castanho em bulbo olfatório) (seta). Aumento de 630x.

4.4 FETOS EQUINOS ABORTADOS

Considerando a associação de diferentes técnicas (isolamento, PCR, imunohistoquímica e histopatologia pela coloração H.E.), dois dos 105 equinos analisados foram considerados positivos para o HVE-1 (1,90%).

Os principais achados histopatológicos (H.E.) do feto 1 (LAP 56517), positivo na PCR e isolamento foram meningoencefalite não-purulenta inespecífica, epicardite não-purulenta discreta, pleuropneumonia intersticial não purulenta, hepatite multifocal não-purulenta, não tendo sido encontrados corpúsculos de inclusão intranucleares.

No feto 2 (LAP 58048), positivo na PCR e negativo no isolamento foram observadas as mesmas lesões do feto 1, acrescentando-se a estas lesões típicas de infecção herpética caracterizadas por sincícios pulmonares e inclusões intranucleares no pulmão, fígado, baço e cérebro.

Nenhum dos fetos analisados foi positivo na IHQ utilizando o anticorpo primário VMRD, porém o feto 1 (LAP 56517) foi considerado positivo utilizando o anticorpo primário produzido a partir do isolado AR8 da Universidade de La Plata, Argentina.

4.4.1 Análise microscópica (histopatológica), IHQ e PCR do Feto 1 (LAP 56517)

As lesões histopatológicas do feto abortado nº 1 (positivo na PCR e isolamento viral para HVE-1) observadas nos diversos órgãos foram: sistema nervoso central apresentando meninge congesta, infiltrado inflamatório mononuclear, marginalização linfocitária, neurópilo congesto, edemaciado, com manguito perivascular mononuclear, focos de mononucleares e gliose (Figura 18 a). No coração observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear no epicárdio. No pulmão pleura congesta, edemaciada e com infiltrado inflamatório mononuclear moderado, interstício congesto, com mononucleares e edema no espaço alveolar (Figura 18 c). O baço apresentou hiperplasia de polpa branca (Figura 18 e). Em fígado foram observados múltiplos e pequenos focos de necrose com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração turva dos hepatócitos (Figura 19 a). Nos rins não foram observadas alterações dignas de nota (Figura 19 c).

Na análise de IHQ houve marcação positiva em amostra do pulmão utilizando-se o anticorpo anti-HVE-1 produzido pela Universidade de La Plata – Argentina (Figura 19 e). Em SNC não houve marcação com o anticorpo VMRD[®], não sendo o anticorpo anti-HVE-1 produzido a partir do isolado AR8 testado para SNC. A análise de IHQ utilizando o anticorpo comercial anti-HVE-1 (VMRD[®]) mostrou resultado falso negativo, uma vez que

não houve marcação em nenhum dos órgãos analisado do feto sabidamente positivo, confirmado pela análise de PCR (apresentando bandas específicas com peso molecular de 226 pb) e isolamento viral.

4.4.2 Análise microscópica (histopatológica), IHQ e PCR do Feto 2 (LAP 58048)

As lesões histopatológicas no feto abortado 2 (positivo na PCR para HVE-1 e negativo no isolamento viral) observadas nos diversos órgãos foram: pulmão apresentando intenso infiltrado inflamatório mononuclear intersticial com vários sincícios (Figura 18 d) e corpúsculos de inclusão intra-nuclear eosinofílica e intenso edema e congestão pleurais com infiltrado mononuclear; inclusão intra-nuclear eosinofílica no epitélio bronquiolar e alveolar. Fígado apresentando intensa congestão dos sinusóides hepáticos com tumefação dos hepatócitos; fibrose periportal com moderado infiltrado mononuclear e proliferação de ductos bilíferos; discreto infiltrado mononuclear capsular; inclusão eosinofílica intra-nuclear em sincícios (Figura 19 b). No rim observou-se nefrose, discreto infiltrado mononuclear intersticial e inclusão intra-nuclear eosinofílica no epitélio tubular (Figura 19 d). No baço foi observada moderada reação de polpa branca esplênica (Figura 18 f).

No Sistema Nervoso Central foi observada intensa congestão meníngea e do neurópilo, neurônios alongados no córtex, inclusão intra-nuclear eosinofílica nos astrócitos, discreto infiltrado inflamatório mononuclear meníngeo, edema perineuronal, edema perivascular (Figura 18 b).

A análise de IHQ apresentou reação falso negativa, uma vez que não houve marcação em nenhuma das amostras, tanto de pulmão (Figura 19 f) (anticorpo VMRD[®] e anticorpo anti-HVE-1 produzido a partir do isolado AR8) como de SNC (anticorpo VMRD[®]). Na PCR este feto foi considerado positivo segundo o protocolo realizado.

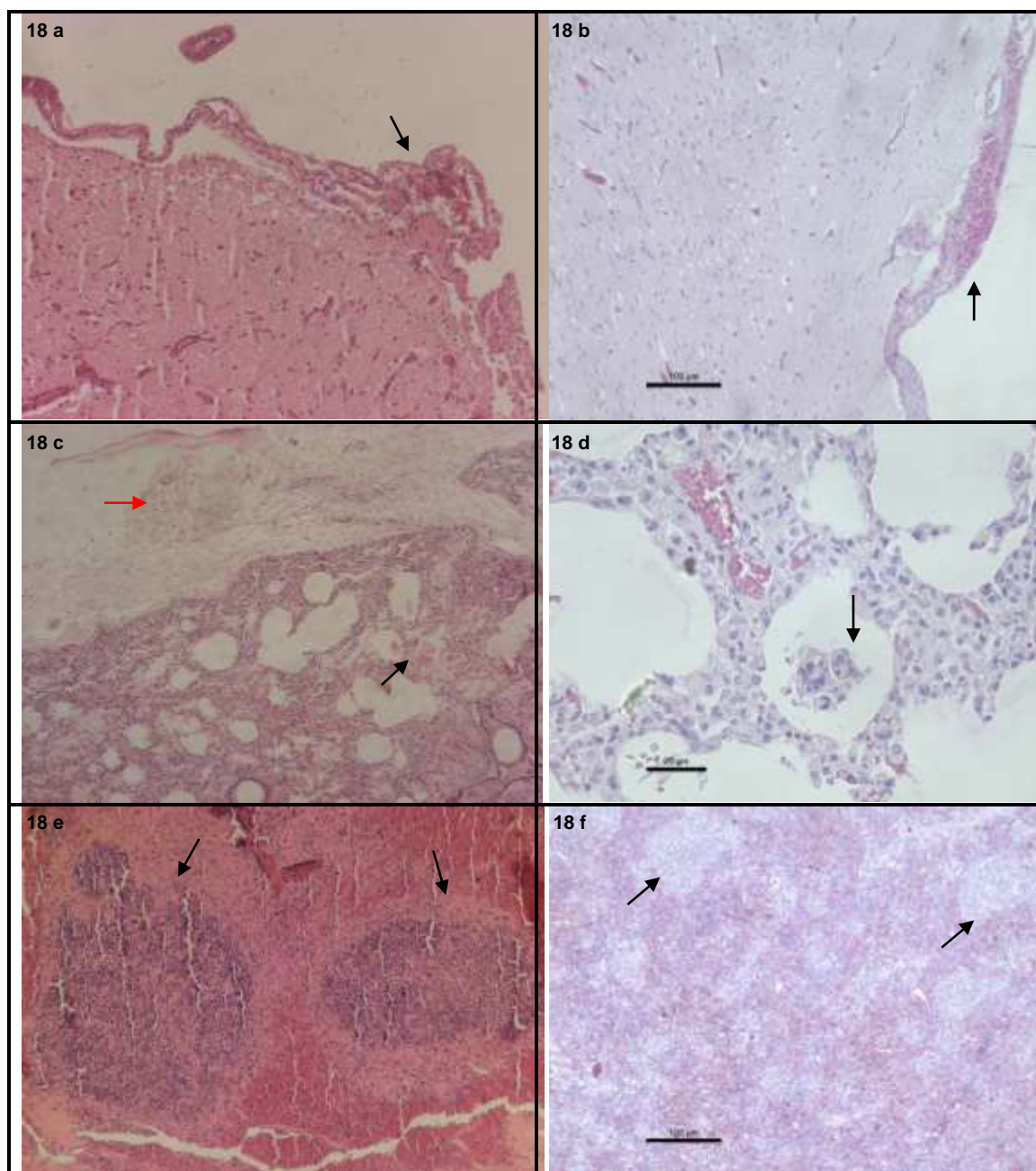


Figura 18. **a** - cérebro de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517) positivo ao HVE-1 na PCR e isolamento, meninge e neurópilo congesto (seta) e edemaciado, com discreto infiltrado mononuclear meníngeo. **b** - SNC de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048) positivo para HVE-1 na PCR, congestão e infiltrado mononuclear meníngeo (seta preta) e congestão de neurópilo. **c** - pulmão de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), pleura congesta, edemaciada e com infiltrado inflamatório mononuclear moderado (seta vermelha); interstício congesto, com infiltrado mononuclear e edema no espaço alveolar (seta preta). **d** - pulmão de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), observam-se dois sincícios (seta preta) 400x. **e** - baço de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), hiperplasia de polpa branca (setas) 100x. **f** - baço de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), hiperplasia de polpa branca (setas). Coloração H.E. Aumento de 100x.

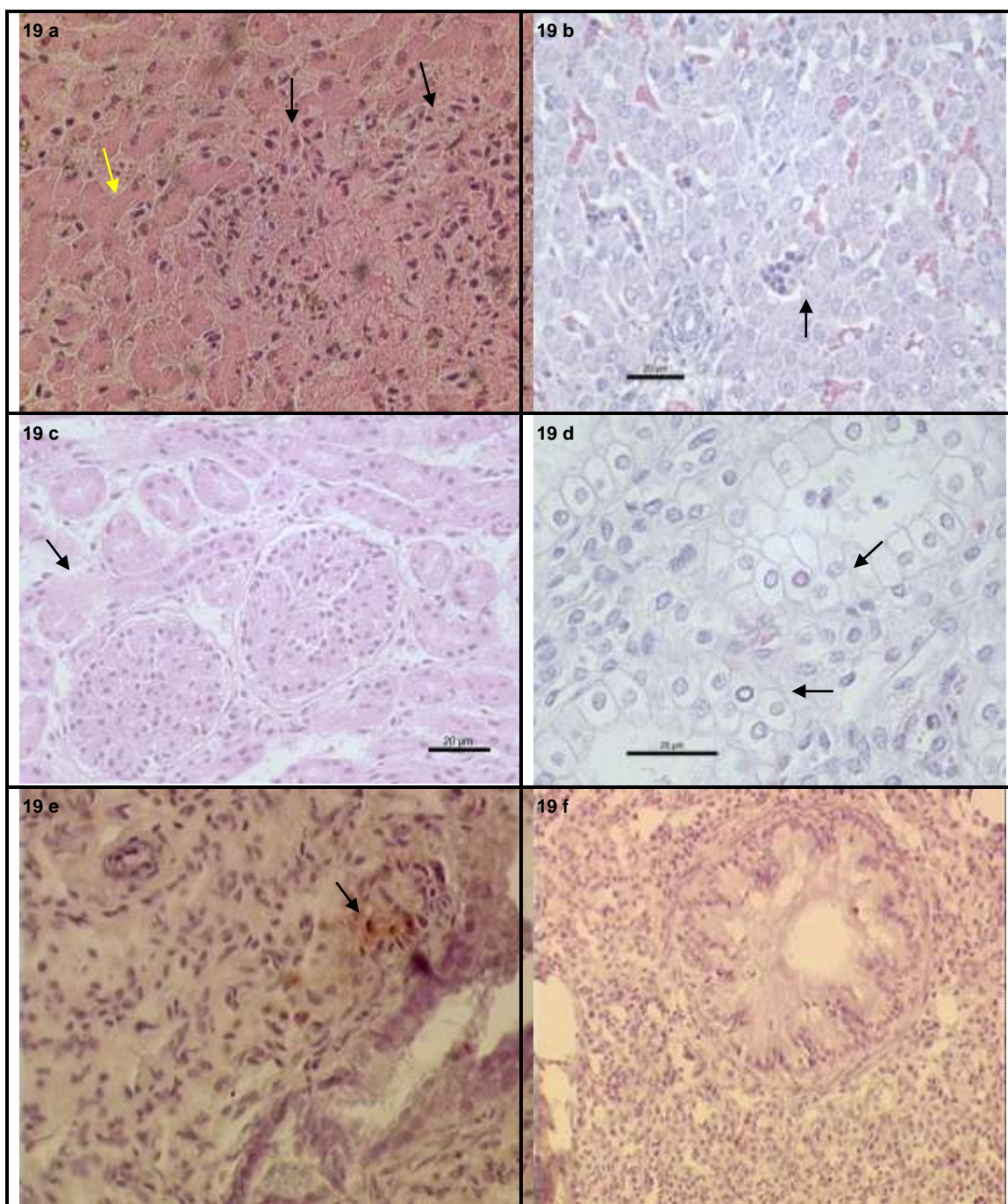


Figura 19. **a** - fígado de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), múltiplos e pequenos focos de necrose (setas pretas) com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração turva dos hepatócitos (seta amarela) 200x. **b** - fígado de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), sincício (seta preta) 600x. **c** - rim de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), degeneração tubular (seta) e nefrose 600x. **d** - rim de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), corpúsculos de inclusão intranuclear em células do túbulo renal (setas pretas) 600x. Coloração de H.E. **e** - IHQ de pulmão de feto equino abortado nº 1 (LAP 56517), utilizando o anticorpo anti-HVE-1 produzido a partir do isolado argentino AR8, observa-se discreta marcação positiva em pneumócitos (seta preta) - 400x. **f** - IHQ de pulmão de feto equino abortado nº 2 (LAP 58048), utilizando o anticorpo anti-HVE-1 produzido a partir do isolado argentino AR8, sem marcação, 400x.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

4.5.1 Análise dos resultados gerais

Neste trabalho, dos 105 fetos abortados, natimortos e potros até um mês de vida analisados, dois vieram à óbito devido à causas não infecciosas (isoeritrólise neonatal), representando 1,90% do total. Dentre os animais cujo diagnóstico estabelecido foram agentes infecciosos, dois de origem viral (HVE-1), representando 1,90%, 16 devido a agentes bacterianos (15,25%) e um devido a agente fúngico (levedura) (0,95%) e 84 (80,00%) amostras foram negativas para todos os agentes pesquisados (Tabela 1), destes, 82 (97,61%) apresentaram lesões histológicas predominantemente não-supurativas em pelo menos um dos órgãos avaliados e dois representando 2,39% do total, não apresentaram lesões.

Tabela 1 – Divisão do número de casos de abortamento e mortalidade perinatal equina, segundo grupo de classificação da causa ou do agente causal (São Paulo, 2014).

Causas de abortamento e mortalidade perinatal	Número de casos	Número de casos Animais analisados	% sobre o número de casos
Causas não infecciosas	2	105	1,90
Causas virais	2	105	1,90
Causas bacterianas	16	53	30,18
Causas fúngicas	1	53	1,88
Causa não estabelecida	84	105	80,00

4.5.2 Análise dos resultados obtidos pelas técnicas virológicas

Comparando-se os resultados das diferentes técnicas virológicas empregadas neste trabalho, observou-se que a técnica de PCR para HVE-1 apresentou maior sensibilidade na pesquisa de HVE-1 em materiais de fetos abortados em comparação com as demais técnicas empregadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento viral, PCR, IHQ e histopatologia (H.E.) para diagnóstico do HVE-1 (São Paulo, 2014).

Técnica	% Positivo (total)
Isolamento	0,95 % (1/105)
PCR	1,90 % (2/105)
IHQ (Ac VMRD)	0,00 % (0/105)
IHQ (Ac anti HVE-1, AR8)	0,95 % (1/105)
H.E.	0,95 % (1/105)

(Ac) Anticorpo

Frente às diferentes cepas analisadas o anticorpo policlonal anti-HVE-1 – VMRD[®] apresentou maior sensibilidade em relação ao anticorpo anti-AR8 frente às diferentes estirpes testadas (Quadro 8).

Quadro 8 - Positividade dos anticorpos (Ac) primários testados frente aos diferentes isolados de HVE-1 analisadas (São Paulo, 2014).

Espécie	Isolados	Anticorpo VMRD	Ac. Anti-HVE-1 (AR8)
Hamster	A9/92	-	-
Hamster	AR4	+ (SNC e Pulmão)	-
Hamster	A3/97	+ (SNC e Pulmão)	-
Hamster	ISO 72/10	+ (SNC)	-
Hamster	A4/72	-	-
Feto nº 01 (56517)	ISO 72/10	-	+ (Pulmão)
Feto nº 02 (58048)	ISO 36/13*	-	-

(-) negativo; (+) positivo; * ISO 36/13 – negativo no isolamento em três passagens de cultura de células, mas positivo à análise de PCR.

Observou-se que no hamster inoculado com a cepa ISO 72/10 houve o surgimento de lesões características em pelo menos um dos animais estudados, entretanto, no feto positivo nº 1 (LAP 56517) do qual foi realizado o referido isolamento, não foram observadas lesões sugestivas de infecção herpética (corpúsculos de inclusão e sincícios), porém, havia a presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocítico em todos os órgãos

(infiltrado associado à infecção viral), além de edema pulmonar (Quadro 9). Também observou-se a presença de macrófagos espumosos em todas as lâminas dos hamsters inoculados, entretanto, estas células não foram observadas no pulmão dos fetos equinos positivos analisados.

Quadro 9 – Avaliação da presença de lesões sugestivas de HVE-1 frente aos diferentes isolados estudados nos hamsters inoculados e nos fetos abortados positivos ao HVE-1 (São Paulo, 2014).

Espécie	Cepas HVE-1	Macrófagos Espumosos	Sincícios	Corpúsculos de inclusão viral	Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico
Hamster	A9/92	+	-	+ (SNC)	+
Hamster	AR4	+	+ (dois hamsters)	+ (dois hamsters)	+
Hamster	A3/97	+	-	+	+
Hamster	ISO 72/10	+	+ (um hamster)	+ (um hamster)	+
Hamster	A4/72	+	-	+ (um hamster)	+
Feto 1-56517	ISO 72/10	-	-	-	+
Feto 2-58048	ISO 36/13*	-	+ (pulmão e fígado)	+ (órgãos)	+

(-) negativo; (+) positivo;

* ISO 36/13 – negativo no isolamento em três passagens de cultura de células, mas positivo à análise de PCR.

Dentre os dois fetos equinos positivos, um era proveniente do Estado de São Paulo e outro não teve o Estado de origem informado em sua ficha de cadastro; dentre os fetos negativos a maioria das amostras foram provenientes do Estado de São Paulo (Tabela 3), entretanto, este resultado não representa valor estatístico significativo por se tratarem de amostras de conveniência.

Tabela 3 – Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento viral, PCR e IHQ para pesquisa de HVE-1, classificados por Estados de origem (São Paulo, 2014).

Estado de origem	Total Positivo (%)	Total Negativo (%)
Minas Gerais	0	8 (7,62%)
Distrito Federal	0	1 (0,95%)
Mato Grosso do Sul	0	2 (1,90%)
Pará	0	1 (0,95%)
Sergipe	0	1 (0,95%)
Tocantins	0	1 (0,95%)
Paraná	0	17 (16,20%)
Rio Grande do Sul	0	3 (2,85%)
Santa Catarina	0	1 (0,95%)
Rio de Janeiro	0	9 (8,58%)
São Paulo	1 (0,95%)	50 (47,62 %)
Não Informado	1 (0,95%)	9 (8,58%)
Sub-Total	2 (1,90%)	103 (98,10%)
Total geral		105 (100%)

Quanto à idade dos animais analisados, os dois fetos positivos não tiveram a idade informada em suas fichas cadastrais, bem como a maioria das amostras analisadas, entretanto, entre os demais fetos, cuja idade de abortamento/morte foi informada, a maior frequência foi entre zero a um mês de vida (Tabela 4).

Tabela 4 – Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento viral, PCR e IHQ para pesquisa de HVE-1, classificados por idade (São Paulo, 2014).

Idade	Total Positivo (%)	Total Negativo (%)
Feto 1-3 meses de gestação	0	6 (5,71%)
Feto 3- 6 meses de gestação	0	10 (9,52%)
Feto 7- 9 meses de gestação	0	14 (13,34%)
Feto > 9 meses de gestação	0	7 (6,67%)
Natimorto	0	3 (2,85%)
Potro até 1 mês de vida	0	21 (20,0%)
Não informado	2 (1,90%)	42 (40,1%)
Sub-Total	2 (1,90%)	103 (98,10%)
Total geral	105 (100,0%)	

4.5.3 Análise dos resultados obtidos pelas técnicas bacteriológicas

Todos os fetos abortados/natimortos/potros analisados para *Leptospira* spp. pelas técnicas de isolamento, PCR e IHQ foram negativos (Tabela 5).

Tabela 5 – Positividade dos fetos abortados/natimortos/potros frente ao isolamento, PCR e IHQ para diagnóstico da *Leptospira* spp. (São Paulo, 2014).

Técnica	% Positivo (total)
Isolamento	0,0 % (0/105)
PCR	0,0 % (0/105)
IHQ	0,0 % (0/105)

Com relação a outros patógenos bacterianos isolados a partir das amostras de fetos/natimortos/potros equinos em cultura pura ou preponderante dos órgãos e ou conteúdo estomacal, obteve-se um total de 32,07% (17/53) de isolamentos, sendo o agente mais frequentemente isolado a *Escherichia coli* (7,54%), seguida por *Enterobacter aerogenes* (5,66%), associação de *Escherichia coli* + *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. + *Bacillus* spp. (3,77%), e 1,89% igualmente para *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinobacillus* spp., *Rhodococcus equi* e Fungo Leveduriforme (Tabela 6).

Com relação aos 17 materiais positivos à análise bacteriológica, nos quais patógenos bacterianos foram isolados em cultura pura ou preponderante dos órgãos e ou conteúdo estomacal, obteve-se como agente mais frequentemente isolado a *Escherichia coli* 4/17 (23,53%), seguida por *Enterobacter aerogenes* 3/17 (17,65%), associação de *Escherichia coli* + *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. + *Bacillus* spp. 2 casos de 17 cada (11,76%), e 5,88% igualmente para *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinobacillus* spp., *Rhodococcus equi* e Fungo Leveduriforme, representando 1 caso de 17 cada (Tabela 6).

Não foi solicitado diferencial bacteriológico pelo cliente, para outros agentes diferentes da *Leptospira* spp. em 52 das 105 amostras encaminhados para análise, representando 49,52% do total.

Tabela 6 - Positividade dos fetos, natimortos, potros até um mês de vida frente ao isolamento para diagnóstico de bactérias e fungos patogênicos (São Paulo, 2014).

Agente isolado (exame bacteriológico)	Subtotal	% sobre as 53 amostras avaliadas	% sobre os 17 isolamentos positivos
*Negativo para bactérias patogênicas	36	67,92	—
<i>Escherichia coli</i>	4	7,54	23,53
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	5,66	17,65
<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i> spp.	2	3,77	11,76
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.	2	3,77	11,76
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1,89	5,88
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1,89	5,88
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	1,89	5,88
<i>Actinobacillus</i> spp.	1	1,89	5,88
<i>Rhodococcus equi</i>	1	1,89	5,88
Fungo leveduriforme	1	1,89	5,88
TOTAL GERAL	53	100%	100%

*Negativo para bactérias patogênicas: no diagnóstico diferencial, não foram isoladas bactérias patogênicas, inclusive a *Leptospira* spp.

Nos fetos, natimortos, potros positivos ao exame bacteriológico, as principais lesões encontradas foram a hiperplasia de polpa branca esplênica 12/12 (100%), hiperplasia linfóide tímica 6/7 (85,72%), e meningoencefalite não purulenta 6/7 (85,72) (Tabela 7), (Gráfico 1).

Tabela 7 – Lesões histopatológicas em órgãos de fetos equinos, natimortos ou potros com até um mês de vida positivos à análise bacteriológica, técnica H.E. (São Paulo, 2014).

Órgão	Nº de órgãos examinados	Lesão	Nº Órgãos com lesões Positivo no Bacteriológico	% Órgãos com lesões Positivo Bacteriológico
Rim	12	Glomerulonefrite não purulenta	7	58,33%
		Infarto Renal	0	0,0%
		Nefrose	3	25,00%
		Glomerulite bacteriana	0	0,0%
		*SAP	2	16,70%
Fígado	15	Hepatite não purulenta	7	46,66%
		Degeneração hepática	4	26,66%
		Necrose hepática	2	13,33%
		Hepatite purulenta	1	6,66%
		*SAP	1	6,66%
Coração	13	Miocardite não purulenta	3	23,77%
		Epicardite não purulenta	1	7,70%
		Pericardite não purulenta	0	0,0%
		Infarto do miocárdio	0	0,0%
		*SAP	9	69,23%
Baço	12	Hiperplasia folicular (linfóide) esplênica	12	100%
		*SAP	0	0,0%
Pulmão	14	Pneumonia purulenta	0	0,0%
		Pneumonia não purulenta	1	7,14%
		Pneumonia Fibrinosa	0	0,0%
		Congestão (pleural e do parênquima)	1	7,14%
		Pleuropneumonia não purulenta	9	64,28%
		*SAP	3	21,42%
Timo	7	Hiperplasia linfóide	6	85,72%
		*SAP	1	14,28%
SNC	7	Meningoencefalite não purulenta	6	85,72%
		Congestão e edema	1	14,28%
		*SAP	0	0,0%

*SAP - sem alterações histopatológica

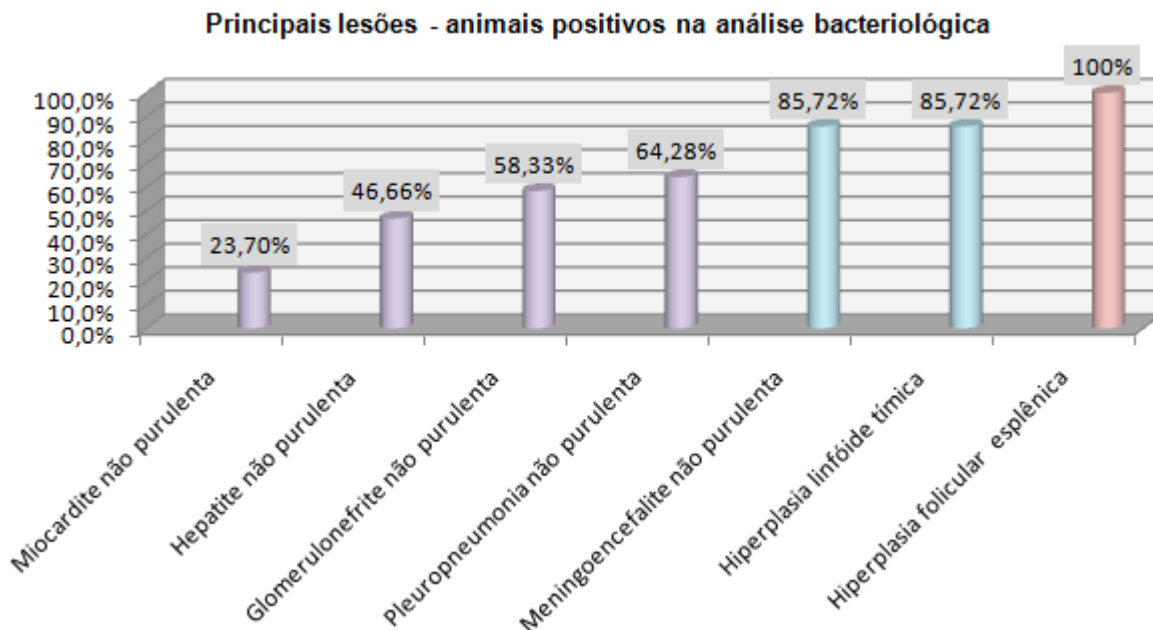


Gráfico 1 – Principais lesões encontradas nos fetos abortados, natimortos e potros até um mês de vida positivos às análises bacteriológicas em destaque as cores azul e rosa representando os órgãos que apresentaram maior ocorrência de lesões (São Paulo, 2014).

4.5.4 Análise dos animais negativos às técnicas bacteriológicas

Num total de 84 fetos abortados/natimortos/potros analisados, negativos em todas as análises (PCR, isolamento e IHQ) tanto para HVE-1 como para *Leptospira* spp. e outros agentes bacterianos pesquisados foram observadas diversas lesões em diferentes órgãos em cortes histológicos corados pela H.E., sendo as mais frequentemente encontradas: nefrose – 55,40% (41/74); hepatite não purulenta – 43,28% (29/67); miocardite não purulenta – 9,25% (5/54); hiperplasia de polpa branca esplênica – 90,62% (58/64); pneumonia não purulenta – 32,14% (27/84) e pleuropneumonia não purulenta – 35,71% (25/70); hiperplasia linfóide tímica – 78,94% (15/19) e meningoencefalite não purulenta – 62,16% (23/37) (Tabela 8), (Gráfico 2). Em dois casos, 2,39% (2/84) não foram encontradas lesões histopatológicas em nenhum dos órgãos analisados.

Tabela 8 – Lesões histopatológicas em órgãos de fetos equinos, natimortos ou potros com até um mês de vida negativos às técnicas bacteriológicas, técnica H.E. (São Paulo, 2014).

Órgão	Nº de órgãos examinados	Lesão	Nº Órgãos com lesões Negativo HVE-1	% Órgãos com lesões Negativo HVE - 1	Nº Órgãos com lesões Positivo HVE - 1	% Órgãos com lesões Positivo HVE - 1
Rim	74	Glomerulonefrite não purulenta	12	16,22%	0	0,0%
		Infarto Renal	3	4,05%	0	0,0%
		Nefrose	41	55,40%	2	2,70%
		Glomerulite bacteriana	5	6,76%	0	0,0%
		*SAP	11	14,87%	0	0,0%
Fígado	67	Hepatite não purulenta	29	43,28%	2	2,98%
		Degeneração hepática	18	26,90%	0	0,0%
		Necrose hepática	6	8,96%	0	0,0%
		Congestão de sinusóides	5	7,46%	0	0,0%
		Hepatite purulenta	0	0,0%	0	0,0%
		*SAP	7	10,44%	0	0,0%
Coração	54	Miocardite não purulenta	5	9,25%	0	0,0%
		Epicardite não purulenta	3	5,55%	1	1,85%
		Pericardite não purulenta	0	0,0%	0	0,0%
		Infarto do miocárdio	0	0,0%	0	0,0%
		*SAP	44	81,48%	1	1,85%
Baço	64	Hiperplasia folicular esplênica	58	90,62%	2	3,12%
		*SAP	2	3,12%	0	0,0%
Pulmão	70	Pneumonia purulenta	12	17,14%	0	0,0%
		Pneumonia não purulenta	25	35,71%	2	2,85%
		Pneumonia Fibrinosa	3	4,28%	0	0,0%
		Congestão (pleural e do parênquima)	7	10,00%	0	0,0%
		Pleuropneumonia não purulenta	12	17,14%	0	0,0%
		*SAP	8	11,42%	0	0,0%
Timo	19	Hiperplasia linfóide tímica	15	78,94%	0	0,0%
		*SAP	4	21,05%	0	0,0%
SNC	37	Meningoencefalite não purulenta	23	62,16%	2	5,40%
		Congestão e edema	2	5,40%	0	0,0%
		*SAP	10	27,02%	0	0,0%

* SAP - sem alterações histopatológica

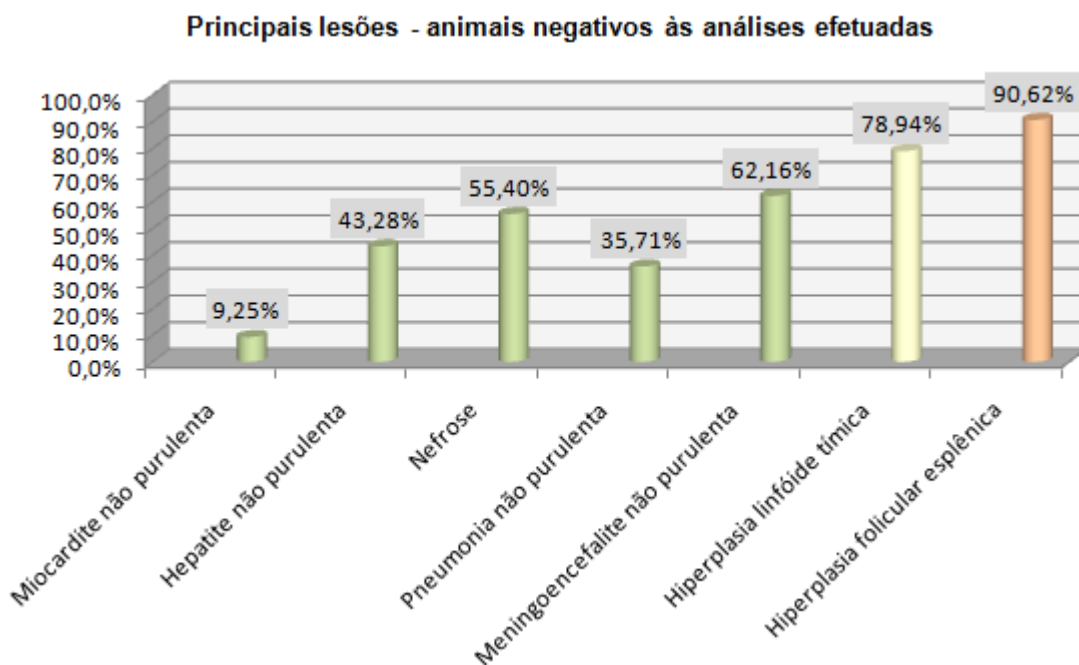


Gráfico 2 – Principais lesões encontradas nos fetos abortados, natimortos e potros até um mês de vida negativos às análises efetuadas, em destaque as cores amarelo e laranja, representando os órgãos que apresentaram maior ocorrência de lesões (São Paulo, 2014).

Nos fetos, natimortos, potros negativos às análises empregadas as principais lesões encontradas foram a hiperplasia de polpa branca esplênica 58/64 (90,62%), hiperplasia linfóide tímica 15/19 (78,94%) e meningoencefalite não purulenta 23/37 (62,16%), semelhante ao observado nos animais positivos às análises bacteriológicas. Entretanto, houve variação, em relação às lesões renais, sendo a mais frequente nos animais positivos para bactérias a glomerulonefrite não purulenta 7/12 (58,44%), enquanto que nos animais negativos às análises bacteriológicas e somados aos dois casos positivos à análise virológica, a lesão renal mais frequente foi nefrose 43/74 (58,10%).

5. DISCUSSÃO

5.1 *LEPTOSPIRA* spp.

A *Leptospira* spp. é reconhecida como uma importante enfermidade de caráter zoonótico e de grande impacto econômico em diversas espécies de produção animal devido a alterações reprodutivas e abortamentos (COSTA et al., 1998; BRASIL, 2010; MORIKAWA, 2010; MARCOLONGO- PEREIRA et al., 2012;).

As leptospiras podem sobreviver durante vários dias em águas de superfície com pH neutro e no solo, principalmente em zonas tropicais devido aos longos períodos de chuva, que deixam áreas úmidas onde estas bactérias conseguem se manter por um determinado tempo (semanas ou meses), estas características são importantes na continuidade da disseminação da doença entre as diversas espécies, principalmente em animais que vivem em áreas sombreadas de pastejo (como em diversas propriedades de bovinos e equinos no país). Uma vez que a propriedade tenha um animal contaminado, a possibilidade de transmissão de um animal para outro é elevada nas condições acima descritas, visto que este animal atuará como um reservatório da doença, podendo eliminar as leptospiras vivas no ambiente por longos períodos de tempo ou até mesmo durante toda a vida do animal (dependendo da espécie e sorovar envolvido). Em animais de confinamento intensivo, este risco pode ser ainda maior se o manejo da cama dos animais não for adequado (GUIMARÃES et al., 1982/83; REZENDE, 1997; BRASIL, 2010).

Em muitos estabelecimentos rurais, as condições de estocagem de alimentos para os animais de criação (ração, milho, feno, entre outros) são inadequadas, permitindo o acesso e abrigo de animais sinantrópicos, dentre os quais os roedores, principais reservatórios das leptospiras. Há também propriedades que associadas à criação de animais são produtoras de culturas de subsistência, onde as plantações também podem atrair os roedores, principalmente no caso de plantações de cereais. Uma vez instalados num local onde há fácil acesso, abrigo e alimentos, a população de roedores rapidamente aumenta e a presença destes reservatórios naturais de *Leptospiras* spp. numa propriedade torna o risco de leptospirose iminente (BRASIL, 2010).

Segundo Loureiro (2013), a falha na prevenção da leptospirose por meio da implementação de medidas de manejo (inclusão de novos animais no plantel sem um controle sanitário prévio) e ambientais (áreas alagadiças e presença de outros reservatórios) foi a causa de uma provável reinfecção de éguas receptoras de embriões, sendo as mesmas detectadas positivas à PCR mesmo após tratamento (antibioticoterapia

e vacinação), inferindo-se que a vacinação com bacterinas não foi capaz de impedir a reinfecção destes animais, uma vez que o agente, principalmente os sorovares incidentais *Icterohaemorrhagiae* e *Pomona* encontravam-se presentes no ambiente.

Quanto ao manejo sanitário da leptospirose, podemos inferir que, embora a vacinação com bacterinas antileptospirose confira proteção ao animal imunizado, a mesma é sorovar específica, ou seja, é somente capaz de proteger o animal das leptospiras cujo sorovar seja componente da vacina. Além disto, uma vez que o animal já apresente a infecção, não é capaz de eliminar o estado de portador renal e a consequente leptospiúria. Seu poder imunogênico também pode ser restrito em alguns casos, ou seja, baixos níveis de anticorpos pós-vacinais gerados, sendo este um fator importante a ser analisado durante o planejamento sanitário, sabendo-se que somente a vacinação não confere a proteção necessária ao plantel, sendo fundamental a associação de técnicas adequadas de manejo dos animais e do ambiente para se evitar surtos ou mesmo a permanência da *Leptospira* spp. em uma propriedade em níveis endêmicos (BOLIN et al., 1991; TABATA et al., 2002; MARCHIORI FILHO, 2007).

Em relação às técnicas diagnósticas para pesquisa de *Leptospira* spp. podemos citar o isolamento, a PCR e a SAM como as mais utilizadas. O isolamento da *Leptospira* spp. é lento e alguns materiais não são adequados à técnica, como, tecidos refrigerados de animais que morreram dentro de um período superior a 24 horas ou tecidos que foram submetidos a congelamento (BRASIL, 2010; DONAHUE et al., 1991). Em outros trabalhos, como de Pescador et al. (2004), o alto grau de contaminação tornou as amostras analisadas (cultivadas em meio EMJH) inviáveis para o isolamento bacteriano.

Nos últimos anos trabalhos têm demonstrado que as técnicas histológicas têm se mostrado de grande valor para o diagnóstico da *Leptospira* spp. em tecidos impróprios a outras provas diagnósticas (PESCADOR et al., 2004; LIMA et al., 2009). De acordo com Diniz et al. (2008), a técnica de IHQ utilizando anticorpos monoclonais específicos, mostrou-se eficiente na pesquisa de proteínas de membrana (a saber, adesinas LigA e LigB), de leptospiras patogênicas dentre as quais o sorovar Canicola.

Haanwinckel, Megid e Souza (2004), utilizando as técnicas de imunoperoxidase indireta em comparação à impregnação pela prata (Warthin-Starry) e isolamento bacteriano, em tecido renal de hamsters infectados obtiveram 100% de especificidade e sensibilidade com a IHQ, enquanto a técnica de cultivo mostrou-se inferior (77,5% de amostras positivas). As técnicas histológicas empregadas no referido experimento forneceram resultados satisfatórios na visualização das lesões e do agente em questão,

embora tenha havido algumas diferenças na intensidade de coloração de algumas lâminas na prova de imunoperoxidase devido a distribuição ao acaso das leptospiros na amostra.

Marchiori Filho (2007) observou que a técnica de Warthin-Starry também mostrou elevada sensibilidade ao agente em diversos órgãos de hamsters inoculados, inclusive em tecidos do sistema reprodutor como testículos e útero e que dependendo da via de inoculação, os sinais podem variar em intensidade, sendo as vias intraperitoneal e conjuntiva-nasal mais letais quando comparadas à via cérvico-vaginal, mas o estado de portador renal se instalou em todos os animais inoculados independentemente da via escolhida.

No presente trabalho, nenhum dos fetos avaliados foi positivo para *Leptospira* spp. segundo as técnicas empregadas (IHQ, isolamento e PCR) (Tabela 5). Este resultado pode ser atribuído a dificuldades diagnósticas e/ou endemicidade da doença associada à imunidade materna e a fatores ambientais de disseminação. Foi observado que para a pesquisa de *Leptospira* spp. a prova de IHQ apresentou sensibilidade frente ao sorovar e estirpe testados (sorovar Canicola, estirpe LO4), entretanto, fazem-se necessários outros estudos que avaliem se existe ou não reação cruzada entre os diferentes sorovares de *Leptospira* spp., para melhor se estabelecer a utilização desta técnica como possível método diagnóstico de rotina.

Por meio da coloração H.E. utilizada no presente trabalho foi possível avaliar que as lesões causadas pela *Leptospira* sorovar Canicola no controle positivo demonstraram um padrão de lesões compatíveis com as descrições da literatura de outros trabalhos utilizando hamsters como controles: áreas de hemorragia pulmonar multifocais, icterícia, congestão hepática, renal e esplênica e áreas de hemorragia no intestino. Microscopicamente, observou-se degeneração e necrose de coagulação do epitélio tubular renal, dissociação dos hepatócitos, áreas de hemorragia e edema em pulmões, e hemorragia em fígado e rins (OLIVA et al., 1998; HAANINCKEL et al., 2004; MARCHIORI FILHO, 2007) (Figuras 8 a, b, c, d, e, f) . Quanto às lesões em fetos equinos, não foi possível compará-las uma vez que não foram encontrados fetos positivos nas análises efetuadas na amostragem estudada, entretanto, em fetos as lesões são semelhantes às observadas em hamsters (HODGIN et al., 1989; POONACHA et al., 1993; PESCADOR et al., 2004; MARCOLONGO- PEREIRA et al., 2012).

Em relação aos fatores ambientais e de endemicidade ligados à doença, temos diversos fatores envolvidos, como a armazenagem dos alimentos, manejo dos animais, tipo de criação, presença de outros animais (qualquer espécie) portadores da doença na propriedade (BRASIL, 2010).

Estudos soroepidemiológicos revelaram altos índices de *Leptospira* spp. disseminados em populações bovinas e equinas em diversos Estados brasileiros. Vasconcellos et al. (1997), em um estudo utilizando a técnica de SAM, realizado em seis Estados (MG, RJ, SP, MS, PR e RS) encontraram elevada soropositividade - 60,4% (1.480/2.449) animais sororeagentes a pelo menos um sorovar dos 24 analisados, sendo *L. Hardjo* o mais frequente em rebanhos bovinos brasileiros – representando 76,78% do total de sorovares pesquisados.

Pires Neto, Hesse e Oliveira (2005), em um estudo realizado na cidade de Desidério Finamor (RS), utilizando amostras de soro equino, obtiveram um total de 74,51% (871/1169) animais sororeagentes. Lilenbaum (1998), utilizando amostras de soro de éguas, obteve um resultado de 42,96% (235/547) de soroprevalência em um estudo realizado em seis propriedades do Rio de Janeiro por meio da técnica de SAM.

No presente estudo a *Leptospira* spp. não se mostrou relevante como causadora de abortamento na espécie equina, apresentando taxa de 0,0% (0/105) (Tabela 5), semelhante ao encontrado nos estudos de Laugier et al. (2011), em que registraram-se somente sete isolamentos de um total de 1.822 fetos abortados, representado 0,38%; Moreira et al. (1998) 0,0% de isolamento; já no estudo de Genovez et al. (1995), obteve-se frequência de 1,88% (2/106).

Semelhantemente, estudos realizados por diversos autores para pesquisa de *Leptospira* spp. em fetos bovinos abortados, revelaram baixa ocorrência do agente em questão, sendo encontrado um índice máximo de 6,2% (16/257) em fetos avaliados por meio da técnica de IFD com anticorpo policlonal (GENOVEZ et al., 1993); 1,3% (17/1259) utilizando a técnica de IFI e isolamento (em amostras de fetos bovinos obtidas ao longo de 20 anos) (GENOVEZ et al., 2006); 0,61 % (3/490) utilizando a técnica de IFD (ANTONIASSI et al., 2013); 0,0% (0/100 amostras) por meio da associação de diversas técnicas – PCR, isolamento e Warthin-Starry (CASTANHO et al., 2011) e 0,0% (67/67) em estudo realizado por meio das técnicas de PCR e isolamento bacteriano (SCARCELLI et al., 2004).

Estes dados demonstram a endemicidade do agente na população bovina, semelhante ao que está ocorrendo na população equina, onde a soropositividade é alta, porém, o número de fetos abortados pela *Leptospira* spp. é baixo, demonstrando que o agente em questão está presente, amplamente disseminado, porém, seu hospedeiro encontra-se bem adaptado, apresentando resposta imune suficientemente capaz de debelar a infecção e gerar anticorpos protetores transferidos às gerações subsequentes via colostrado.

5.2 HERPES VÍRUS EQUINO TIPO 1

O Herpes-vírus equino 1, agente causal do aborto equino a vírus é relatado como um agente de grande importância na prática clínica dos equinos, tanto pelos gastos com tratamento e queda no desempenho que ocasionam como pela capacidade de gerar abortamentos. No presente estudo, trabalhou-se o diagnóstico deste agente por meio de diferentes técnicas (coloração H.E., IHQ, PCR e isolamento) para a pesquisa deste agente em fetos abortados, natimortos e potros até um mês de idade.

Foram utilizadas como controle cinco diferentes estirpes de HVE-1 (Quadro 6). Em relação à espécie utilizada como controle para a técnica de IHQ do presente estudo foi observado que a marcação somente com anticorpo secundário apresentou resultado satisfatório quando da utilização de hamsters, não sendo observada marcação de fundo nos órgãos. Por outro lado, quando efetuada a IHQ em pulmão de camundongos, observou-se uma discreta marcação de células do epitélio bronquiolar, o que pode interferir na leitura e interpretação dos resultados dos controles de IHQ para HVE-1.

Os hamsters inoculados neste estudo adoeceram independentemente da cepa utilizada, tendo todos sido inoculados pela mesma via, a intra-nasal. As lesões histopatológicas encontradas nos mesmos, em geral, foram semelhantes às descritas na literatura em todas as estirpes, havendo porém, pequenas variações quanto à presença de sincícios e corpúsculos de inclusão viral entre elas (Quadro 9) (TIMONEY, 1992; OSTLUND, 1994; WALKER; LOVE; WHALLEY, 1999; HASEBE et al., 2002).

Diferentemente dos resultados observados no estudo de Mori et al. (2009), em equinos adultos inoculados com o isolado A4/72, a infecção em hamsters com o mesmo isolado não se restringiu somente às vias aéreas superiores, havendo extensas áreas lesionais em lobos pulmonares (Figuras 11 f, 12 e) e variação em relação à sintomatologia, que em hamsters foi predominantemente neurológica (Figura 13 f) e não somente respiratória como em equinos. Estes dados sugerem uma maior susceptibilidade dos hamsters ao HVE-1 do que equinos, facilitando o estudo da patogenicidade do vírus nestes animais, entretanto, deve-se levar em consideração que os equinos estudados já apresentavam títulos de anticorpos neutralizantes do HVE-1 antes da inoculação viral (memória imunológica), o que pode ter neutralizado a multiplicação viral no trato respiratório destes animais e, conseqüentemente, diminuído o grau e tipo de lesões.

Também foi observado no presente estudo, a presença abundante de macrófagos espumosos nos pulmões de todos os hamsters inoculados com as diferentes cepas de HVE-1 estudadas (Figura 12 b) (Quadro 9), porém, estas células não foram encontrados

ao exame histopatológico de nenhum dos fetos equinos abortados, embora exista trabalho científico comprovando sua presença em lavados broncoalveolares de equinos adultos experimentalmente inoculados com a cepa A4/72 de HVE-1 (título $10^{6.6}$ DICT₅₀/mL). Em hamsters, o surgimento destas células mostrou-se mais precoce que em equinos (3 d.p.i em hamsters contra + 23 a + 30 d.p.i em equinos) (MORI, 2005). Estudos futuros se fazem necessários a fim de se compreender as diferenças com relação à ação dos macrófagos teciduais em fetos abortados e equinos adultos infectados pelo HVE-1.

El Habashi et al. (2011), trabalhando com a inoculação de Herpesvírus equino tipo 9 (HVE-9) em hamster, vírus de elevada identidade molecular com o HVE-1, observaram que, dependendo da via de inoculação, os sinais clínicos podem variar; utilizando-se das oral e intraperitoneal, via intranasal, foram observadas lesões histopatológicas no SNC semelhantes às descritas neste trabalho, como meningoencefalite linfocítica, necrose, agregação perivascular, degeneração neuronal vacuolar, além de corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílica (Figuras 13 a, b, c, d, e, f), enquanto que pelas vias intravenosa e ocular não se observou sintomas neurológicos ou lesões. Neste estudo com HVE-9 não houve sintomatologia respiratória, logo, o padrão de lesões em pulmão não pode ser comparado.

Mori et al. (2012a) avaliaram os efeitos das cepas brasileiras A4/72; A9/92 e A3/97 de HVE-1, também pela via de inoculação intra-nasal, em camundongos, encontraram um padrão de lesões semelhante ao observado neste estudo em hamsters, porém, o desenvolvimento dos sinais neurológicos e respiratórios nos hamsters foi mais agudo e severo que nos camundongos, com todos os animais apresentando sintomatologia neurológica no 3º d.p.i., mesmo os inoculados com a cepa A3/97 (embora de forma mais leve), havendo também marcação de neurônios em região de bulbo olfatório e áreas próximas (Figura 17 d); ao contrário dos camundongos, nos quais esta estirpe não se mostrou neurovirulenta, apesar de haver sido recuperada no cérebro de um camundongo imunodeficiente BALB/c nude por meio da técnica de cultivo e isolamento viral. Em ambos os trabalhos, observou-se que a cepa A9/92 revelou um padrão de lesão mais severo, em pulmão e SNC o que sugere sua maior virulência em relação às demais cepas avaliadas (Figuras 10 b, 11 b, 12 f, 13 b).

A evolução da infecção neurológica herpética causada pela inoculação das cepas de HVE-1 A9/92, A4/72 e ISO 72/10 em hamsters foi semelhante à observada na mieloencefalopatia herpética dos equinos cuja sintomatologia se inicia com sinais leves de apatia, anorexia e ataxia e tem sua evolução de forma bastante aguda, atingido sua maior intensidade em dois a três dias (ALLEN, 2002; COSTA et al., 2008).

Embora a mieloencefalopatia herpética equina (MEH) seja uma manifestação do HVE-1 de frequência menos comum em equinos, observou-se que a suscetibilidade dos hamsters à infecção foi alta e que a maioria dos isolados brasileiros (ISO 72/10, A9/92, A4/72) apresentou elevado grau de neuroinvasividade causando lesões no SNC de grau moderado a severo, lesões estas semelhantes às observadas em hamsters inoculados com o HVE-9 em hamsters e HVE-1 em camundongos (ROIZMANN et al., 1992; MORI, 2005; FUKUSHI, 2000; EL-HABASHI et al., 2011; EL-NAHASS et al., 2011; MORI, 2012a).

O vírus tende a permanecer inerte ou em estado de latência no gânglio do nervo trigêmio, porém, ele mantém a sua capacidade de gerar novos ciclos replicativos ao longo do tempo de vida do hospedeiro; no presente trabalho observou-se que o vírus não se mostrou inerte no SNC dos hamsters inoculados experimentalmente e nos fetos equinos positivos, sendo encontradas lesões e corpúsculos de inclusão viral em células da glia e neurônios, demonstrando intensa atividade viral no SNC (ROIZMANN et al., 1992; SÁENZ et al., 2008).

Diferentemente do que sugerem os autores Walker, Love e Whalley 1999; Hasebe et al. (2002), em trabalhos efetuados a fim de se avaliar a neuropatogenicidade de diferentes estirpes de HVE-1, por meio da inoculação intranasal de camundongos, no presente estudo, em hamsters foi observada exacerbada sintomatologia neurológica nas estirpes A9/92, A4/72 e ISO 72/10 independente da adaptação prévia destas cepas em células neuronais (Quadro 6), assim como no trabalho de Mori et al. (2012), demonstrando que há estirpes que se apresentam neuropatogenicidade independentemente do meio em que são cultivadas.

Observou-se no presente estudo marcação pela IHQ em neurônios e células da glia restritas à região de bulbo olfatório e área próxima, nos hamsters inoculados com os isolados A3/97 e AR4 (sintomas respiratórios) (Figuras 17 d, e), e marcação de neurônios e células da glia predominantemente em região de bulbo olfatório, e em grupos de neurônios presentes em região de septo estriado e diencéfalo caudal, nos hamsters inoculados com o isolado ISO 72/10 (sintomas neurológicos e respiratórios) (Figura 17 f), semelhante ao estudo de Gosztonyi; Borchers e Ludwig (2009), em que foi observada migração do vírus em neurônios em diferentes regiões SNC nos animais inoculados com as cepas mais virulentas (sintomas neurológicos e respiratórios), ao passo que nos animais inoculados com os isolados de menor patogenicidade, o vírus permaneceu restrito à região de bulbo olfatório. Estes dados demonstram a necessidade de maiores estudos a fim de se compreender qual mecanismo viral presente nos isolados de maior virulência torna possível a migração do vírus por diferentes áreas do SNC.

Estas lesões encontradas no SNC dos animais experimentalmente infectados servem de alerta ao risco de lesões neurológicas que também podem existir na espécie equina, visto que estas estirpes foram isoladas no país, e demonstram a necessidade de maior vigilância em locais de grande concentração de animais, uma vez que a transmissão do vírus via aerossóis nasais é muito fácil e em alguns países como América do Norte e Europa têm sido relatados casos recentes de surtos de manifestações neurológicas em equinos causados pelo HVE-1 (VANDEKERCKHOVE et al., 2010).

O aborto equino a vírus é reconhecido como enfermidade reprodutiva, causando abortamento em éguas. Entretanto, neste trabalho, foram encontrados apenas dois fetos positivos ao HVE-1, confirmados pela técnica de PCR, representando um índice de 1,90% (2/105) (Tabela 2) das amostras avaliadas.

De acordo com Timoney (1992), Ostlund (1994), Allen (2002) e Galosi et al. (2004) é possível visualizar evidências histopatológicas da infecção herpética em vários órgãos. As lesões histopatológicas encontradas nos fetos positivos do presente estudo (sincícios, corpúsculos de inclusão viral e infiltrado inflamatório linfoplasmocítico) (Figuras 18 b, d, f, 19 b, d) foram semelhantes às descritas na literatura, sendo que no feto positivo 2 (LAP 58048) analisado neste trabalho, as lesões encontradas foram fortemente sugestivas de HVE-1, sendo seu diagnóstico sugerido antes mesmo de serem obtidos os resultados das provas virológicas (isolamento e PCR), entretanto, houve um resultado discordante no tipo de lesões histopatológicas no feto positivo 1 que, embora positivo na PCR e no isolamento, possuía infiltrado inflamatório mononuclear em vários órgãos, porém, não foram encontrados sincícios pulmonares e inclusões intranucleares eosinofílicas sugestivos de infecção herpética (Figuras 18 a, c, e, 19 a, c), o que demonstra a importância de se associar diferentes técnicas para o diagnóstico da enfermidade, uma vez que o aparecimento destes corpúsculos é transitório e os sincícios nem sempre se fazem presentes em diferentes órgãos, não significando, portanto, a ausência destes, resultado negativo à infecção herpética.

Avaliando-se as demais técnicas diagnósticas empregadas neste trabalho, observou-se que a IHQ utilizando o anticorpo anti-HVE-1 VMRD[®] apresentou sensibilidade limitada, marcando algumas estirpes (AR4, A3/97 e ISO 72/10) e não reconhecendo outras (A9/92 e A4/72) e nem as estirpes presentes nos animais de campo (ou seja, nos fetos abortados, positivos) (Figuras 17 b e c) (Quadro 8), este resultado sugere a possibilidade dos isolados brasileiros possuírem um elevado grau de diversidade antigênica em relação aos vírus circulantes nos Estados Unidos (país onde o anticorpo comercial é produzido, a partir de isolado de feto equino abortado oriundo do referido país), o que explicaria o fato

desta técnica não apresentar o resultado esperado quando realizado com amostras brasileiras. Por outro lado, utilizando-se o anticorpo primário produzido a partir do isolado AR8 (Universidade de La Plata - Argentina) houve marcação positiva somente em algumas áreas restritas do pulmão na amostra do feto positivo 1 (LAP 56517) (Figura 19 a), porém, este anticorpo não foi capaz de reconhecer a mesma estirpe viral (ISO 72/10) no pulmão do hamster inoculado (Quadro 8), sugerindo que o mesmo isolado pode apresentar variações de comportamento em hospedeiros de espécies diferentes. Uma forma de se melhorar a sensibilidade do soro hiperimune contra o HVE-1, frente às amostras de campo, seria sequenciar o genoma das estirpes circulantes, verificar o grau de homologia e efetuar a produção de anticorpos primários a partir dos isolados homólogos.

Estes resultados foram discordantes dos obtidos por Schuthless, Collins e Carman (1993), em que por meio da técnica de Imunoperoxidase (técnica similar à IHQ) foi possível detectar o HVE-1 em 100% das amostras, mesmo em tecidos autolisados de fetos equinos abortados, mostrando-se esta técnica mais sensível que as provas de IFD e sorologia em materiais mal conservados (onde o vírus pode estar inviável ou em baixos títulos).

Em geral, as lesões macroscópicas encontradas em casos de aborto são autólise leve, com quantidade aumentada de fluido serosanguinolento nas cavidades corporais e placentite moderada difusa, estas lesões puderam ser observadas nos dois casos, porém, não são de grande valor diagnóstico, visto que estão presentes na maioria dos animais com exceção da placentite, havendo a necessidade da utilização de técnicas laboratoriais específicas para o esclarecimento destes casos (MOREIRA, 1992; HONG et al., 1993; MILLER; TURK, 1993; ALLEN, 2002).

O HVE-1 possui como principal característica a possibilidade de latência nos linfonodos e no gânglio do nervo trigêmeo, podendo sofrer uma reativação endógena frente a um estado de imunossupressão em qualquer fase da vida de seu hospedeiro. Este estado de quiescência dificulta tanto o diagnóstico clínico quanto o laboratorial (SAÉNZ, GÓEZ; HERRERA, 2008).

Alguns trabalhos como o de Hong et al. (1993) demonstraram que a prática de vacinação para o aborto equino a vírus resultou em uma drástica redução no número de casos, porém, observou-se um pequeno número de animais que continuaram abortando mesmo após a vacinação sistemática, fato que os autores associam à latência viral e sua reativação frente a estados de imunossupressão, no presente estudo, de forma semelhante, as duas fêmeas que abortaram eram vacinadas, uma de forma sistemática (mãe do feto 2) e a outra (mãe do feto 1) não relatada, entretanto, mais estudos em relação à proteção vacinal ainda são necessários para se concluir a se a real causa destes

abortamentos por HVE-1 não estaria ligada também à variabilidade das diferentes estirpes circulantes, fato que dificultaria aos anticorpos vacinais o reconhecimento do agente no organismo do hospedeiro, o que também foi observado com os anticorpos anti-HVE-1 utilizados para diagnóstico imunohistoquímico da enfermidade conforme o já mencionado em parágrafos anteriores.

A utilização de técnicas laboratoriais como o isolamento viral em cultura de células sensíveis ao agente e sua posterior confirmação pela PCR, associados à presença de lesões histopatológicas caracterizadas por infiltrado inflamatório mononuclear no sistema nervoso central, fígado e pulmão, sincícios e corpúsculos de inclusão intranuclear acidofílicas em diferentes células como hepatócitos, linfócitos, epitélio bronquiolar, epitélio tubular renal e astrócitos comprovam ser infecção herpética de caráter ativo e não tratar-se de latência viral, sendo importante a associação do diagnóstico virológico (PCR e isolamento viral) aos achados histopatológicos na interpretação dos resultados laboratoriais do HVE-1, para que seja possível alcançar um diagnóstico definitivo confiável tanto para resultados negativos quanto para positivos de infecção herpética.

Conforme já mencionado anteriormente, no presente estudo, obtiveram-se apenas duas amostras positivas ao HVE-1, representando 1,90% (2/105) do total (Tabela 2), considerado um índice baixo.

No estudo do HVE-1 em fetos equinos, diversos autores têm apresentado taxas que variam de altas a baixas, de acordo com a região e período estudados. Segundo Schultheiss, Collins e Carman (1993), em 20 casos de aborto equino, em estudo realizado nos Estados Unidos, 7 (35%) foram positivos na imunoperoxidase, isolamento viral e imunofluorescência, bem como apresentavam lesões histopatológicas típicas. Laugier et al. (2011), em um estudo retrospectivo de casos de abortamento equino na França, encontraram frequência de abortamento de 6,9% (126/1.822) por meio das técnicas de isolamento viral, imunofluorescência e confirmação pela PCR. Marcolongo-Pereira et al. (2012), por meio das técnicas de obtiveram um total de 4,2% (3/26) de isolamentos positivos para HVE-1 em materiais oriundos da região de Rio grande do Sul, Brasil. Moreira et al. (1998), em um estudo de causas de abortamento equino na região e Curitiba, Brasil, encontraram frequência de 8,0% (4/50) de abortamentos por HVE-1 por meio das técnicas de imunofluorescência, inoculação em cultivo celular e inoculação em camundongos.

Quanto à endemicidade da doença, inquéritos soroepidemiológicos no Brasil revelaram a presença de animais soropositivos em diferentes regiões do país, o que

demonstra o elevado grau de disseminação do HVE-1 na população equídea (WEIBLEN et al., 1994; CUNHA et al., 1999; AGUIAR et al., 2008; LARA et al., 2010).

Os índices de soropositividade e animais assintomáticos ao HVE-1 encontrados em plantéis equinos no Brasil sugerem a endemicidade da infecção herpética (CARVALHO et al., 2000a), podendo ser pressuposto que a baixa ocorrência de fetos equinos abortados infectados (1,90%) pelo HVE-1 do presente trabalho deva-se à proteção humoral materna. A análise do soro sanguíneo materno conjuntamente ao feto/placenta é importante para interpretar esta hipótese, porém, poucas vezes o soro da égua que abortou é encaminhado para sorodiagnóstico.

De forma semelhante, populações bovinas endemicamente infectadas pelo Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1) apresentam também elevada soropositividade com índices de 54,2% (386/712) pelo teste ELISA em um rebanho (DEL FAVA et al., 2006), 51,1% (18.855/36.885) em rebanhos de diversos Estados brasileiros, utilizando a técnica de virusneutralização (PITUCO et al., 2006), 50,85% (179/353) em um estudo realizado em 73 rebanhos de corte de quatro assentamentos rurais do Município de Corumbá, MS (TOMICH et al., 2004) e 86,2% (1715/1988) em vacas procedentes de 85 propriedades diferentes do Município de Monte Negro, Estado de Rondônia, utilizando-se a técnica de virusneutralização (OKUDA, et al., 2006) nos rebanhos bovinos, enquanto que a frequência de abortamento também é baixa 2,04% (17/833) (PITUCO; DEL FAVA, 2003).

Os dados sugerem que a baixa incidência de fetos positivos para *Leptospira* spp. e HVE-1 pode ser atribuída à endemicidade dos agentes gerando proteção natural, associadas à melhorias e ao aumento da prática de vacinação sistemática para estas doenças nas populações equinas, nos últimos anos, conferindo imunidade às matrizes e consequentemente evitando o abortamento, bem como devido à melhorias no manejo ambiental e nutricional nos sistemas de criação animal (SMITH, 1993; SCARCELLI et al., 2004; DEL FAVA et al., 2006).

5.3 FETOS NEGATIVOS PARA HERPESVÍRUS EQUINO TIPO – 1 E LEPTOSPIRA ÀS ANÁLISES EMPREGADAS

No presente estudo, dos 105 fetos abortados, natimortos e potros até um mês de vida analisados, 84 (80,0%) (Tabela 1) não tiveram a causa da morte estabelecida, destes, 82 (97,61%) apresentaram lesões histológicas predominantemente não-supurativas em

pelo menos um dos órgãos avaliados (Tabela 8) (Gráfico 2) e apenas dois não apresentaram lesões (2,39%).

De forma semelhante, Marcolongo-Pereira et al. (2012), obtiveram um total de 34 casos inconclusivos entre 72, representando 47,2% do total. Antoniassi et al. (2013), não conseguiram estabelecer um diagnóstico conclusivo em 53,67% (263/490) dos fetos bovinos avaliados por diferentes técnicas para pesquisa de bactérias, vírus e protozoários mais frequentes relatados como causadores de abortamento na população bovina. No estudo de Genovez et al. (1993), não foi possível estabelecer um diagnóstico em 62,6% (161/257) dos fetos bovinos abortados avaliados por técnicas bacteriológicas.

Dentre as 105 amostras, foram analisados bacteriológicamente, 53 fetos/natimortos/potros até um mês de vida, os patógenos bacterianos isolados em cultura pura ou preponderante dos órgãos e ou conteúdo estomacal, mais frequentemente isolados, foram coliformes como a *Escherichia coli* (7,54%), seguido por *Enterobacter aerogenes* (5,66%), associação de *Escherichia coli* + *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. + *Bacillus* spp. (3,77%), seguidos por não coliformes, com frequência de 1,89% para os seguintes agentes: *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinobacillus* spp., *Rhodococcus equi* e Fungo Leveduriforme (Tabela 6). Os agentes coliformes estão associados a contaminação fecal do trato genital e do ambiente, assim como as cocobactérias são contaminantes de pele e mucosa, apontando a necessidade de implantação de medidas higiênico-sanitárias a fim de prevenir a infecção ascendente do trato genital (GRUNERT, BIRGEL, VALE, 2005).

No estudo de Moreira et al. (1998), semelhante aos dados obtidos no presente estudo, observa-se que agentes como *Streptococcus* Beta hemolítico (17,6%), *Escherichia coli* (11,8%) e *Staphylococcus* spp. (11,8%) também se mostraram frequentes como causas de abortamento equino.

De forma semelhante, Genovez et al. (1993), em fetos bovinos abortados em 37,4% (96/257) foram diagnosticadas como causas bacterianas, tais como: *Brucella abortus* (6,2%), *Leptospira* spp (6,2%), *Staphylococcus aureus* (5,4%), *Campylobacter fetus* (4,7%) e *Streptococcus* Beta hemolítico (3,5%).

Marcolongo-Pereira et al. (2012), relataram em seu estudo que 36,1% dos casos de abortamento na espécie equina deveram-se a agentes bacterianos, sendo *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira* spp., *Streptococcus* beta hemolítico, *Escherichia coli* e *Streptococcus* sp. os agentes mais isolados.

Os agentes fúngicos não apresentaram grande frequência no presente estudo, sendo isolado somente um fungo leveduriforme, não sendo possível realizar a identificação

do agente, com frequência de 1,89% (1/53) em todos os fetos examinados, taxa semelhante à descrita por Genovez et al. (1995), em que a frequência encontrada para estes agentes como causadores de abortamento na espécie equina foi de 0,94% (1/106), sendo isolada neste último *Candida* sp.; estes dados demonstram que a infecção fúngica, principalmente por fungos oportunistas também pode ocorrer, entretanto, sua participação como agente causal de abortamentos na espécie equina é relativamente baixa, se comparada à participação de agentes virais e principalmente bacterianos.

Embora não tenha sido objetivo deste trabalho investigar causas parasitárias, o trabalho realizado por VILLALOBOS (2013) em amostras de fetos equinos abortados encaminhados ao Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, diagnosticou uma significativa frequência de abortamento equino por *Toxoplasma gondii* - 9,5% (2/21), evidenciando que o abortamento por protozoário ocupa um papel importante como agente causal, devendo sendo recomendada sempre sua investigação no diagnóstico diferencial. Entretanto, na literatura consultada, este agente não foi citado (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005, MOREIRA, 1992) (Quadros 2 e 3).

Somando-se os materiais negativos e positivos às análises empregadas, os órgãos com maior frequência de lesões foram baço e timo, que apresentaram hiperplasia reacional de 94,87% (74/78) e 80,77% (21/26) respectivamente (Tabelas 7 e 8). Estas lesões são sugestivas de abortamento infeccioso por agente causal a esclarecer uma vez que há respostas inflamatórias em diversos órgãos associadas a reações em órgãos linfóides (timo e baço), entretanto, mais estudos na área fazem-se necessários para que seja possível estabelecer se a alta frequência de reação linfóide nestes órgãos é realmente decorrente de processos infecciosos ou se ocorrem devido ao processo de morte do animal independentemente da causa e idade dos mesmos.

Houve variação, em relação às lesões renais, sendo a mais frequente nos animais positivos para bactérias a glomerulonefrite não purulenta 7/12 (58,44%), enquanto que nos animais negativos às análises bacteriológicas a lesão renal mais frequente foi nefrose 41/74 (55,40%). Sabe-se que as glomerulonefrites são associadas a processos de septicemia, enquanto que as nefroses são associadas ao processo de morte do animal, porém, verificou-se neste estudo que os animais positivos a agentes virais geraram processo de nefrose em rins em 100% dos casos (2/2), entretanto, não é possível associar com precisão a presença de nefrose à ação de vírus devido ao baixo número total de animais positivos a estes agentes encontrados.

Analisando-se conjuntamente os trabalhos citados, os dados obtidos a partir das análises dos materiais de rotina laboratorial sugerem que, provavelmente, existem agentes

infecciosos envolvidos em abortamentos, tanto na espécie equina quanto na bovina, que não estão sendo detectados pelas provas diagnósticas comumente utilizadas, sendo necessário se buscar um aperfeiçoamento das técnicas já existentes ou mesmo a associação de técnicas não utilizadas rotineiramente, como técnicas de apoio em casos de resultados negativos às provas de isolamento e PCR, em que a análise histopatológica revele lesões sugestivas de abortamento por um agente infeccioso a esclarecer, ou ainda se estabelecer a pesquisa de novos agentes não associados comumente a casos de abortamentos na espécie equina (MOREIRA et al., 1998; GENOVEZ et al., 1993; GENOVEZ et al., 1995; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; ANTONIASSI et al., 2013).

Dentre os fetos, natimortos, potros analisados, por técnicas bacteriológicas, não foi possível se estabelecer um agente causal em 67,92% (36/53) dos casos (Tabela 6). Diversos são os fatores que podem interferir na qualidade da amostra enviada ao laboratório na rotina, onde se observa que poucos são os materiais que chegam em condições adequadas de conservação (seja quanto à temperatura da amostra, bem como às condições em que as mesmas são colhidas à campo), devido à dificuldade em se manter condições ideais de esterilidade dos materiais utilizados e antissepsia em ambientes não preparados estruturalmente para esta finalidade (GENOVEZ et al., 1995).

Observa-se na prática que, mesmo os animais enviados para o procedimento de necropsia no Instituto Biológico, frequentemente chegam em condições desfavoráveis de conservação (temperatura ambiente, pouco refrigerados ou mesmo congelados) e embora seja realizada uma coleta adequada e cuidadosa dos diversos órgãos, torna-se difícil estabelecer um diagnóstico final pelas técnicas convencionais. Além disso, as fichas clínico-epidemiológicas, muitas vezes não são encaminhadas, ou são encaminhadas parcialmente preenchidas e estas informações são importantes na discussão do caso e fechamento do diagnóstico causal.

A morte fetal pode ocorrer não necessariamente em decorrência da ação do micro-organismo diretamente sobre o feto, mas também devido à influência de toxinas e alterações na circulação fetal devido à processos infecciosos agudos geradas por estes patógenos agindo sobre a fêmea prenhe (septicemia materna), sendo importante para o fechamento de um caso de abortamento não somente o material fetal, mas também amostras sorológicas da mãe (GENOVEZ et al., 1995). Placenta, cordão umbilical e corrimentos vaginais ou uterinos após o parto também devem ser avaliados, entretanto estes materiais não costumam ser rotineiramente encaminhados ao laboratório, como observado no estudo de Genovez et al. (1993) em que foi constatado que a placenta foi um dos órgãos que tiveram menor índice de encaminhamento ao laboratório 1,70%

(8/473). Laugier et al. (2011) observaram que as causas não infecciosas de alterações placentárias e em cordão umbilical representaram 21,18% (386/1822) das causas de abortamento em equinos, mostrando a importância do envio destes materiais também para o fechamento de causas de abortamento não infeccioso.

Ainda segundo Laugier et al. (2011), o envio dos anexos fetais (placenta e cordão umbilical) é importante para aumentar as chances de acerto diagnóstico, em casos de torções umbilicais ou outras anomalias dos anexos fetais bem como em casos de infecções feto-placentárias, que em seus estudos representaram 63,7% (869/1822) dos casos. De forma semelhante, é importante o envio de suabe cérvico-uterino da fêmea que abortou para que seja efetuado o isolamento bacteriano e antibiograma.

5.4 GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO EQUINO

O elevado número de casos de abortamento por agentes bacterianos, observado no presente estudo e em outros trabalhos semelhantes (GENOVEZ et al., 1995; MOREIRA et al., 1998; LAUGIER et al., 2011; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012), está diretamente ligado ao manejo inadequado do ambiente (bairros, piquetes) e das próprias fêmeas prenhes. A falta de higienização ambiental correta favorece a permanência no ambiente de bactérias e fungos provenientes do próprio trato genito-urinário e gastrointestinal destes animais; além disso, em condições de prenhez ocorre uma dilatação dos grandes lábios da vulva, que devido à anatomia da fêmea equina favorece a entrada de sujidades provenientes da defecação da própria fêmea, cujos agentes presentes, por via ascendente acabam migrando para o interior do útero e placenta, gerando um processo inflamatório, que conseqüentemente leva à expulsão do feto (GENOVEZ et al., 1995).

A causa mais frequente de infertilidade nas éguas está relacionada às infecções uterinas, originadas por contaminação microbiana, durante o parto, por complicações do puerpério ou da gestação, bem como no período pós-parto, especialmente durante a cópula (ROBERTS, 1986).

O trato genital da égua apresenta particularidades específicas, determinando a existência de fêmeas mais susceptíveis às infecções, quer seja por apresentarem defeitos de conformação e angulação da vulva e rima vulvar, perda do tônus da massa muscular do períneo, como também pelo deslocamento, em direção cranial do esfíncter anal durante o estro (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005). Também outros fatores ocasionais estão associados, como intervenções obstétricas mal conduzidas, partos distócicos, diminuição da imunidade, falta de higiene durante a cópula ou biotecnologia da reprodução e maior

patogenicidade de alguns germes (BADER; MERKT, 1992, *apud* GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

De acordo com Grunert, Birgel e Vale (2005), dentre as causas predisponentes para infecção via ascendente em éguas - vagina, cérvix e útero - citam-se as lesões da vagina, vestíbulo vaginal e vulva, em consequência a partos distócicos, sendo estas lesões dilacerantes e que apresentam variáveis graus de gravidade, desde escoriações e contusões superficiais até ruptura do períneo, originando fístulas reto-vaginais ou perfurações da vagina e do períneo; estas lesões dilacerantes, em suas diferentes evoluções, determinam cicatrizes causadoras de retração da comissura da vulva, do vestíbulo ou da vagina, e conseqüentemente a imperfeita oclusão destes órgãos, entre as quais pnemovagina e urovagina, cuja correção cirúrgica reparadora é recomendada (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Muitos destes agentes bacterianos também são frequentemente isolados de mucosas e mãos humanas, como os estafilococos, o que pode sugerir um manejo inadequado por parte dos tratadores e veterinários destes animais. Todos os cuidados na antisepsia das mãos, o uso correto e indispensável de equipamentos de proteção individual (luvas para procedimentos) e a antisepsia do próprio trato genito-urinário da égua antes do procedimento de palpação são fundamentais para se minimizar as possibilidades de abortamento por agentes oportunistas.

De acordo com Moreira et al. (1998), deve-se dar atenção especial a todo caso de abortamento em uma propriedade de criação, visto que o feto e seus anexos, bem como secreções provenientes do trato reprodutor feminino após o abortamento, constituem-se potenciais fontes de infecção aos demais animais da propriedade. É recomendada a completa incineração destes materiais após necropsia e colheita de materiais, bem como a incineração da cama do(s) animal(is) envolvido(s) no caso e completa desinfecção do ambiente por agentes químicos desinfetantes após completa limpeza e retirada de matéria orgânica do ambiente, permitindo assim a ação do produto químico, uma vez que a presença de matéria orgânica inibe ou minimiza a ação destes produtos sobre os agentes infecciosos, não permitindo uma completa desinfecção do ambiente. O quarto posterior das éguas também devem ser desinfetados com soluções antissépticas adequadas, como solução de iodo ou clorexidine. Após um caso de abortamento, a introdução de novos animais no grupo de éguas prenhes deve ser evitada até o completo esclarecimento do caso e tomada de medidas sanitárias que impeçam ou minimizem a possibilidade de novos casos.

Em relação ao manejo dos potros recém-nascidos, é fundamental que os cuidados na antisepsia do cordão umbilical sejam tomados imediatamente após o nascimento do animal, a fim de se evitar as onfaloflebites, cuja origem é a entrada de bactérias oportunistas (*Escherichia coli*, *Streptococcus zooepidemicus* e *Clostridium* sp.) por via ascendente através do coto umbilical, associadas à falhas na imunidade passiva, ou seja, na imunidade gerada pela ingestão do colostro (anticorpos maternos) (RADOSTITS et al., 2002; RIZZONI; MYIAUCHI, 2012).

No presente estudo, dentre as causas de abortamento/mortalidade perinatal de origem não infecciosa, foram registrados 0,95% (2/105) (Tabela 1) casos de óbito de neonatos por isoeritrólise neonatal, uma anemia hemolítica isoimune do recém-nascido, um quadro alérgico diretamente ligado à ingestão de leite materno (causa não infecciosa). A enfermidade ocorre quando os aloanticorpos maternos para os grupos sanguíneos do neonato são transferidos ao potro pelo colostro, causando lise de suas hemácias (RADOSTITS et al., 2002).

O exame histopatológico destes neonatos revelou intensa hemossiderose hepática e esplênica (eritrofagocitose), e nefrose tubular com urina castanho-escuro no lúmen. Estes achados microscópicos foram associados ao histórico clínico e epidemiológico do animal apresentado em suas fichas de encaminhamento de amostras, onde constava que os potros eram filhos de éguas múltíparas e que desenvolveram icterícia e hemoglobinúria aguda algumas horas após a ingestão do colostro, posteriormente vindo a óbito. Nestes dois casos demonstra-se a importância do correto e completo preenchimento das fichas clínico-epidemiológicas, para o fechamento do diagnóstico final de uma enfermidade, seja ela de origem infecciosa ou não. Alterações no manejo do recém-nascido, com histórico de consanguinidade, por meio da substituição do colostro da mãe pelo de outra égua sem vínculo familiar sanguíneo com este animal, podem evitar o óbito do mesmo (RADOSTITS et al., 2002).

Foi observado elevado número de amostras 49,52% (52/105) sem um diagnóstico bacteriológico conclusivo devido à falta de solicitação destas análises ao Laboratório por parte dos proprietários e profissionais interessados; a grande maioria destes solicita somente a análise para pesquisa de Herpesvírus equino tipo 1 e *Leptospira* spp., porém, através deste estudo e de diversos outros autores é possível concluir que a grande maioria dos casos de abortamento na espécie equina ocorrem devido à ação de bactérias e fungos oportunistas (GENOVEZ et al., 1995), bem como natimortalidade (DEL FAVA et al., 2007), frequentemente isolados do próprio trato gastrointestinal e genito-urinário das éguas. A análise destas amostras poderia diminuir o elevado número total de casos sem diagnóstico

estabelecido, 84/105 (80,0%), visto que os agentes bacterianos são os mais frequentemente encontrados em casos de abortamento e mortalidade perinatal em equinos.

Ações como o envio correto de material e a solicitação dos exames virológico, bacteriológico e parasitológico, e conseqüente estabelecimento do agente causal, ajudam a definir estratégias de manejo e direcionamento do tratamento dos animais, a fim de se evitar novas perdas reprodutivas e um processo crônico que pode culminar em um quadro de infertilidade da fêmea. O exame ginecológico deve ser realizado tomando-se os devidos cuidados quanto à esterilização do espécúlo vaginal e lavado do períneo antes introdução do espécúlo. A baía de égua gestante, próxima ao período de parição, deve ser isolada dos demais animais, adequadamente higienizada com produtos que não ofereçam toxicidade à fêmea gestante e em local sem interferências sonoras que possam provocar estresse na égua, sendo importante que o parto seja assistido por um veterinário a fim de se evitar possíveis intercorrências levem a perda do potro e até mesmo da égua (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

No presente estudo houve um elevado número de fichas preenchidas parcialmente, não sendo informada idade de abortamento dos animais em 41 (38,2%) das 105 amostras analisadas (Tabela 4) fato este que dificultou o estabelecimento de uma correlação entre as doenças identificadas e idade e local de abortamento. Recomendamos que seja utilizada como referência a literatura nacional que orienta o veterinário na correta forma de coleta e envio de amostras para o laboratório de análises de abortamento, visando melhorar a qualidade dos materiais biológicos enviados para análise e, conseqüentemente, contribuindo para a eficácia do diagnóstico diferencial (PITUCO et al., 2010).

6. CONCLUSÕES

- O protocolo de IHQ para HVE-1 foi validado utilizando o anticorpo primário VMRD[®], permitindo-se diagnosticar as estirpes virais experimentalmente inoculadas em hamsters: AR4 e A3/97 em células do bulbo olfatório de sistema nervoso central e epitélio bronquiolar pulmonar e ISO 72/10 em células da glia e neurônios em diferentes áreas do SNC. Porém, o mesmo não demonstrou sensibilidade frente aos isolados A9/92 e A4/72, sendo importante a realização de trabalhos que visem a produção de anticorpos primários capazes de reconhecer as cepas circulantes no país, a fim de se aumentar a sensibilidade da IHQ. Para estudos histopatológicos e de avaliação da etiopatogenia da doença a técnica se mostrou satisfatória permitindo-se verificar a migração do vírus em diferentes regiões do SNC.
- O protocolo de IHQ para *Leptospira* spp. foi validado utilizando anticorpo primário anti-leptospira LO4, o sistema secundário LSAB e cromógeno DAB, permitindo-se diagnosticar a *Leptospira* LO4 sorovar Canicola, inoculada experimentalmente em hamster, entretanto, outros estudos se fazem necessários a fim de se avaliar se o método é capaz de reconhecer outros sorovares (reação cruzada), aumentando as chances de acerto diagnóstico e possibilitando seu uso na rotina.
- A baixa ocorrência de HVE-1 e a frequência zero de *Leptospira* spp. nos fetos/natimortos/potros equinos analisados pelas técnicas utilizadas (isolamento, IHQ e PCR) indica que ambos os agentes encontram-se em situação endêmica nos plantéis equídeos das regiões estudadas.
- As lesões histopatológicas causadas pelo HVE-1 nos fetos abortados foram semelhantes às reportadas em literatura, a saber, infiltrado inflamatório mononuclear em todos os órgãos (cérebro, coração, pulmão, fígado, rins), bem como reação linfóide do timo, linfonodo e reação de polpa branca esplênica, sendo observados sincícios com inclusões intra-nucleares eosinofílicas nos pulmões de um dos fetos positivos.
- A utilização de hamsters sírios no estudo das lesões histopatológicas do HVE-1 e *Leptospira* spp. em diversos órgãos mostrou-se de grande valor, tendo em vista a alta susceptibilidade destes aos agentes estudados e o desenvolvimento de lesões características de infecção herpética e leptospirêmica frente ao desafio viral e

bacteriano, semelhantes às lesões encontradas no hospedeiro natural e reportadas na literatura especializada.

- O diagnóstico diferencial de causas não infecciosas revelou baixo índice – 0,95% (2/105) casos de isoeritrólise neonatal, entretanto, outras causas como torção de cordão umbilical não puderam ser analisadas devido à ausência do envio deste material na grande maioria dos casos.
- O diagnóstico diferencial de causas infecciosas em abortamento e natimortalidade equina revelou diversos agentes bacterianos em cultura pura ou preponderante, sendo os coliformes fecais os mais frequentes *Escherichia coli* (7,54%), *Enterobacter aerogenes* (5,66%), associação de *Escherichia coli* + *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. + *Bacillus* spp. (3,77%), seguidos por agentes não coliformes isolados de mucosas e pele dentre os quais *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinobacillus* spp., *Rhodococcus equi* e Fungo Leveduriforme (1,89%).
- Tendo em vista o significativo número de abortamentos onde foram isolados agentes coliformes fecais e cocobactérias contaminantes de mucosa e pele frequentemente associados a contaminação ascendente do trato genital, sugere-se que melhorias na implantação de medidas higiênico-sanitárias visando especificamente a saúde da fêmea em reprodução devem ser efetuadas.

7. BIBLIOGRAFIA BÁSICA

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Review: Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287–296, 2010.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; OKUDA, L. H.; STEFANO, E.; NASSAR, A. F. C.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.

AHEMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG’U, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 28, 2006.

ALLEN, G. P.; BRYANS, J. T. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infectious. In: PANDEY, R. **Progressive Veterinary Microbiology and Immunology**: Veterinary Microbiology Basel: D. Karger, 1986. p. 78-144.

ALLEN, G. P. Epidemic disease caused by equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. **Equine Veterinary Education**, v. 14, n. 3, p.136-142, 2002.

ALLEN, T. C. Hematoxilina y eosina. In: PROPHET, E.B. et al. (Eds.). **Métodos histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995. cap. 9, p. 55-60.

ALVES, C. J., VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A. , MORAIS, Z. M. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1996.

ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 155-160, 2013.

BALLAGI-PORDÁNY, A.; KLINGEBORN, B.; FLENSBURG, J.; BELÁK, S. Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 373-381, 1990.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARD, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E. VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent Leptospira interrogans serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type

Hardjo-bovis infection on cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 10, p. 1639-1643, 1991.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Equinocultura**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) - Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. Caderno 8. 7a ed. Brasília, p. 494 – 511, 2010. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leptospira_pdf.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2013.

BRYANS, J. T.; ALLEN, G. P. Herpesviral diseases of the horse. In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 176-229.

CARVALHO, R. F. **Caracterização genômica de isolados brasileiros do herpesvírus equino do tipo 1**. 2005. 62f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular na Área de Microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CARVALHO, R.; OLIVEIRA, A. M.; SOUZA, A. M.; PASSOS, L. M.; MARTINS, A. S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1773-1787, 2000.

CARVALHO, R. F.; PASSOS, L. M. F.; GOUVEA, A. M. G.; RESENDE, M.; MARTINS, A. S. FRANCO, G. C. Use of an ELISA system for detection of equine herpesvirus 1 (EHV-1) antibodies in non-symptomatic pregnant mares and neonatal foals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, 2000a.

CARVALHO, R. F.; PASSOS, L. M. F.; OLIVEIRA, A. M.; HENRY, M.; MARTINS, A. S. Detection of equine herpesvirus 1 DNA in a single embryo and in horse semen by polymerase chain reaction. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 302-306, 2000b.

CASELANI, K.; OLIVEIRA, P. R.; FERRAUDO, A. S.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C.; GÍRIO, R. J. S. Estudo soropidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 582-587, 2012.

CASTANHO, J. S. G.; CARRETERO, M. E.; PIATTI, R. M.; SCARCELLI, E.; CASTRO, V.; FERREIRA, M. A. S.; GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 15., Goiânia, 2011; CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1, Goiânia, 2011. **Anais...** Goiânia: Patologia Veterinária/EVZ/UFG, 2011.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A. A century of Leptospira strain typing. **Infection Genetics and Evolution**, v. 9, p. 760-768, 2009.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, p. 532-537, 1993.

COEN, D. M.; SCHAFFER, P. A. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 278-288, 2003. Disponível em: <http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n4/fig_tab/nrd1065_F1.html#figure-title>. Acesso em: ago. 2013.

CORRÊA, W. M.; NILSSON, M. R. Observações preliminares sobre o aborto equino a vírus no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 31, n. 3, p. 13-15, 1964.

CÔRTEZ, J. A. Indicadores da Ocorrência de Doenças em Populações. In: CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia, Conceitos e Princípios Fundamentais**. São Paulo: Livraria Varela, 1993. p. 155.

COSTA, E. A.; LIMA, G. B. L.; CASTRO, R. T.; FURTINI, R.; PORTILHO, R. V.; RESENDE, M. Meningoencephalitis in a horse associated with equine herpesvirus 1 **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1580-1583, 2008.

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira* Hardjo e *L. Wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998.

CRABB, B. S.; STUDDERT, M. J. Equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 135-190, 1995.

CRANDELL, R. A.; DRYSDALE, S.; STEIN, T. L. A. A comparative study of bovine herpesvirus 1247 and equine herpesvirus 1 in ponies. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 43, n. 1, p. 94-97, 1979.

CUNHA, E. M. S.; PEIXOTO, Z. M. P.; KROEFF, S. S.; QUEIROZ, L. H.; KOTAIT, I. Isolamento e identificação do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): confirmação do diagnóstico clínico. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., São Paulo, 1993. **Resumos...** São Paulo: Instituto Biológico, p. 15, 1993.

CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; LARA, M. C. C. S. H.; PERES, N. F.; PALAZZO, J. P. C.; SILVA, A.; DE STEFANO, E.; PINO, F. A. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 2, p. 165-171, 2009.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; OLIVEIRA, J. V.; REICHERT, R. H.; D'ANGELINO, J. L. D. Reproductive Rates and performance traits in beef cattle infected by Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 739-746, 2006.

DEL FAVA, C.; CABRAL, A. D.; DE DONATO, T.; DAVID, M. R.; LARA, M.C.C.S.H.; CUNHA, E. B. S; VILLALOBOS, E.M.C.; CARVALHO, A. F.; SCARCELLI, E. Diagnóstico diferencial de causas infecciosas de natimortalidade em potro In: RAIB, 20., São Paulo, 2007. **O Biológico**, v. 69, n. 2, p. 113-198, 2007.

DEL PIERO, F., Comparison of equine arteritis virus and equine herpesvirus 1 findings in aborted fetuses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, p. 562, 1999.

DINIZ, J. A.; COUTINHO, M. L.; KÜNDEL, J. P.; MONTE, L.G.; VASCONCELLOS, F. A.; AMARAL, M. G.; RAPOSO, J. B.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A. G. Detecção da expressão de proteínas de membrana externa de leptospira em tecidos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., Pelotas, 2008. **Resumos...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2008. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB_01818.pdf>. Acesso em: set. 2013.

DONAHUE J. M.; SMITH, B. J.; REDMON, K. J.; DONAHUE, J. K. Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 3, p. 148-151, 1991.

DUTTA, S. K.; TALBOT, N. C.; MYRUP, A. C. Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 1930-1934, 1983.

EASTON, F. N. A.; PAULIER, C.; ALONZO, P.; CARLUCCIO, J.; GALOSI, C.M. Immunohistochemical and molecular detection of equine herpesvirus 1 in Uruguay. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 28, n. 3, p. 1085-1090, 2009.

EDINGTON, N.; WELCH, H. M.; GRIFFITHS, L. The prevalence of latent of equid herpesvirus 1 in the tissues of 40 abattoir horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 2, p. 140-142, 1994.

EL-HABASHI, N.; MURAKAMI, M.; EL-NAHASS, E.; HIBI, D.; SAKAI, H. FUKUSHI, H.; SASSEVILLE, V.; YANAI, T. Study on the Infectivity of Equine Herpesvirus 9 (EHV-9) by Different Routes of Inoculation in Hamsters. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 5, p. 1-7, 2011.

ELLIS, W. A.; BRYSON, D. G.; O'BRIEN, J. J.; NEILL, S. D. Leptospiral infection in aborted equine fetuses. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 321-324, 1983.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 353.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. T. **Leptospira and Leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999. p. 296.

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAES, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Sorovares de leptospirosas predominantes em

exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos Estados Brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FERNANDES, W. R. Mieloencefalopatia protozoótica dos equinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 61, p. 7-10, 1999.

FLEISS, J.L.; LEVIN, B.; PAIK, MYUNGHEE, M. C. **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003. 760 p.

FREITAS, D. C.; GOMES, C. E. S.; LACERDA, J. P. G. **Leptospirose equina**. Comunicação à Sociedade Paulista de Medicina Veterinária - Reunião de 30/05/58. 1958.

FUKUSHI, H.; TOMITA, T.; TANIGUCHI, A.; OCHIAI, Y; KIRISAWA, R.; MATSUMURA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K.; Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. **Virology**, v. 227, n. 1, p. 34-44, 1997.

GALOSI, C. M., ECHEVERRIA, M.G.; VILA ROZA, M.V.; CID DE LA PAZ, V.; OLIVA, G.A.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Virus herpes equino tipo 1 (EHV-1): patrones de restricción de ADN, perfiles proteicos y estudios de patogenicidad en ratones. **Analecta Veterinaria**, v. 18, p. 35-40, 1998.

GALOSI, C. M.; BARBEITO, C. G.; VILA ROZA, M. V.; CID DE LA PAZ, V.; AYALA, M. A.; CORVA, S. G.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; GIMENO, E. J. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. **Veterinary Microbiology**, v.103, p. 1-12, 2004.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biologico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-12, 1993.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P.; CARRASCO, S.; CARDOSO, M. V.; SOUZA, C. A. I.; MACRUZ, R. Isolamentos bacterianos de fetos equinos abortados examinados no Instituto Biológico, no período de 1985 a 1995. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 62,n. 1/2, p. 21-24, 1995.

GENOVEZ, M. E. ; SCARCELLI, E. ; PIATTI, R. M.; CASTRO, V. ; FERRARI, C. I. L.; GRASSO, L. M. P. S.; CARDOSO, M. V. Polymerase Chain Reaction (PCR) as a fundamental tool in the diagnosis of endemic leptospirosis in a cattle herd. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 21, 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Microbiologia, 2001. p. 190.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M. V.; PIATTI, R. M.;CAMPOS, F. R.;TEIXEIRA, S. R.; CASTRO, V.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. A. Main bacterial agents as cause of abortion in bovines in Brazil. In: WORLD BUIATRICAL CONGRESS, 24., 2006, Nice. **Summary...** Nice: World Buiatrics Association, 2006a. CDROM.

GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C.; CASTRO, V.; GOTTI, T. B.; DIB, C. C.; POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C.; CIRILLO, S. L. Leptospirosis outbreak in dairy cattle due to *Leptospira* spp. Serovar Canicola: reproductive rates and serological profile after treatment with streptomycin sulfate. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 389-393, 2006b.

GILGER, B. C. Equine recurrent uveitis. In: ROBINSON, N. E. **Current therapy in equine medicine**. Saunders, 2003. p. 468-72.

GIORGI, W.; TERUYA, J. M.; MACRUZ, R.; GENOVEZ, M. E.; SILVA, A. S. Leptospirose em equinos: inquérito sorológico e isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de feto equino abortado. **O Biológico**, v. 47, n. 2, p. 47-53, 1981.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, 2003.

GOSZTONYI, G.; BORCHERS, K.; LUDWIG, H. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection in the mouse model. **APMIS Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 1, p. 10-21, 2009.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos – ginecologia**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. p. 551.

GUIMARÃES, M. A.; CÔRTEZ, J. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 6/7, n. 1/4, p. 21-34, 1982/83.

HAANWINCKEL, M. C. S.; MEGID, J. ; SOUZA, L. C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 293-301, 2004.

HAANWINCKEL, M. C. S.; CAVALHEIRO, J. S.; OLIVEIRA, S. L. Identificação da *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em camundongos geneticamente selecionados, para a alta e baixa produção de anticorpos, através da técnica de imunoperoxidase em tecido renal e isolamento bacteriano em meio de Fletcher. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 648-652, 2007.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 494-501, 2011.

HASEBE, R.; KIMURA, T.; SATO, E.; OKAZAKI, K.; OCHIAI, K.; WADA, R.; EMEMURA, T. Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of

neroadapted virus and its parental strain. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, n. 2-3, p. 118-125, 2002.

HASHIMOTO, V. Y.; GARCIA, J. L.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, F. G.; ALVES, L. A.; FREITAS J. C. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 521-524, 2010.

HODGIN, E. C.; MILLER, D. A.; LOZANO, F. *Leptospira* abortion in horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 283- 287, 1989.

HONG, C. B; DONAHUE, J. M.; GILES, R. C.; PETRITES-MURPHY, M. B.; POONACHA, K. B.; ROBERTS, A. W.; SMITH, B. J.; TRAMONTIN, R. R.; TUTTLE, P. A.; SWERCZEK, T. W. Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 560-566, 1993.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. **Economia**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default_pdf.shtm>. Acesso em: nov. 2013.

ICTV – **INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES**. 2014. Disponível em:< http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4825.aspx>. Acesso em mar. de 2014.

KING et al. (2011) *apud* MORI, C. M. C. **Avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012a.

KIRISAWA, R.; ENDO, A; IWAI, H.; KAWAKAMI, Y. Detection and identification of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 36, n. 1-2, p. 57-67, 1993.

KIRKBRIDE, C. A. **Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion**. Ames: Iowa State University Press, 1990. 260 p.

KOTAIT, I. Herpesvírus equino tipo 1: incidência e diagnóstico laboratorial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, p. 164-171, 1991.

LAUGIER, C.; FOUCHER, N.; SEVIN, C.; LEON, A.; TAPPREST, J. A 24-Year Retrospective Study of Equine Abortion in Normandy (France). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 116-123, 2011.

LARA, M. C. C. S. H.; BARROS FILHO, I.; VIANA, F.; GREGORY, L.; CUNHA, E. M. S.; CASTRO, A. F.; BIRGEL, E. H.; FERNANDES, W. R. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da arterite dos equinos (VAE) e herpes equino tipo 1 (HVE-1) em cavalos criados em Curitiba, PR. **Hora Veterinária**, v. 23, n. 135, p. 26-28, 2003.

LARA, M. C. C. S. H.; FURMAN, K. E.; BARROS FILHO, I. R.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; DECONTO, I.; BONACIM, J.; UTIME, R. A.; BIONDO, A. W. Detection of antibodies against equine viral arteritis virus (EVAV) and equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in cart horses from Curitiba and surroundings, southern. **Brazilian Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 11-14, 2006.

LARA, M.C.C.S.H.; TORELLI, C. S.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, M. S.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; REIS, J.K.P.; LEITE, R. C.; MORI, E. Inquérito sorológico da infecção por herpesvírus equino no Estado de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 352-356, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 435-448, 2004.

LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 61-63, 1998.

LIMA, M. S.; ALMEIDA, M. J. F.; SEINO, C. H.; CASTRO, V.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C. Emprego de histotécnica warthin-starry e hematoxilina-eosina associadas ao isolamento bacteriano como recurso diagnóstico da leptospirose em fetos equinos abortados. **O Biológico**, v. 71, n. 2, p. 97, 2009.

LINHARES, G. F. C.; GIRIO, R. J. S.; LINHARES, D. C. L.; MONDEIRO, L. C.; OLIVEIRA, A. P. A. Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas prevalências em cavalos da microrregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 255-259, 2005.

LOUREIRO, A. P. P. **Leptospirose e seu impacto na fase inicial da gestação de éguas receptoras de embriões**. 2013. 83 f. Dissertação de Mestrado em Clínica e Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói – Rio de Janeiro, 2013.

MACKIE, J. T.; MACLEOD, G. A.; REUBEL, G. H.; STUDDERT, M. J. Diagnosis of equine herpesvirus 1 abortion using polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 74, n. 5, p. 390-391, 1996.

MACRUZ, R. Incidência de abortos equinos e diagnóstico anátomo-histológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 91-99.

MARCHIORI FILHO, M. **Indução do estado de portador renal e genital pela *Leptospira Interrogans*, sorovar Canicola, estirpe LO4, em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência da concentração, da virulência da estirpe, da via de inoculação e da vacinação**. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M. L.; LADEIRA, S. R. L.; SOARES, M. P.; ASSIS-BRASIL, N. D.; SCHILD, A. L. Abortos em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul: estudo de 72 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 22-26, 2012.

MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. **Veterinary Record**, v. 167, p. 629-630, 2010.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 1137 p.

MÉRIEN, F., AMOURIAUX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G., SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinic and Microbiology**, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

MILLER, M. A.; TURK, J. R. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais**: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos. In: SMITH, B. P. 1. ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 1386-1388.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 792-799, 2009.

MOREIRA, N. **Investigação das causas de aborto equino**. 70 f. 1992. Tese apresentada à Universidade Federal do Paraná, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Curitiba, 1992.

MOREIRA, N.; KRÜGER, E. R.; WARTH, J. F. G.; BIESDORF, S. M.; GOULARTE, M. M. M.; WEISS, R. R. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto equino. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1998.

MORI, C. M. C.; MORI, E.; FAVARO, L. L.; SANTOS, C. R.; LARA, A. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; MAIORKA, P. C. Equid Herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p. 202-210, 2012a.

MORI, C. M. C. **Avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012b.

MORI, E. **Infecção experimental em cavalos pelo herpesvírus equino tipo 1**: aspectos clínicos e detecção do agente pela reação em cadeia de polimerase. 2005 157f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; MASSIRONI, S. M. G.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H.; FERNANDES, W. R. Detection of equid herpesvirus 1 DNA by Polymerase Chain Reaction after experimental inoculation of horses with a Brazilian A4/72

strain. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 253-261, 2009.

MORIKAWA, V. M. Programa de Zoonoses da Região Sul. **Manual de Zoonoses**. 2ª ed., v. 2, p. 91-99, 2010.

NILSSON, M. R.; CORRÊA W. M. Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 33, n. 2, p. 23-25, 1966.

NORDENGRABH, A. **Differential Diagnosis and Aspects on Epidemiology and Pathogenesis of Equine Herpesviruses**, 2000. p. 9-20.

OAKS, L. J.; Laboratory diagnosis of viral infection. In: SELTON, D. C.; LONG, M. T. **Equine infectious diseases**. St. Louis: Saunders, 2007. 664 p.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Chapter 2.5.9. - Equine rhinopneumonitis. **OIE Terrestrial Manual 2008**. p. 897. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf>. Acesso em: nov. 2010.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: OIE, 2012. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>> Acesso em: mai. 2012.

OKUDA, L. H.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; STEFANO, E.; PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Inquérito soropidemiológico do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, estado de Rondônia, Brasil. **O Biológico**, v. 68, Supl., p. 157-159, 2006.

OLIVA, R.; INFANTE, J. F.; GONZÁLEZ, M.; PEREZ, P. FARIÑAS, M.; ESTÉVEZ, L.; PÉREZ, V.; SIERRA, G. Comparación clínico-patológica de la leptospirosis em hámsters sírio dorado y el curiel ducan hartley mediante La infección experimental con tres serovares de *L. interrogans*. **Vaccil Monitor**, v. 7, n. 5, p. 8 -14, 1998.

OSTLUND, E. N. The equine herpesviruses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 9, p. 283-294, 1994.

PAILLOT, R.; CASE, R.; ROSS, J.; NEWTON, R.; NUGENT, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 2, p. 68-91, 2008.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; JÚNIOR, E. W.; FRANTZ, F. J.; DRIEMEIER, D. Aborto equino por *Leptospira* sp. – Relato de caso. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, 2004.

PIRES NETO, J. A. S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M. A. M. Leptospirose equina: aspecto clínico, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**, v. 2, n. 2, p. 165-176, 2005.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Causas Infecciosas de mortalidade embrionária e fetal em bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15., 2003, Porto Seguro. Resumos... Porto Seguro, 2003. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 68-75, 2003.

PITUCO, E. M.; OKUDA, L. H.; DEL FAVA, C.; DE STEFANO, E.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, N. T. C.; OLIVEIRA, M. C. T. Occurrence of BoHV-1 and BVDV-1 in aborted bovine fetuses from 1999 to 2005 in Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice. **Proceedings...** Nice: World Buiatrics Association, 2006. 1-CDROM.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, RIBEIRO, C. P.; C. BERSANO, J. G. MIYASHIRO, S. Ruminantes, equídeos, suídeos. In: PANAFTOSA/OPAS/OMS (Orgs.). **Manual veterinário de colheita e envio de amostras**. Cooperação técnica MAPA/OPAS/PANAFTOSA para o fortalecimento de programas de saúde animal do Brasil. 1ª ed. Rio de Janeiro: PANAFTOSA/OPAS/OMS, 2010. v. 13, p. 35-143.

POONACHA, K. B.; DONAHUE, J. M.; GILES, R. C.; HONG, C. B.; PETRITES-MURPHY, M. B.; SMITH, B. J.; SWERCKZEK, T. W.; TRAMONTIN, R. P.; TUTTLE, P. A. Leptospirosis in Equine Fetuses, Stillborn Foals, and Placentas. **Veterinary Pathology**, v. 30, p. 362,-369, 1993.

PROPHET, E. B. Procesamiento de Tejidos: Deshidratación, aclaramiento y Infiltración. In: PROPHET, E. B. et al. (Eds.). **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, cap. 5, p. 31-34, 1995.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. (Eds.). **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

REINER, U. R.; LUCCA NETO, D.; NILSSON, M. R.; NILSSON, T. T.; KOTAIT, I. Isolamento do vírus do aborto equino em Campinas, Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 13, 1972, Brasília. **Anais...** Brasília: Associação Brasileira de Medicina Veterinária, 1972.

REZENDE, M. B.; LINS-LAINSON, Z. C.; BICHARA, C. N. C.; LEÃO, R. N. Q.; COSTA, A. M.; JUNIOR, A. B. R. Leptospirose. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque Amazônico**. Pará: Cejup, 1997. p. 507-524.

RIMSTAD, E.; EVENSEN, O. The identification of equid herpesvirus 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction. **Research Veterinary Science**, v. 50, p. 349-351, 1993.

RIZZONI, L. B.; MIYAUCHI, T. A. Principais doenças dos neonatos equinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p.9-16, 2012.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3rd. ed. Ann Arbor: David & Charles, 1986. 981 p.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, p. 425-449, 1992.

ROMERO, E. C. Search for agglutinating antibody to Leptospira and Letonema in horses, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, n. 3, p. 210- 15, 1994.

SÁENZ, J. R.; GÓEZ, Y.; HERRERA, A. L. Detección de DNA de herpesvirus equino tipos 1 y 4 en mononucleares de sangre periférica y ganglio trigémino de equinos. Infección, latencia y una aproximación a la neuropatogénesis de la cepa circulante. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 21, p. 372-386, 2008.

SANTOS, L. A. **Herpesvírus equino: revisão de literatura**. 2007, 45f. Monografia (Especialização) – Faculdade de Jaguariúna, Instituto Brasileiro de Pós – Graduação e Educação Continuada. Recife, 2007.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MYIASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção dos principais agentes bacterianos causadores de abortamento em bovinos, período 2000-2002. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 23-27, 2004.

SCHULTHEISS, P. C.; COLLINS, J. K.; CARMAN, J. Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine foetal tissues. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 5, n. 1, p. 12-15, 1993.

SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 541-548, 2011.

SELLNOW, L. Leptospirose: mal de muitas faces. **Revista Horse Business**, ed. 56. São Paulo, dez/1999.

SILVEIRA, M. G. **Aborto equino por herpesvírus tipo 1**. 2005, 70 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, 2005.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de equinos, bovinos, ovinos e caprinos**, v. 1. 1 ed., São Paulo: Manole,1993. p. 538-539.

SMYTHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, R. A.; GALLOWAY, R. L.; TURENNE, C. Y.; LEVETT, P. N. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, genomospecies 3, genomospecies 4 and genomospecies 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira Vanthielii* sp. nov., *Leptospira Terpstrae* sp. nov., *Leptospira Yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v. 63, n. 5, 1859-62.2012.

STUDDERT, M. J.; HARTLEY, C. A.; DYNON, K.; SANDY, J. R.; SLOCOMBRE, R. F.; CHARLES, J. A.; MILNE, M. E.; CLARKE, A. F.; EL-HAGE, C. Outbreak of equine herpesvirus type 1 myeloencephalitis: new insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1-specific antibody detection ELISA. **Veterinary Record**, v. 153, n. 14, p. 417-423, 2003.

SZEREDI, L.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K. Detection of equine Herpesvirus-1 in the fetal membranes of aborted equine fetuses by immunohistochemical and in-situ hybridization techniques. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 147-153, 2003.

SWERCZEK, T. W. The most common viral causes of equine abortion. **Veterinary Medicine**, 1991. p. 1205-1208.

SWERCZEK, T. W.; ROBERTS, A. W. Equine viral arteritis abortion. **Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion**. 3rd ed. Ames: Iowa State University Press, 1990. p. 221-223.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, R. A.; MORAIS, Z. M.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovares of Serogroup Sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 265-268, 2002.

TERCILLA, D.F.; CUETO, J.; CHAMIZO, E. Aislamento de *Leptospira Canicola* en hemocultivo: análisis epidemiológico. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v. 2, n. 6, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606.html>>. Acesso em: fev 2014.

THOMSON, G. R., MUMFORD, J. A., CAMPBELL, J. GRIFFITHS, L.; CLAPHAM, P. Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, p. 58-65, 1976.

TIMONEY, P. I. Rhinopneumonitis and viral abortion. In: CASTRO, A. F.; HEUSCHELE, W. P. **Diagnostic Veterinary Virology**. Mosby: St. Louis, 1992.

TOMICH, R. G. P.; PELLEGRIN, A. O.; SERRA, C. V.; RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Estudo de doenças bovinas em assentamentos rurais do município de Corumbá, MS – resultados iniciais. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 4., 2004. Corumbá. **Anais...** 2004. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos>>. Acesso em: 10 set. 20013.

VANASCO, N. B.; SEQUEIRA, M. D.; SEQUEIRA, G.; TANASBLA, H. D. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 60, p. 227-235, 2003.

VANDEKERCKHOVE, A. P.; GLORIEUX, S.; GRYSPEERDT, A. C.; STEUKERS, L.; DUCHATEAU, L.; OSTERRIEDER, N.; VAN DE WALLE, G. R.; NAUWYNCK, H. J. Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 8, p. 2019-2028, 2010.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O.; ORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.

VILLALOBOS, E. M. C. **Identificação de infecção por protozoários da família Sarcocystidae em Sistema Nervoso Central de equinos com sinais clínicos neurológicos e reprodutivos**. 2012. 76 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WALKER, C.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 68, n. 1-2, p. 3-13, 1999.

WEIBLEN, R. Infecções por herpesvírus equinos. In: CORREA, F. R., SCHILD, A. L., MÉNDEZ, M. C. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Editora Universitária/UFPel, 1998.

WEIBLEN, R.; RABUSKE, M.; REBELATTO, M. C.; NOBRE, V. M. T. Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1317-1320, 1994.

WELCH, H. M.; BRIDGES, C. G.; LYON, A. M.; GRIFFITHS, L.; EDINGTON, N. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 2, p. 261-268, 1992.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 407-415, 1987.

ZANUZZI, C.; SCROCHI, M.; FUENTEALBA, N.; NISHIDA, F.; PORTIANSKY, E.; MUGLIA, C.; GIMENO, E.; BARBEITO, C.; GALOSI, C. Effects of equid herpesvirus 1 (EHV-1) AR8 and HH1 strains on BALB-c mice. **Archives of Virology**, v. 159, p. 141-145, 2014.

ANEXOS

Anexo1- Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CETEA) número, aprovado em 26 /outubro/ 2010.



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 106/10** sobre o Projeto: "**Diagnóstico histopatológico e virológico do Herpesvirus equino em fetos abortados**", sob a responsabilidade de **Cláudia Del Fava**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo aprovado pela **CETEA-IB** em 26 de outubro de 2010.

São Paulo, 26 de outubro de 2010.


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB

CETEA - IB**Registro**

Número : 106/10

Livro : 02

Folha : 06

Data: 26/10/10

ANEXO 2 - Preparo do corante Hematoxilina para a técnica de coloração Hematoxilina/Eosina

Hematoxilina de Harrys

Reagentes

Hematoxilina.....	0,5 g
Alúmen de potássio	10,0 g
Óxido de mercúrio.....	0,25 g
Ácido acético glacial	2 mL
Álcool etílico absoluto.....	5 mL
Água destilada	100 mL

Modo de Preparo: Dissolver a hematoxilina no álcool absoluto sem aquecimento. Dissolver o alúmen de potássio na água destilada à quente até a dissolução completa do sal. Misturar as duas soluções e levar à ebulição o mais rápido possível. Remover do fogo e acrescentar o óxido de mercúrio. Se necessário reaquecer a solução até completa diluição. Retirar do fogo e resfriar rapidamente em recipiente com água fria e gelo. Descansar 24 horas a temperatura ambiente e acrescentar o ácido acético glacial filtrar e armazenar em frasco âmbar. Filtrar antes de cada uso.

ANEXO 3 – Preparo do corante Eosina para a técnica de coloração Hematoxilina/Eosina**Preparo da Eosina****Reagentes****Solução de Ácido pícrico**

Água destilada	100 mL
Ácido pícrico.....	2 g

Solução de Bicromato de Potássio

Bicromato de potássio	2 g
Água destilada	320 mL

Solução de Eosina

Eosina	4 g
Álcool etílico absoluto	40 mL

Modo de Preparo: Solução Saturada de Ácido Pícrico: dissolver 2 g de ácido pícrico em 100 mL de água destilada, aquecendo levemente até dissolução do ácido, aguardar esfriar e filtrar para retirar o precipitado. Dissolver 4 gramas de eosina em 40 mL de álcool etílico absoluto. Dissolver 2 gramas de bicromato de potássio em 320 mL de água destilada. Misturar a solução de bicromato de potássio com a solução de ácido pícrico e por último acrescentar a solução de eosina. Armazenar em frasco âmbar. Homogeneizar antes de cada uso.

ANEXO 4 – Preparo da Solução Tampão PBS

Solução PBS de Estoque:

Fosfato de Sódio monobásico.....	3,89 g
Fosfato de Sódio bibásico.....	10,61 g
Cloreto de Sódio.....	8,50 g
Água destilada.....	1000 mL

Preparo da Solução PBS de Estoque: acrescentar os solutos (Fosfato de Sódio monobásico, Fosfato de Sódio bibásico e Cloreto de Sódio) nas quantidades indicadas acima em 1000 mL de água destilada e homogeneizar bem em agitador com barra magnética (velocidade alta) por cinco minutos ou mais (até observar completa dissolução dos solutos). Esta solução de estoque deverá ser armazenada em frasco de vidro em refrigerador (4 – 8°C) com validade de seis meses.

Solução PBS para uso:

Solução PBS de Estoque.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL

Preparo da Solução Tampão PBS para uso: acrescentar 100 mL da Solução PBS de estoque a 900 mL de água destilada e homogeneizar bem em agitador com barra magnética (velocidade média) por três minutos. Em seguida esta solução estará pronta para utilização para as etapas de lavagem com Tampão PBS da reação de IHQ.

ANEXO 5 – Preparo da Solução Tampão Citrato

Solução de Estoque A:

Citrato de Sódio (PM 294,10).....	24,9 g
Tampão PBS (pH 7,0).....	1000 mL

Modo de Preparo: acrescentar 24,9 gramas de Citrato de Sódio em 1000 mL de Solução Tampão PBS de uso destilada e homogeneizar bem em agitador com barra magnética (velocidade alta) por cinco minutos. Esta solução de estoque deverá ser armazenada em frasco de vidro em refrigerador (4 – 8°C) com validade de seis meses.

Solução de Estoque B:

Ácido Cítrico (Pm 210,14).....	21,0 g
Tampão PBS (pH 7,0).....	1000 mL

Modo de Preparo: acrescentar 21,0 gramas de Ácido Cítrico em 1000 mL de Solução Tampão PBS de uso destilada e homogeneizar bem em agitador com barra magnética (velocidade alta) por cinco minutos. Esta solução de estoque deverá ser armazenada em frasco de vidro em refrigerador (4 – 8°C) com validade de seis meses.

Solução Tampão Citrato para uso:

Solução A.....	80 mL
Solução B.....	20 mL
Água destilada.....	900 mL

Modo de Preparo: acrescentar 80 mL da Solução de Estoque A e 20 mL da Solução de Estoque B em 900 mL de água destilada e homogeneizar bem em agitador com barra magnética (velocidade média) por três minutos. Em seguida esta solução estará pronta para utilização para a etapa de Desmascaramento em Tampão Citrato da reação de IHQ.

ANEXO 6 – Preparo da Solução de Peróxido de Hidrogênio**Reagentes:**

Peróxido de hidrogênio 30% (H ₂ O ₂)	20 mL
Metanol (álcool metílico).....	80 mL

Modo de Preparo: Acrescentar 20 mL de Peróxido de hidrogênio 30% a 80 mL de Metanol. Não é necessário agitar. Nesta etapa é importante tomar cuidado para que os reagentes não entrem em contato com as mucosas ocular, nasal ou bucal e com a pele (risco de acidente).

ANEXO 7 – Preparo da Solução de Leite Desnatado 5%**Solutos:**

Leite em pó desnatado..... 10 g
Solução PBS de uso..... 200 mL

Modo de Preparo: em um Becker, acrescentar 10 gramas de Leite em pó desnatado a 200 mL de Solução PBS de uso e homogeneizar bem em agitador com barra magnética (velocidade alta) por cinco minutos ou mais (até a completa dissolução do soluto). Em seguida esta solução estará pronta para utilização para a etapa de bloqueio de reações inespecíficas da reação de IHQ.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ