JULIETA CANJIMBA PORTO LUCAS ALEXANDRE

**Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da
Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em
matadouros no Huambo/Angola**

São Paulo

2018

JULIETA CANJIMBA PORTO LUCAS ALEXANDRE

**Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da
Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em
matadouros no Huambo/Angola**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Cogliati

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3615
FMVZ

Alexandre, Julieta Canjimba Porto Lucas
Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em matadouros no Huambo/Angola / Julieta Canjimba Porto Lucas Alexandre. – 2018.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Pleuropneumonia Contagiosa Bovina. 2. Lesões. 3. Anatomopatológico. 4. Bovino. I. Título.

São Paulo, 06 de dezembro de 2017
CEUA N 4359040216

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Bruno Cogliati

Área: Patologia Experimental E Comparada

Bruno Cogliati (orientador)

Título da proposta: "Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em matadouros no Huambo/Angola".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 16/julho/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Devido ao não registro de lesões compatíveis com a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina nos matadouros de São Paulo/ Brasil, decidimos alterar o título, retirando deste o estudo no Brasil antes proposto, ficando a penas com o estudo no Huambo/ Angola.".

Comentário da CEUA: "Material de matadouro de origem definida, sem óbice no âmbito desta comissão. ".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALEXANDRE, Julieta Canjimba Porto Lucas

Título: Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em matadouros no Huambo/Angola.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, meu alicerce.

Aos meus pais, Bernardo Lucas e Adelina Porto Lucas, que sempre me apoiaram, sempre batalharam muito para me ajudar a conquistar meus sonhos.

Ao meu esposo António da Silva Alexandre pela confiança, incentivo, apoio incondicional, e por ter assumido ao mesmo tempo papel de pai e mãe para a nossa filha, durante a minha ausência.

À minha filha, Engrácia Gracilina Lucas Alexandre, pessoa que eu amo muito.

Aos meus irmãos e primos, João Lucas, Felícia Wessi Porto, Albertina Porto Cambambi, Benedito Cambambi, Enoque Lucas, Cídne Porto, Anatória Porto, Adelina Porto, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, fazendo a minha vida muito especial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde, força, proteção e capacidade para elaborar este trabalho.

Ao meu orientador Dr. Bruno Cogliati por me ter acolhido, me auxiliando no meu crescimento científico e acreditando em mim me ajudando a conquistar este título de mestre e não só...

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro para a minha sobrevivência aqui no Brasil.

Ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, por todo apoio.

Ao Departamento de Patologia da FMVZ/ USP, por todo apoio e por me acolherem tão carinhosamente.

Aos responsáveis dos serviços de veterinária do Huambo-Angola, por autorizar a realização deste trabalho nos matadouros, pois sem eles não teria conseguido coletar as amostras para dar seguimento ao projeto.

Aos responsáveis dos matadouros Vanda & Mateus e Ombelela do Huambo-Angola, por permitir realizar a coleta de amostras nestes lugares.

À Direção do Hospital Central do Huambo-Angola, por permitir realizar o processamento das amostras no Departamento de Patologia, pois, sem ela não teria realizado as outras técnicas.

À Dra. Faviola, do Hospital Central do Huambo-Angola, pela imensa ajuda no processamento das amostras.

À Faculdade de Medicina Veterinária do Huambo- Angola, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Jorge Timenetsky, responsável do laboratório de Mycoplasma, por me receber em seu laboratório e pelo aprendizado.

À Professora Lilian Gregory, do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, pelo apoio.

À Doutoranda Juliana Guerra, por toda a ajuda, apoio, incentivo e por ser uma incrível mentora o tempo que estive no laboratório de Patologia Quantitativa do IAL. Uma pessoa com a qual pude contar em todos os momentos, não só como mentora mas também, me aconselhando e direcionando nas ocasiões em que tive dificuldades.

Ao grupo do laboratório de Patologia Molecular (LAPMOL): Isis, Teresa, Verônica, Davi, Verônica Mollica, Danilo, Jennifer, Bel, por todo apoio, ensinamentos e por fazerem sentir-me em casa, pelas risadas, desesperos que passamos juntos e por ser um grupo inesquecível e muito unido.

Ao grupo de pesquisadores do laboratório de Patologia quantitativa do Instituto Adolfo Lutz, Juliana Guerra, Leonardo, Juliana Tacarrachi, Lídia, Raquel, Dani, Vitalina, por todo apoio, por me acolherem em seu laboratório e pelos ensinamentos.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Mycoplasma do ICB/USP, Maysa, Camila, Aline Natália, Lucas, Guilherme, Isadora, por me acolherem em seu laboratório, por todo apoio e me ajudarem no estudo molecular do meu projeto.

À Milena Oliveira, secretaria da Pós-graduação do Departamento de Patologia da FMVZ, por todo apoio.

À Sônia de Oliveira, diretora do centro de patologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio.

À Doutoranda Paula, que me acolheu no primeiro dia em que cheguei em São Paulo.

À Celminha, agora aposentada do Laboratório de Mycoplasma do ICB, que muitas vezes fez papel de mãe, me dando forças, e com aquele olhar clínico de acertar quando estava bem ou preocupada com a minha família, mesmo eu disfarçando!

A todos os professores, trabalhadores do Departamento de Patologia, funcionários da biblioteca e da secretaria da pós-graduação da FMVZ- USP, pelos conhecimentos adquiridos e por todo apoio. O meu muito obrigada.

RESUMO

ALEXANDRE, J.C.P.L. **Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em matadouros no Huambo/Angola.** [Anatomopathological, immunohistochemical and molecular evaluation of Bovine Contagious Pleuropneumonia in animals slaughtered in slaughterhouses in Huambo/Angola.] 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) é uma enfermidade respiratória grave, causada pelo *Mycoplasma mycoides subsp mycoides Small Colony (MmmSC)*, sendo de primeira ordem no quadro nosológico em Angola, com alta prevalência e grandes repercussões econômicas na pecuária angolana. Objetivando caracterizar os achados anatomopatológicos e a resposta inflamatória na ocorrência natural da PPCB, realizou-se a coleta de amostras de pulmão e linfonodos regionais em 50 bovinos com lesões macroscópicas compatíveis com a doença e abatidos na cidade de Huambo, Angola. As amostras teciduais foram fixadas em formol 10% e incluídas em parafina para avaliação histopatológica, pela técnica de hematoxilina-eosina, e detecção do agente infeccioso por PCR a partir do DNA total extraído do tecido pulmonar parafinado. A caracterização da resposta inflamatória foi avaliada por imunohistoquímica, utilizando-se o método de detecção por polímero para os marcadores de linfócitos T (CD3) e B (Pax5), assim como as interleucinas (IL)-1 β e 4. Após avaliação molecular, 7 amostras foram excluídas por não apresentarem DNA viável e 16/43 (37,2%) animais foram positivos para o *MmmSC* pelo PCR. Dos animais positivos, a lesão macroscópica mais frequente foi a aderência (7/16, 43,8%); enquanto a lesão microscópica mais frequente foi a hiperplasia linfoide (9/16, 56,2%). Houve associação significativa entre a positividade dos animais e a presença da alteração nas lesões de aderência ($p=0,047$), pulmão marmoreado ($p=0,012$), sequestro ($p=0,001$) e fibrose pulmonares ($p<0,05$). O pulmão esquerdo e lobo diafragmático esquerdo foram frequentemente afetados na doença, porém sem diferença significativa. Os resultados imunohistoquímicos demonstraram marcação focal para linfócitos B e T, assim como imunoexpressão de IL-1 β e IL-4 em intensidade fraca a moderada na maioria dos casos analisados. Os resultados demonstraram que a PPCB está presente em bovinos na região estudada, porém com lesões anatomopatológicas e resposta inflamatória inespecíficas. Estes resultados ressaltam a importância da avaliação integrada de dados epidemiológicos, anatomopatológicos, imunológicos e moleculares para estabelecer um diagnóstico preciso e definitivo da PPCB nestes animais.

Palavras-chaves: Pleuropneumonia Contagiosa Bovina, lesões, anatomopatológico, bovino

ABSTRACT

ALEXANDRE, J.C.P.L. **Anatomopathological, immunohistochemical and molecular evaluation of Bovine Contagious Pleuropneumonia in animals slaughtered in slaughterhouses in Huambo/Angola.** [Avaliação anatomopatológica, imunohistoquímica e molecular da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina em animais sacrificados em matadouros no Huambo/Angola] 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Bovine Contagious Pleuropneumonia (PPCB) is a serious respiratory disease caused by *Mycoplasma mycoides subsp mycoides Small Colony (MmmSC)*, being of first order in the nosological framework in Angola, with high prevalence and great economic repercussions in Angolan livestock. Aiming to characterize the anatomopathological findings and the inflammatory response in the natural occurrence of PPCB, samples of lung and regional lymph nodes were collected in 50 cattle with macroscopic lesions compatible with the disease and slaughtered in the city of Huambo, Angola. Tissue samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin for histopathological evaluation by the hematoxylin-eosin technique and detection of the infectious agent by PCR from the total DNA extracted from the paraffin-shaped lung tissue. The characterization of the inflammatory response was evaluated by immunohistochemistry, using the polymer detection method for T (CD3) and B (Pax5) lymphocytes, as well as interleukins (IL) -1 β and 4. After molecular evaluation, 7 samples were excluded because they did not present viable DNA and 16/43 (37.2%) animals were positive for *MmmSC* by PCR. Of the positive animals, the most frequent macroscopic lesion was adhesion (7/16, 43.8%); while the most frequent microscopic lesion was lymphoid hyperplasia (9/16, 56.2%). There was a significant association between the positivity of the animals and the presence of changes in adhesion lesions ($p = 0.047$), marbled lung ($p = 0.012$), pulmonary sequestra ($p = 0.001$) and fibrosis ($p < 0.05$). The left lung and left diaphragmatic lobe were frequently affected in the disease, but without significant difference. Immunohistochemical results demonstrated focal labeling for B and T lymphocytes as well as weak to moderate intensity of IL-1 β and IL-4 immunoexpression in most of the analyzed cases. The results showed that CPBP is present in cattle in the studied region, but with nonspecific anatomopathological lesions and inflammatory response. These results highlight the importance of the integrated evaluation of epidemiological, anatomopathological, immunological and molecular data to establish an accurate and definitive diagnosis of CBPP in these animals.

Key words: Bovine Contagious Pleuropneumonia, lesions, anatomopathological, bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa de distribuição da Pleuropneumonia contagiosa bovina na África de 2004 à 2014.....	20
Figura 2- Mapa de distribuição dos focos da Pleuropneumonia Contagiosa Bovinas em Angola.	21
Figura 3- Colónias de <i>MmmSC</i> em meio de cultura sólido, com a aparência típica de “ovo frito”.....	23
Figura 4-Postura típica de um animal com Pleuropneumonia Contagiosa Bovina. Bovino com a cabeça e o pescoço prolongados, como resultado compensatório da dispneia. ..	29
Figura 5- Fotomacrografia, Pulmão Bovino. Lesões compatíveis com PPCB.....	49
Figura 6- Fotomacrografia dos linfonodos regionais com lesões compatíveis com a PPCB.	49
Figura 7- Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de bovinos com lesões microscópicas compatíveis com a PPCB.	51
Figura 8-Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de e pleura de bovinos com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB.	52
Figura 9- Fotomicrografia dos linfonodos regionais de animais com lesões compatíveis com a PPCB.....	52
Figura 10-Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após reação para amplificação do fragmento de 275pb do genoma de <i>MmmSC</i>	54
Figura 11-Fotomicrografia da reação imunohistoquímica para detecção de células linfocitárias e interleucinas em pulmão de bovinos com lesões da PPCB.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Frequências das lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB e da localização anatômica nos pulmões – São Paulo, 2018.	48
Tabela 2- Frequências das lesões histopatológicas pulmonares nos animais –São Paulo, 2018.	50
Tabela 3- Análise dos resultados obtido com a técnica molecular – São Paulo, 2018.....	53
Tabela 4- Associação entre a presença e localização das lesões macroscópica e a amostra ser positiva para <i>MmmSC</i> , pelo teste estatístico de qui-quadrado e odds-ratio. São Paulo, 2018.	55
Tabela 5- Associação entre a presença de lesões microscópicas e a amostra a ser positiva na PCR para <i>MmmSC</i> , pelo teste estatístico de qui-quadrado e odds-ratio. São Paulo, 2018.....	56
Tabela 6- Avaliação quantitativa para células linfocitárias imunomarcadas em pulmão com lesões da PPCB. São Paulo, 2018.	57
Tabela 7- Avaliação semi-quantitativa de interleucinas em pulmão com lesões da PPCB. São Paulo, 2018.	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo para o processamento histológico das amostras teciduais	39
Quadro 2 – Protocolo de coloração das lâminas pelo método de Hematoxilina &Eosina	40
Quadro 3– Conjunto de <i>primers</i> utilizados nas reações em Cadeia da Polimerase(PCR)	44
Quadro 4– Especificações dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 PLEUROPNEUMONIA CONTAGIOSA BOVINA	18
2.1.1 Definição	18
2.1.2 História e distribuição mundial.....	18
2.1.3 Histórico e distribuição em angola	20
2.1.4 Etiologia	22
2.1.4.1 Características do agente etiológico	22
2.1.5 Patogênese	24
2.1.6 Aspectos epidemiológicos	25
2.1.7 Perdas econômicas causadas pela doença.....	26
2.1.8 Sinais clínicos.....	27
2.1.8.1 Forma hiper-aguda.....	28
2.1.8.2 Forma aguda	28
2.1.8.3 Forma sub-aguda	29
2.1.8.4 Forma crônica.....	30
2.1.9 LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS.....	30
2.1.9.1 Lesões macroscópicas.....	30
2.1.9.2 Lesões microscópicas	31
2.1.10 Diagnóstico.....	32
2.1.11 Controle e prevenção	33
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVOS GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 LOCAL DE ESTUDO, ORIGEM DOS ANIMAIS	38
4.2 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA	38
4.2.1 Análise macroscópica	38
4.2.2 Análise microscópica.....	39
4.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR	41
4.3.1 Processamento do material parafinado	41
4.3.2 Extração do DNA.....	41
4.3.3 Reação de Cadeia Polimerase (PCR) convencional (PCR qualitativo).....	42

4.3.3.1 PCR qualitativo qualitativo para o controle interno da qualidade de DNA.....	42
4.3.3.2 PCR qualitativo para identificação da classe <i>Mollicutes</i>	43
4.3.3.3 PCR qualitativo para <i>Mycoplasma mycoides mycoides Small Colony (MmmSC)</i>	43
4.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	44
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA.....	47
5.1.1 Análise macroscópica	47
5.1.2 Análise microscópica.....	50
5.2 DETECÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA PPCB	53
5.2.1 PCR qualitativa para controle positivo (gene endógeno bovino)	53
5.2.2 PCR qualitativa para detecção do <i>mycoplasma mycoides mycoides sc</i>	53
5.3 CORRELAÇÃO DOS ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS COM A DETECÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO	54
5.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS E INTERLEUCINAS NO PULMAO DE ANIMAIS COM PPCB	57
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

A Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) é uma enfermidade respiratória grave de curso, agudo, subagudo ou crônico, que pode causar perdas produtivas e elevada mortalidade. A PPCB é causada pelo *Mycoplasma mycoides subsp mycoides Small Colony (MmmSC)* (OIE 2008) e é altamente infecciosa no gado bovino e nos búfalos de água (OIE, 2014; RODRIGUES et al., 2015). Esta doença é transmitida por contato direto com animais infectados, através da inalação do ar e dos aerossóis com gotículas infecciosas provenientes das secreções brônquicas e corrimentos nasais, expelidos quando um animal infectado tosse. É caracterizada por inflamação exsudativa grave, envolvendo os pulmões e a pleura. (PILO et al., 2007; OIE 2008; FISCHER et al., 2012; OIE, 2014). Apesar de o agente etiológico da PPCB ter sido identificado há mais de 100 anos, os seus mecanismos moleculares de patogenicidade, assim como seus fatores de virulência ainda são pouco conhecidos (PILO et al., 2007). A patogenicidade e a virulência parecem ser determinadas por funções metabólicas ou catabólicas intrínsecas (WESTBERG et al 2004; PILO et al., 2005).

Os animais apresentam sinais respiratórios e febre, afetando, ocasionalmente, as articulações, principalmente em bezerros (OIE, 2008; RODRIGUES et al., 2015). O *MmmSC* apresenta grande tropismo pela cavidade torácica, na qual induz uma reação inflamatória grave, caracterizada por pleurite serofibrinosa e pneumonia intersticial, afetando, geralmente, apenas um dos pulmões (PILO et al., 2007; OIE, 2008; FISCHER et al., 2012; OIE, 2014). Esta apresentação patológica clássica é observada na forma aguda da doença e sua progressão pode resultar na morte dos animais, ocasionando altas taxas de mortalidade (RODRIGUES et al., 2015). No entanto, alguns animais podem se recuperar gradualmente, atuando como portadores assintomáticos (BOROWSKI, 2001; GOMES, 2008; OIE, 2009). As formas subagudas e crônicas caracterizam-se pela presença de aderência pleurais e lesões necróticas encapsuladas típicas, denominadas de “sequestros”. Estes animais podem ser os responsáveis pela persistência da infecção em uma população ou região, e desempenhar um papel importante na epidemiologia da enfermidade (OIE, 2004; OIE, 2009; FERNANDES, 2010; RODRIGUES et al., 2015).

A PPCB está presente em muitos países da África Subsaariana, sendo a principal causa de morte por doença infecciosa em bovinos, e representa uma das ameaças mais importante para o gado neste continente. Atualmente, a PPCB é responsável por grandes prejuízos na produção de gado e, conseqüentemente, perdas socioeconômicas incontornáveis no comércio

internacional de animais (PILO et al., 2007; CARVALHO, 2008; MILTIADOU, 2009). Países ou zonas infectadas são submetidos à restrições na exportação de animais vivos, conforme indicado no Código Sanitário de Animal Terrestre da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) (OIE, 2014). Na África, esta enfermidade é considerada endêmica e põe em risco a saúde dos animais, a produção de carne e leite, assim como dos subprodutos de origem bovina. Estima-se que a PPCB occasiona uma perda de 80% na produção do gado bovino, uma vez que os animais sobreviventes são portadores crônicos e apresentam menor produção. Considerando que o tratamento é proibido neste continente, a principal medida de controle é a vacinação com a estirpe atenuada T1/44 de *MmmSC* (OIE, 2002; THIAUCOUR et al., 2004).

A PPCB é uma enfermidade de primeira ordem no quadro nosológico angolano, que alerta sobre as perdas produtivas e mortalidade elevada. Trata-se de uma enfermidade da lista A da OIE e prioridade pelo programa da FAO (OIE, 2004). Os informes dos Departamentos Provinciais do Instituto dos Serviços Veterinários da Angola, ao avaliar a situação zoonosológica, publicaram a PPCB como a terceira enfermidade em relação ao número de focos da doença, assim como ao número de animais infectados (MINAG, 2008).

O diagnóstico da PPCB é baseado no histórico de contato com animais infectados, resultados clínicos, testes de imuno-diagnóstico, achados de necropsia e cultura de *Mycoplasma* (GIZAW, 2004; REGALLA et al., 2007). O diagnóstico laboratorial da PPCB baseia-se em testes indiretos, como o teste de fixação de complemento (CFT), ELISA e imunoblotting (IB), bem como em métodos diretos, como a cultura e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (OIE, 2014). No relatório de 2001, do Comitê Científico da Saúde Animal (Comissão Europeia, 2001), a PCR e imunohistoquímica (IHQ) foram considerados os testes de escolha na presença de carcaças com lesões suspeitas e quando o soro não está disponível, e/ou quando a cultura de *Mycoplasma* não for conclusiva devido às condições de preservação da carcaça ou dificuldades logísticas. Até a presente data, as técnicas moleculares (PCR qualitativo ou quantitativo) são, em grande parte, preferidas para a rotina diagnóstica. No entanto, as investigações patogênicas ainda confiam na IHQ, o que permite correlacionar a presença do antígeno com alterações patológicas nos tecidos. Uma das principais limitações no desenvolvimento e otimização dos métodos imunohistoquímicos é a escassez de reagentes específicos para a detecção do antígeno (RODRIGUES et al., 2015).

Em Angola, os dados relacionados à PPCB, normalmente, provêm dos registos dos abatedouros onde os animais são abatidos. Embora as lesões sejam clássicas, o estudo anatomopatológico, imunohistoquímico e molecular da PPCB são considerados de extrema importância para se ter um diagnóstico preciso da enfermidade. Em Angola, poucos são os

estudos anatomopatológicos e imunohistoquímicos relacionados com a ocorrência natural desta enfermidade, o que nos motivou a abordar o presente tema, que poderá contribuir no conhecimento clinicopatológico e epidemiológico da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLEUROPNEUMONIA CONTAGIOSA BOVINA (PPCB)

2.1.1 Definição

A Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) é uma enfermidade respiratória aguda, subaguda ou crônica, provocada pelo *Mycoplasma mycoides subsp mycoides Small Colony (MmmSC)*, que causa perdas produtivas e elevadas mortalidades. Esta enfermidade é altamente infecciosa, afeta os pulmões e a pleura do gado bovino e búfalos de água (OIE,2008), causando febre e sinais respiratórios, tais como respiração difícil ou rápida, tosse e descarga nasal (OIE, 2009; FERNANDES, 2010). A PPCB é uma das principais causas de morte no gado bovino na África (GOMES, 2008; OIE, 2008).

2.1.2 História e distribuição mundial

A PPCB foi descrita, pela primeira vez, em 1564, por Gallo, na Itália e já ocorreu em quase todo o mundo. A dispersão da PPCB pela Europa começou no final do século XVIII e culminou em meados do século XIX. Em 1858, surgiu na Austrália através da importação de bovinos infectados do Reino Unido. A partir daí a doença dispersou-se para o continente asiático, onde ainda ocorriam surtos esporádicos. Em 1973, a Austrália foi declarada livre da PPCB (THIAUCOURT et al., 2004; FAO 2008). Os Estados Unidos da América estão livres desde 1893 (OIE, 2006).

Antes do agente causal ter sido descoberto, em 1898, a doença já tinha sido erradicada na Holanda (1888), Suíça (1895) e na Grã-Bretanha (1896) através da aplicação de medidas sanitárias rigorosas, tais como a proibição da movimentação do gado bovino, assim como a vacinação e abate dos animais doentes e suspeitos. Para a imunização, o fluido dos exsudados pleurais de animais doentes e abatidos era administrado na extremidade da cauda, por via subcutânea. No entanto, neste método desenvolvido por Willems, na Bélgica, em 1852, alguns

animais morriam após a vacinação e outros perdiam a cauda devido a inflamação local que se desenvolvia (LAAK, 1992; OIE, 2008). Seguiu-se a erradicação na Bélgica (1900), França (1902), Áustria (1919), Polônia e na antiga União Soviética, (1934). (OIE, 2008). Nas décadas de 80 e 90, registraram-se surtos inesperados na França e Itália, porém a origem destes surtos nunca foi completamente esclarecida. Estudos de epidemiologia molecular sobre as estirpes isoladas nesta época levantaram a hipótese de reemergência a partir de um reservatório europeu estabelecido, e não da importação de bovinos africanos ou australianos (OIE, 2008).

No Brasil, membros do grupo *Mycoplasma mycoides* já foram diagnosticados no País, tanto por isolamento, quanto por técnicas moleculares e sorológicas (PEREIRA et al., 2003). No entanto, no dia 24 de maio de 2017, foi oficialmente reconhecido pela OIE que o Brasil está livre da PPCB, uma grande conquista da defesa sanitária que, de acordo com os cronogramas e programas de vacinação, atingiram a meta de erradicação da doença no País (DIAS, 2007).

A PPCB é endêmica em maior parte de África; acredita-se que a doença estivesse presente na África antes da era colonial (MBULU et al., 2004; COUTO, 2014). No continente Africano, o primeiro país a ser afetado foi a África do Sul, em 1854, através de um touro infectado importado da Holanda. A doença foi disseminada rapidamente por todo o país, chegando às províncias do Norte (CARVALHO, 2008) (Figura 1).

O continente africano continua sendo o grande foco da enfermidade (MBULU et al., 2004; COUTO, 2014). Nas últimas décadas, a zona austral da África tem experimentado um aumento do número de surtos da PPCB, que pode ser o resultado da cessação da vacinação contra a peste bovina, uma vez que esta era combinada com a vacinação contra a PPCB. Até então, o controle da PPCB era razoavelmente bom, com poucos surtos relatados no continente. É também atribuído à uma diminuição do poder econômico dos países da África Subsaariana, ao enfraquecimento dos serviços veterinários e a falta de investimento no controle das doenças (PENRITH, 2014; THIAUCOURT, 2015). No norte da África, o único país atingido foi o Egito, o qual já se libertou há muitos anos. Na África ocidental e central, o Senegal é endêmica para a PPCB. Na África oriental, a doença é endêmica no Quênia, Etiópia, Uganda, Ruanda e Burundi, sendo suspeita de ter se espalhado do Quênia para a Tanzânia em 1995, após uma ausência de 25 anos (OIE, 2008; FAO, 2015). A doença dispersou-se por toda a região sul do continente africano, através da movimentação de manadas de bovinos por transumância e trocas comerciais, sobretudo nas regiões a sul do Saara (MBULU et al., 2004; OIE, 2009; FERNANDES, 2010; FAO 2015). Os países meridionais atualmente mais afetados são: Angola na parte sul, Namíbia na sua parte norte, Zâmbia Ocidental, República Democrática do Congo

e Tanzânia. O Sudão foi afetado em 1912 e, desde então, é a doença mais importante dos bovinos neste país, a qual se disseminou por todas as direções (PENRITH, 2014).

A presença da PPCB é uma restrição para o desenvolvimento econômico e rural no continente africano, e a maioria dos países não dispõe dos recursos necessários para alcançar o adequado controle e a erradicação da doença (PENRITH, 2014; THIAUCOURT, 2015).

Figura 1: Mapa de distribuição da Pleuropneumonia contagiosa bovina na África de 2004 a 2014

Fonte: FAO (2015)

2.1.3 Histórico e distribuição em Angola

Em Angola, a PPCB foi introduzida em 1880, por meio da importação de vacas leiteiras e por bovinos infectados pertencentes aos Trekkers de Dorsland (agricultores migratórios) que emigraram da África do Sul e se estabeleceram na Humpata (Huíla) (SIMO, 2007; PENRITH, 2014). A presença desta enfermidade em Angola foi confirmada em 1888. Durante o período situado entre 1882, data da fixação dos emigrantes «bóers», e 1921, diversos fatores

favoreceram a expansão da PPCB e, de fato, a doença espalhou-se rapidamente por todo o território angolano (MENDES, 2006; SIMO, 2007; PENRITH, 2014).

Atualmente, a PPCB é reconhecida como a enfermidade de maior impacto econômico e social também em Angola. O gado bovino é vacinado desde 1921, por meio da campanha de vacinação anual; no entanto, a doença ainda está longe de ser erradicada no país (CATLEY et al., 2013; MUUKA, 2013). É reconhecido que, para alcançar o sucesso no controle desta enfermidade, é essencial a participação e cooperação dos proprietários dos animais, o que muitas vezes não acontece, uma vez que alguns criadores não apresentam o total de cabeças de bovinos que possuem quando há campanhas massivas de vacinação (GULL, 2013). A PPCB continua presente em grande parte das províncias do país, com maior incidência nas províncias a sul do paralelo (Figura 2). Dados reportados de um estudo apontam que a doença se apresenta com maior incidência nas províncias do Cunene, Huambo, Huíla, Cuando Cubango e Cuanza Sul, por estas concentrarem maior parte do efetivo pecuário no país (MENDES, 2006; NSALAMBI, 2014).

Figura 2: Mapa de distribuição dos focos da Pleuropneumonia Contagiosa Bovinas em Angola

Fonte: (NSALAMBI, 2014).

2.1.4. Etiologia

A PPCB é causada pelo *Mycoplasma mycoides subsp mycoides SC (MmmSC)*, que pertence ao grupo do *M. mycoides*, o qual compreende seis outras espécies (*M. mycoides subsp mycoides SC PG1*; *M. mycoides subsp mycoides LC Y Goat*; *M. mycoides subsp capri PG3*; *M. capricolum subsp capricolum- California Kid*; *M. capricolum subsp capripneumonia F38* e *Mycoplasma leachii MI*) (THIAUCOURT et al., 2004; VILEI, 2010; HELLER et al., 2016). Todos estes agentes são patogênicos aos ruminantes.

2.1.4.1. Características do agente etiológico

O *Mycoplasma mycoides subsp mycoides SC* é uma bactéria pertencente ao Filo Firmicutes, Classe Mollicutes, Ordem Mycoplasmatales, Família Mycoplasmataceae, gênero *Mycoplasma* (ABDO et al., 2000). Trata-se de um patógeno extracelular, com um genoma de 1.211 kbp, que vive em estreita associação com as células dos hospedeiros (WESTBERG et al., 2004). Pertence a um grupo de *Mycoplasma* intimamente relacionados, conhecidos como *cluster mycoides*, que são todos patógenos de ruminantes (CARVALHO, 2008). Em 1956, este agente adquiriu a designação *Mycoplasma mycoides subsp Mycoides* e foi atribuída por Edward e Freundt (ABDO et al., 2000). Em 1978, foram reconhecidas duas variantes do grupo *Mycoplasma mycoides*, com base em características biológicas e de cultivo: a variante *Small Colony (SC)*, que causa a PPCB, e a variante *Large Colony (LC)*, que causa artrite e mastite em cabras.

Tal como os outros microrganismos da classe *Mollicutes*, o *MmmSC* é pequeno, simples, com capacidade de autorreplicação e não tem parede celular, sendo por isso pleomórfico e resistente aos antibióticos β -lactâmicos (WESTBERG et al., 2004). É uma bactéria que cresce sob condições aeróbicas e anaeróbicas, sendo facilmente inativada em temperaturas superiores a 45 °C, pH ácido ou alcalino e é susceptível ao cloreto de mercúrio (0,01%), hidróxido de cálcio, fenol (1%, por 3 min) e solução de formaldeído (0,5%, por 30 seg). O *MmmSC* não forma biofilmes em interfaces ar/líquido, não sendo resistente no meio ambiente (MCAULIFFE et al., 2006 e OIE, 2008). Por outro lado, sobrevive por longos períodos em tecidos congelados (THIAUCOURT et al., 2004; OIE, 2007).

O *MmmSC* cresce relativamente bem em meios de cultura artificiais, requerendo, no entanto, suplementos específicos e seletivos como o soro sanguíneo inativado com pH neutro e uma ligeira agitação da cultura, que permite o arejamento para aumentar a taxa de crescimento. As culturas de *MmmSC* têm uma aparência filamentosa em meio líquido, semelhante a uma nuvem que se dispersa facilmente por agitação, resultante do seu modo de reprodução (CARVALHO, 2008). Tipicamente, as colônias de *MmmSC* têm o aspeto de “ovo frito” (Figura 3), com um diâmetro que raramente ultrapassa 1 mm e que, por isso, têm de ser visualizadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica (THIAUCOURT et al., 2004).

Figura 3: Colônias de *MmmSC* em meio de cultura sólido, com a aparência típica de “ovo frito”

Fonte: (CARVALHO, 2008)

Os *Mycoplasma* são constituídos por um conjunto mínimo de organelas: uma membrana plasmática, ribossomos e uma cadeia dupla de DNA circular (CARVALHO, 2008). O *Mycoplasma* reproduz-se por divisão binária, mas a divisão citoplasmática ocorre frequentemente após a replicação do genoma, resultando assim na formação de filamentos multinucleados. Estes filamentos, que podem atingir 100 µm de comprimento e 0,4 µm de espessura, tendem a produzir verdadeiras estruturas micelóides ramificadas; daí a designação *Mycoplasma, myces* - fungo; *plasma* - forma (COUTO, 2014).

O genoma de *Mycoplasma mycoides mycoides SC* é caracterizado por um único cromossoma circular que tem o conteúdo de guanina e citosina mais baixo e a maior densidade de sequências de inserção, o que pode contribuir para a sua variabilidade (THIAUCOURT et al., 2004; WESTBERG et al., 2004). É um genoma pequeno, uma vez que este *Mycoplasma*

sintetiza poucas proteínas (THIAUCOURT et al., 2004). Ao todo, possui 985 genes, entre os quais, os genes que codificam para a síntese de proteínas de superfície, enzimas e proteínas transportadoras responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio, assim como pela síntese dos constituintes da cápsula, a qual se acredita exercer os efeitos tóxicos no hospedeiro (WESTBERG et al., 2004).

A grande quantidade de aminoácidos requeridos por *MmmSC* em cultivo reflete a sua limitada capacidade de síntese. Como fonte de energia, habitualmente estes agentes utilizam a glicose, mas podem usar outros açúcares, tal como a frutose (FAO, 2008).

2.1.5 Patogênese

Apesar do agente etiológico da PPCB ter sido identificado há mais de 100 anos, os seus mecanismos moleculares de patogenicidade e fatores de virulência ainda são pouco conhecidos (PILO et al., 2007). Nunca foram identificados fatores de virulência primários, tais como toxinas ou invasinas, tão pouco genes de virulência primários, o que pode ser devido ao fato de o seu genoma ser extremamente pequeno (WESTBERG 2004; PILO et al., 2007). A patogenicidade e a virulência parecem ser determinadas por funções metabólicas ou catabólicas intrínsecas, em particular, pela liberação direta de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do metabolismo de glicerol para as células hospedeiras, que resulta em dano celular e inflamação. Embora o seu modo de ação não seja bem compreendido, foi sugerido que a secreção do polissacarídeo capsular (galactano) possa estar envolvido no efeito citopático direto, levando à contração dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, ocasionando trombose, edema pulmonar e imunossupressão (WESTBERG et al., 2004; PILO et al., 2005). A necessidade de economizar os recursos genéticos levou os *Mycoplasmas* a adotarem funções metabólicas e estruturais endógenas como fatores de virulência (MBULU et al., 2004).

A transmissão do *Mycoplasma* é direta, por inalação de gotículas de um animal infectado. Os microrganismos penetram na camada de muco, após aderir-se aos cílios da traqueia, brônquios e bronquíolos através de receptores de ácido neuramínico de superfície. Os agentes imobilizam os cílios, os quais podem ser eliminados, favorecendo o surgimento de infecções secundárias (THIAUCOURT et al., 2004; KHARKOV, 2007; PILO et al., 2007). Foi proposto que a produção de H_2O_2 por certas espécies patogênicas de *Mycoplasma* causa inibição dos movimentos ciliares em órgãos traqueais infectados (PILO et al., 2005). E também interagem

com macrófagos alveolares e linfócitos, estimulando-os a produzirem citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfoide perivascular e peribrônquica características (PILO et al., 2005). Uma reação inflamatória maciça, principalmente restrita aos pulmões, é a principal consequência patológica da infecção. A resposta inflamatória excessiva é, provavelmente, devido a ativação inadequada de macrófagos alveolares, levando a produção excessiva de TNF- α e ao recrutamento exacerbado de neutrófilos, com a liberação subsequente de mediadores inflamatórios (PILO et al., 2007; COUTO, 2014). Demonstrou-se, ainda, que os macrófagos apoptóticos liberam IL-1 β , a qual induz inflamação (DEDIEU et al., 2005).

Os *Mycoplasmas* aderem intimamente aos linfócitos, induzindo proliferação e inativação linfoplasmocitária, o que o torna um superantígeno. Evidenciou-se que esses microrganismos possuem fatores mitogênicos para linfócitos, os quais seriam responsáveis pela hiperplasia do tecido linfoide peribronquiolar, característica da doença (GIZAW, 2004; DEDIEU et al., 2005).

2.1.6. Aspectos epidemiológicos

A PPCB e a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) são classificadas pela OIE como doenças de notificação obrigatória devido seu impacto econômico significativo na pecuária (ASSUNÇÃO et al., 2007). A PPCB é altamente contagiosa, com elevada mortalidade que causa perdas econômicas consideráveis, sendo uma das principais enfermidades em bovinos na África. A morbidade aumenta com a densidade populacional e com a estabulação, podendo chegar a 100% em um rebanho suscetível. A mortalidade oscila entre 10 a 70%, e é influenciada por fatores predisponentes, como a subnutrição e o parasitismo. Estima-se que 25% dos bovinos que se recuperam de um episódio clínico agudo tornam-se portadores crônicos (OIE, 2006).

Segundo a OIE (2008), os principais hospedeiros da PPCB são os bovinos domésticos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) e os búfalos de água (*Bubalus bubalis*). Alguns ruminantes selvagens, como os camelos e Búfalos do cabo (*Syncerus caffer*), não são susceptíveis. Esta doença afeta os bovinos em qualquer idade e a maioria dos animais infectados se encontram em regime intensivo de criação, onde se utilizam dietas ricas em grãos, existindo uma frequência mais alta nas épocas do ano em que os animais necessitam de dietas suplementares em

confinamento (AMES, 2009). Em condições naturais, o período de incubação pode variar de 5 até 207 dias. Em situações de infecção massiva, varia entre 15 e 35 dias (THIAUCOURT et al., 2004; FAO, 2008). O nível de susceptibilidade dos animais de um determinado rebanho também varia consideravelmente entre os animais; por exemplo, durante um surto, apenas 33% dos animais podem apresentar sintomas (agudos ou hiper-agudos), 46% não apresentam sintomas (formas subclínica), apesar de estarem infectados, e 21% parecem ser resistentes (THIAUCOURT et al., 2004; FAO, 2008).

A introdução da PPCB numa determinada área é causada pela entrada de bovinos infectados, animais no período de incubação ou portadores crônicos assintomáticos, que expõem o agente etiológico, sendo por isso uma fonte constante de infecção (OIE, 2002; CARVALHO, 2008). A transmissão da enfermidade ocorre pelo contato direto entre um animal infectado e um sensível, através de partículas difundidas pela tosse. Não há provas de transmissão mediante os fômites (objetos inanimados, como roupas, instrumentos e veículos) ou mesmo através de ingestão de alimentos contaminados ou exposição direta aos órgãos de animais contaminados, já que o microrganismo não sobrevive por muito tempo no meio ambiente (OIE, 2009; PENRITH, 2014). Os três fatores de maior importância na velocidade de dispersão da doença são a proximidade de contato, intensidade da infecção (concentração do agente infeccioso) e número de animais suscetíveis num determinado local (FAO, 2008). Um grande número de *MmmSC* pode estar presente em secreções brônquicas e descargas nasais, sendo transmitidos por gotículas aos animais sensíveis por contato próximo (PERINTH, 2014). Após a infecção, a enfermidade tem um aspecto de manifestação muito variado, que engloba desde as formas agudas e hiper-agudas, até às variantes subaguda e crônica, esta última com um elevado risco de transmissão do agente infeccioso (PERINTH, 2014).

2.1.7 Perdas econômicas causadas pela doença

A PPCB é considerada uma enfermidade de importância econômica devido a capacidade de comprometer a segurança alimentar (OIE, 2008). As perdas causadas pela PPCB continuam sendo uma séria ameaça para a produção de gado na África Subsaariana. Cerca de 26 países do continente são afetados pela doença (Figura 1), que está se espalhando para países e áreas onde não havia sido relatada anteriormente (TAMBI et al., 2006).

Nos países afetados, a doença tem sérias implicações para a segurança alimentar e meios de subsistência causados pela mortalidade, perda na produção de leite e perda drástica de peso corpóreo em casos mais crônicos. O impacto na produção agrícola e, conseqüentemente, na segurança alimentar, é também resultado da redução na elaboração e uso do estrume destes animais para a fertilização do solo (MBULU et al., 2004; OIE, 2008; PENRITH e THIAUCOURT, 2015). O impacto da PPCB na economia dos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos reflete-se em termos de perdas na produção direta, como redução na produção de carne, leite e derivados, e perdas indiretas, como na redução na força de tração e aumento nos custos de controle, principalmente relacionados à vacinação e redução no efetivo pecuário (TAMBI et al., 2006).

As perdas econômicas incluem, também, mortalidade e morbidade variáveis, que resultam em produção reduzida, baixa fertilidade e proibições comerciais por meio de barreiras internacionais (TAMBI et al., 2006). Frequentemente, a PPCB é uma das enfermidades infecciosas que causa maiores perdas em zonas onde é endêmica e nas regiões em que os animais nunca tiveram contato com a doença, locais estes nos quais as taxas de mortalidade podem estar na ordem dos 80%; e os bovinos que sobrevivem tornam-se portadores crônicos (FERNANDES, 2010). O impacto econômico da PPCB é, geralmente, difícil de ser calculado, mas um estudo recente em 12 países da África Austral relatou um total de 2.612 surtos de PPCB nos relatórios da OIE durante o período de 1996 a 2002, representando 96% para esse período e sugerindo um prejuízo de 44,8 milhões de euros em perdas diretas e custos com o controle da doença (MBULU et al., 2004; OIE, 2008; PENRITH e THIAUCOURT, 2015).

2.1.8 Sinais clínicos

Existe uma variação considerável na gravidade do dano observado na PPCB. Dependendo da resistência do animal e a intensidade da exposição, a doença pode ser classificada, clinicamente, como hiper-aguda, aguda, subaguda ou crônica. Ainda, geralmente os casos com curso agudo são seguidos por um estágio crônico, que pode durar por 2 a 3 anos, como fase latente da doença (GIZAW, 2004). No início de uma epidemia, a forma predominante é aguda, mas à medida em que progride, as formas subaguda ou crônica tornam-se mais frequente. Em áreas endêmicas, a enfermidade é, sobretudo, subaguda e crônica. Nos bezerros com seis meses

de idade, o que se observa são sinais de artrite nas articulações társicas e cárpicas (FAO, 2002; THIAUCOURT et al., 2004).

2.1.8.1. Forma hiper-aguda

Segundo a FAO (2002), a forma hiper-aguda, que envolve até 10% dos animais infectados, pode ser observada no início de um surto. A morte é súbita e, muitas vezes, não é acompanhada por qualquer outro sinal clínico, tornando o diagnóstico clínico difícil. Os animais afetados podem morrer no intervalo de uma semana (GIZAW, 2004).

2.1.8.2. Forma aguda

O estágio agudo observa-se em, aproximadamente, 20% dos animais doentes e o curso é de 5-7 dias, onde os primeiros sintomas consistem num súbito aumento de temperatura até 40°C ou mais. As vacas leiteiras apresentam uma brusca queda da produção de leite, os animais doentes tendem a se isolar do resto do rebanho e manifestam anorexia. Posteriormente, os animais doentes desenvolvem sintomas como respiração difícil e irregular, curta e rápida, com frequência respiratória de até 55 movimentos por minuto (LAAK, 1992). Estes sinais tornam-se mais pronunciados durante os próximos 10 a 15 dias, à medida que a temperatura aumenta acima de 40°C. Na auscultação dos pulmões, revela-se uma variedade de sons e, dependendo da intensidade das lesões no parênquima pulmonar, é possível detectar crepitações e fricção pleural (LAAK, 1992). Alguns animais desenvolvem tosse seca curta e intermitente, boca aberta com língua saliente, particularmente quando submetidos ao exercício de marcha (THIAUCOURT et al., 2004, LAAK, 1992).

Quando a pneumonia progride, os animais manifestam dispneia e inclinam a cabeça para frente, com os cotovelos para fora, dorso arqueado e o pescoço para frente para aumentar a capacidade respiratória (Figura 4) (THIAUCOURT et al., 2004). O animal pode morrer dentro de 10 a 15 dias após os primeiros sinais clínicos se tornarem óbvios.

Figura 4: Postura típica de um animal com Pleuropneumonia Contagiosa Bovina. Bovino com a cabeça e o pescoço prolongados, como resultado compensatório da dispneia.

Fonte: (BENKIRANE, 1994)

A forma aguda caracteriza-se por três fases: 1) fase de invasão, com sintomas brandos, associados à anorexia, polipnéia e tosse branda; 2) fase clínica, na qual há hepatização dos lobos pulmonares, conduzindo a pleurite, agravamento dos sinais clínicos, postura rígida com dorso arqueado e pescoço estendido, aumento de temperatura acompanhado de prostração do animal, respiração curta e rápida, tosse úmida e com expectoração espumosa, e 3) fase terminal, em que o animal se recupera da fase clínica, havendo regressão das lesões e dos sinais a ele associados, tornando-se portador assintomático (CARVALHO, 2008).

2.1.8.3. Forma subaguda

A forma subaguda ocorre, frequentemente, em cerca de 40 a 50% dos animais afetados. Os sintomas assemelham-se aos da forma aguda, mas são menos graves; pode ser observado animais com febre leve e transitória ou os sintomas podem ser limitados a uma tosse leve apenas quando o animal for exercitado. Geralmente, esta forma torna-se crônica (FAO, 2002; GIZAW, 2004).

2.1.8.4. Forma crônica

A forma crônica é a evolução natural tanto da forma aguda, como da forma subaguda (SCACCHIA et al., 2011). Muitos animais infectados desenvolvem formas crônicas ou mais leves da doença, que podem ser assintomáticas ou associadas a apenas a um leve aumento temporário da temperatura corporal, inapetência, caquexia, e alguma perda de condição física (GIZAW, 2004). Os animais podem se recuperar espontaneamente, mas muitas vezes ainda carregam o agente etiológico (FAO, 2002).

2.1.9. Lesões anatomopatológicas

2.1.9.1 Lesões macroscópicas

As lesões estão, geralmente, confinadas à cavidade torácica, exceto em bezerros, nos quais também ocorre inflamação das articulações cárpicas e társicas, por vezes com aumento e alteração do líquido sinovial (FAO, 2002; GIZAW, 2004; FAO, 2008).

Em animais naturalmente infectados, as lesões podem estar restritas ao tecido pulmonar, simplesmente devido ao modo de transmissão. A localização das lesões pulmonares é unilateral em 95% dos casos, podendo atingir tanto o pulmão direito quanto o pulmão esquerdo; muito raramente os dois pulmões são atingidos simultaneamente. Os lobos diafragmáticos são, frequentemente, os mais afetados (THIAUCOURT et al., 2004; ANON, 2012). Observa-se hepatização, que transforma a zona invadida em uma massa compacta pouco elástica, vermelha ou enegrecida. O pulmão chega a pesar de 20 a 30kg, com intenso edema (RERREIRA e RERREIRA, 1999; FAO, 2004; COUTO, 2014).

Frequentemente, observa-se uma intensa inflamação extensiva do pulmão e pleuras associadas. Na fase aguda, verifica-se exsudação pleural exuberante, de cor amarelo-acastanhada, contendo, por vezes, fragmentos de fibrina, podendo atingir volumes de até 30 litros. Este fluido é o material de eleição para o diagnóstico (FERNANDES, 2010; PENRITH e THIAUCOURT, 2015). Observa-se, ainda, depósitos fibrino-caseosos espessos nas pleuras, semelhantes a “omeletes” (THIAUCOURT et al., 2004; FAO, 2008). O líquido com fibrina e a

pleurite fibrinosa são um sinal patognomônico da PPCB. Outra lesão característica da doença é o pulmão com aspecto marmoreado na superfície de corte, resultante dos diferentes estágios da hepatização dos lóbulos pulmonares. Os septos interlobulares encontram-se distendidos pela presença de um fluido seroso, de cor âmbar, localizado dentro e ao redor dos vasos linfáticos dilatados (FAO 1997; FAO, 2008; ANON, 2012).

Na fase crônica, raramente se encontra fluido na cavidade pleural (LAAK, 1992). Os folhetos parietais e viscerais apresentam-se espessados e aderentes à parede da cavidade torácica (COUTO, 2014). Quando a cavidade torácica é aberta, partes do tecido pulmonar permanecem aderidos à parede torácica. A lesão mais característica desta fase é o “sequestro”, caracterizado por uma área de necrose com diâmetro variando entre 1 e 30 cm, separado do tecido circundante por uma cápsula fibrosa que pode atingir 1 cm de espessura. O sequestro pulmonar é causado por necrose de uma parte do pulmão, com subsequente encapsulamento. Um sequestro pode permanecer infectado por anos, mesmo após o animal ter se recuperado clinicamente. Quando a cápsula se rompe, o conteúdo infeccioso pode vir para o exterior através das vias respiratórias, sendo liberado pela tosse como gotículas contaminantes (CARVALHO, 2008; COUTO, 2014). Lesões adicionais incluem pericardite exsudativa, peritonite, artrite ou bursite (LAAK, 1992). Os linfonodos brônquicos e mediastínicos podem apresentar-se com edema fibrinoso, além de focos necróticos de até 4 cm de diâmetro, podendo a transição entre o córtex e a medula tornar-se indistinguível (THIAUCOURT et al., 2004; FAO, 2008).

2.1.9.2 Lesões microscópicas

Na fase inicial da doença, observa-se infiltrado celular constituído por neutrófilos no tecido conjuntivo circundante e nos vasos. A arquitetura da parede do vaso é, multifocalmente, rodeada por células inflamatórias (vasculite), especialmente no entorno das arteríolas (MBULU et al., 2004; COUTO, 2014). Os septos interlobulares são marcadamente dilatados pela presença de intenso edema, fibrina e detritos necróticos (necrose septal), infiltrados por um grande número de neutrófilos degenerados, pouco macrófagos e neutrófilos viáveis, ou são expandidos por linfócitos e histiócitos (DONE et al., 1995; KARAM, 2005; PILO et al., 2007). Os septos interlobulares, brônquios e os bronquíolos são rodeados por numerosos linfócitos e plasmócitos (hiperplasia linfoide). Brônquios e bronquíolos são preenchidos, multifocalmente, por edema, fibrina e infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos e histiócitos) (GAVRISH, 2003; PILO

et al., 2007). Os espaços alveolares contêm edema, infiltrado celular (neutrófilos viáveis e degenerados, plasmócitos, histiócitos e linfócitos), fibrina e detritos necróticos abundantes. Múltiplos alvéolos são expandidos por espaço livre (enfisema) (GIZAW, 2004; PILO et al., 2007).

Nas lesões pulmonares agudas, os neutrófilos são a população celular predominante. Nas lesões crônicas, são detectadas diferentes subpopulações de linfócitos, sugerindo a existência de uma resposta imunológica celular (TOTTE et al., 2008). Na histopatologia, os focos de organização perivascular são a principal lesão da PPCB. Estes focos resultam da organização dos exsudados a partir das ramificações das veias pulmonares e das artérias brônquicas (MBULU et al., 2004; COUTO, 2014).

2.1.10. Diagnóstico

O diagnóstico da PPCB é realizado em função dos dados epidemiológicos, sinais clínicos, quadro lesional e isolamento laboratorial. A PPCB é uma doença difícil de diagnosticar com base unicamente em sintomas clínicos, já que podem ser muitas as causas de pneumonia grave em bovinos (FAO, 2008; COUTO, 2014).

Os exames laboratoriais, combinados com os exames anatomopatológicos, são indispensáveis para a confirmação do diagnóstico (AMES, 2006). O sucesso do diagnóstico laboratorial depende da qualidade das amostras coletadas, assim como da sensibilidade de cada método adotado, uma vez que a quantidade do agente infeccioso varia de acordo com a fase da doença e se os animais foram submetidos a algum tratamento prévio com agentes antimicrobianos (PENRITH, 2014). Para os testes laboratoriais a partir de animais vivos, as amostras normalmente utilizadas para a confirmação do agente etiológico são suabe nasal e líquido pleural obtido por punção torácica (AMES, 2006). As amostras obtidas na necropsia são amostras de lesões de pulmão, colhidas na interface entre o tecido normal e lesionado, assim como linfonodos regionais e líquido sinovial de bezerros com artrite (PENRITH, 2014).

A OIE descreve os testes que estão disponíveis para o diagnóstico da PPCB, os quais incluem o cultivo bacteriano, testes imunológicos para detectar o antígeno e testes moleculares para detecção do ácido nucleico. Uma vez que as culturas típicas do microrganismo tenham sido obtidas, as mesmas podem ser confirmadas como *MmmSC* por testes imunológicos ou moleculares (PCR). Estes ensaios também podem ser usados para testar amostras colhidas a

campo, com grande sensibilidade. Os testes sorológicos preconizados pela OIE para fins de exportação de bovinos são os testes de fixação do complemento (TFC) e ELISA competitivo (c-ELISA) (OIE, 2008).

A identificação e caracterização de fragmentos dos ácidos nucleicos específicos dos agentes infecciosos por PCR representa uma parte importante da pesquisa no campo da biologia molecular (DEDIEU, 1994; OIE, 2008). O desenvolvimento do método de PCR representou uma melhoria significativa no diagnóstico da PPCB, sendo o exame de escolha devido à sua alta sensibilidade e especificidade. No entanto, este método apresenta algumas desvantagens que limitam o seu uso em alguns laboratórios, como o alto custo associado aos equipamentos e reagentes necessários para a realização da técnica, assim como os cuidados de biossegurança laboratorial para garantir um resultado fidedigno. Portanto, as regras de trabalho definidas para esta técnica necessitam ser seguidas rigorosamente (DEDIEU, 1994).

O teste de immunoblotting, baseado na técnica de western immunoblotting, tem sido aplicado com sucesso na análise da resposta imunológica, sendo o teste imunológico mais específico e o mais sensível até agora descrito para a PPCB. O sorodiagnóstico da PPCB melhorou substancialmente, tendo em conta as limitações do teste de fixação do complemento em termos de sensibilidade e especificidade em determinadas fases da doença (MBULU et al., 2004; AMES, 2006).

Outros testes têm sido desenvolvidos para detectar *MmmSC* a campo, estes incluem um teste de soroaglutinação (SAT) e um teste de aglutinação em látex (LAT) que, de acordo com o manual da OIE, é mais fácil de interpretar (PENRITH, 2014). Estes testes detectam anticorpos do *MmmSC* na fase aguda da enfermidade e são testes de sensibilidade relativamente baixa (MAIR et al., 2013).

2.1.11. Controle e prevenção

Os métodos adotados para o controle da PPCB são determinados pela situação epidemiológica específica, pelos sistemas de criação e produção animal e pela disponibilidade e eficiência dos serviços veterinários de cada país. A OIE apresenta as diretrizes que os países devem cumprir para que possam ser declarados livres da PPCB, assim como os cuidados a ter nas importações de modo a evitar a introdução da doença (THIAUCOURT et al., 2004; OIE, 2008). Na África, tem-se utilizado a vacinação para controlar a doença nas zonas endêmicas, o

que não tem dado resultados satisfatórios. A medida mais bem-sucedida deve ser aplicada em conjunto com a política de abate compulsório dos animais infectados ou expostos, incluindo o controle rigoroso da movimentação dos animais. Por uma variedade de fatores, incluindo socioeconômicos, geográficos e práticas de manejo, o controle da movimentação do gado não é praticável na maior parte dos países africanos; consequentemente, a opção mais realista continua a ser a vacinação em massa (THIAUCOURT et al., 2004).

As vacinas atualmente utilizadas na África são constituídas pela estirpe T1/44 ou a sua derivada resistente à estreptomicina, T1sr, ambas atenuadas e aplicadas na extremidade da cauda, via subcutânea. A estirpe T1sr foi desenvolvida para poder ser combinada com a vacina para a peste bovina (MBULU et al., 2004; OIE, 2008). A estirpe vacinal T1/44 apresenta como principais desvantagens a curta duração da proteção (cerca de oito meses), baixa eficácia, reações adversas (extenso edema no local da inoculação) e dependência da manutenção de uma cadeia de frio adequado. A perda da eficácia observada nos últimos anos parece ser devida a deficiências na reconstituição, no armazenamento ou na administração da vacina. Por outro lado, a utilização de apenas uma estirpe vacinal, durante mais de quarenta anos no continente africano também pode ter influenciado para uma menor eficiência vacinal (MBULU et al., 2004; OIE, 2008). A incapacidade das atuais vacinas de controlarem a doença na África representa um sério problema, uma vez que poucas estratégias alternativas estão disponíveis para desenvolvimento de outras vacinas (MBULU et al., 2004).

Uma primeira vacinação induz uma taxa de proteção de 40 a 60% e a duração da imunidade (seis a doze meses) é maior com a estirpe T1/44 do que com a estirpe T1sr, a qual, por sua vez, causa menos reações adversas. A revacinação após um ano aumenta o nível de proteção para 80-95%, independentemente da estirpe (THIAUCOURT et al., 2004).

As vacinas com complexos imunoestimulantes, com conjugados de polissacarídeo capsular e a inoculação do microrganismo inativado já foram experimentadas na África, mas com pouco sucesso aparente, apesar do interesse científico destas novas tecnologias. O principal motivo para o insucesso destas vacinas é o fato de que os mecanismos básicos desta doença ainda não foram totalmente compreendidos. Ainda, também não são conhecidas as contribuições relativas do *Mycoplasma* e da resposta imunológica do hospedeiro no desenvolvimento das lesões (MBULU et al., 2004). Os objetivos de uma vacina eficaz para a PPCB seriam limitar a colonização por *MmmSC*, controlar a imunossupressão induzida pelo agente e estimular uma resposta imunológica de memória específica contra o *MmmSC* (DEDIEU e ENGELMANN, 2008). Foi proposto que as vacinas de subunidades mucosas seriam provavelmente a melhor opção, uma vez que a IgA parece ser importante para mitigar

os efeitos da infecção. No entanto, é evidente que as vacinas de nova geração ainda estão longe de estar disponíveis. Algumas vacinas testadas em bovinos, aparentemente, aumentaram os efeitos patogênicos de *MmmSC* (PENRITH, 2014).

O controle da PPCB na África foi restringido por vários fatores, incluindo a deterioração na qualidade dos serviços veterinários, falta de recursos financeiros para montar programas de controle sustentado e movimento de gado não controlado entre os países. Atualmente, os programas de controle da PPCB sofrem com a falta de apoio financeiro, o que resultou na disseminação gradual da doença em grande parte do continente africano (OIE, 2008). Para controlar e, eventualmente, erradicar a PPCB neste continente, seria útil a disponibilização de vacinas otimizadas, juntamente com sistemas de vigilância eficientes e um rigoroso controle da movimentação dos animais (DEDIEU e GOMES, 2008). O problema fundamental consiste em determinar quando e como aplicar estas medidas, já que o sucesso da erradicação da PPCB envolve custos com vacinação, quarentena e controle da movimentação animal (OIE, 2008). O sacrifício total de animais em áreas endêmicas seria outro método a ser usado para o controle e erradicação da PPCB. No entanto, este método não seria uma alternativa viável na maioria dos países africanos, principalmente devido aos efeitos socioeconômicos envolvidos associados aos elevados custos e a resistência dos proprietários na adoção desta política de controle. Assim, este método seria recomendável apenas quando no surgimento de focos em países considerados livres da doença ou, ainda, na fase final de erradicação da doença em uma determinada região, depois de diminuir substancialmente sua incidência (NKANDO et al., 2012).

Para analisar o conhecimento atual sobre a dinâmica da doença no continente, a FAO, juntamente com a OIE, AU-IBAR e a Divisão Conjunta FAO / AIEA de Técnicas Nucleares em Alimentação e Agricultura, convocaram uma reunião técnica para oferecer uma oportunidade para especialistas trocarem novas ideias e informações técnicas sobre o controle da PPCB, assim como assessorar na viabilidade para a erradicação da doença em grande parte no continente africano. A reunião do grupo consultivo sobre a PPCB foi realizada em Roma (Itália), em novembro de 2006, com o objetivo de fornecer uma plataforma para interações sobre o uso de antibióticos no tratamento da PPCB e informações técnicas disponíveis sobre o assunto. Esta consulta foi seguida por uma consulta regional em novembro de 2013, em Dakar, Senegal, na qual especialistas e representantes de 12 países infectados se reuniram para estabelecerem uma estratégia coletiva de controle da doença em diferentes contextos epidemiológicos em África, usando o conhecimento e a experiência de países afetados e em risco (OIE, 2014).

Por exemplo, para que Portugal fosse reconhecido pela OIE como país livre de PPCB, em maio de 2003, foi necessário um grande esforço por parte de todas as entidades envolvidas no plano de erradicação. A vigilância foi baseada em testes de sorologia e inspeção post-mortem do abate de animais (REGALLA et al., 1996, OIE, 2014). Em 1993, foi conduzido um rastreio sorológico nacional, utilizando o teste de fixação do complemento (TFC), para se conhecer a incidência e prevalência da PPCB. Após várias pesquisas, foram implementados programas de erradicação que foram desenvolvidos e adaptados de acordo com a progressão epidemiológica da doença (GAVRISH, 2003; CARVALHO, 2008). Desde 2003, que a epidemiovigilância da doença consiste no rastreio sorológico aleatório e obrigatório para, pelo menos, 10% do efetivo de bovinos com mais de seis meses de idade. O teste sorológico oficial é o TFC e todos os soros reagentes são submetidos ao teste de imunoblotting. Com a redução da prevalência, a elevada especificidade do TFC tornou-se crítica, surgindo mais resultados falso-positivos. Assim, desde 1998, o teste de imunoblotting, que apresenta especificidade superior ao TFC, foi introduzido para confirmação de casos positivos ao TFC. Em complemento da sorovigilância, outros dois sistemas foram desenvolvidos: a inspeção ao abate para detectar lesões pulmonares suspeitas de PPCB e a vigilância de casos clínicos suspeitos na criação (MBULU et al., 2004; AMANFU, 2006). Isso poderia ser usado no desenho de estratégias de prevenção e gerenciamento de risco para surtos de PPCB na África, com o objetivo de controlar a doença em áreas endêmicas, e até mesmo eliminá-la em alguns países, sub-regiões ou, possivelmente, sistemas de produção, interrompendo sua propagação por todo o continente.

A OIE proíbe o tratamento dos animais infectados, uma vez que a administração de antibióticos associados com prednisolona melhora sensivelmente o quadro clínico, porém não conduzem a uma cura etiológica do processo. Uma vez que o *Mycoplasma* se aloja nas zonas de sequestro pulmonar durante vários anos, o que permite o surgimento de novos surtos, poucos fármacos são eficazes contra o *MmmSC* e, alguns destes, por exemplo a Ciprofloxacina, não são recomendados para utilização em animais de produção devido seu potencial no desenvolvimento de resistência antimicrobiana em seres humanos (NICHOLAS et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os achados anatomopatológicos e imunohistoquímicos da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) em animais abatidos na cidade de Huambo, Angola.

.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Identificar as lesões anatomopatológicas compatíveis com a PPCB, em pulmões e linfonodos regionais dos bovinos abatidos;
- 3.2.2. Detectar o agente etiológico da PPCB, por PCR qualitativo, em amostras de pulmão dos bovinos abatidos;
- 3.2.3. Associar as lesões anatomopatológicas com o diagnóstico molecular da PPCB nos bovinos abatidos;
- 3.2.4. Estabelecer a resposta imunológica associadas a infecção respiratória da PPCB, por imunohistoquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E LOCAL DE ESTUDO

Para a realização do presente trabalho, foram colhidas amostras biológicas de 50 bovinos de raça autóctone (SRD), com diferentes idades e pesos, oriundos dos abatedouros Ombelela e Vanda & Mateus (Ex-Dinadrope). O primeiro local está localizado no bairro de Calobrinco, Comuna de Xavier Samacau, a 3 km do centro da cidade do Município de Huambo – Angola; o segundo, localizado no bairro da Chiva, na Comuna Comandante Vilinga, na estrada principal que dá acesso a zona industrial da Cuca e a Faculdade de Ciências Agrárias, a cerca de 6 km do centro da cidade do Município de Huambo – Angola. Os bovinos abatidos nestes abatedouros são provenientes da Província do Huambo – município da Caála (comuna da Calenga) e da Província da Huíla – município da Matala, em Angola, África. As coletas foram realizadas no período de Outubro a Dezembro de 2016, no qual foram abatidos um total de 450 bovinos.

A coleta do material biológico foi autorizada pelos órgãos sanitários competentes do país (Departamento Provincial do Instituto dos Serviços de Veterinária (DPISV) da Província do Huambo), assim como pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA nº 435904216).

4.2 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

4.2.1 Análise macroscópica

Foram analisados os pulmões, pleuras, cavidade torácica e linfonodos regionais (mediastínicos e traqueobrônquicos) de bovinos com lesões patológicas compatíveis com a PPCB, tais como presença de aderência, líquido livre, fibrina, edema, pleurite, pulmão marmoreado e sequestro (FAO, 2008, PILO et al., 2015). A análise macroscópica consistiu na avaliação visual e fotográfica completa de todos os lobos pulmonares e linfonodos regionais

dos bovinos que estavam sendo abatidos, avaliando o aspecto geral, tamanho, coloração e demais alterações patológicas, assim como sua localização anatômica no pulmão.

4.2.2 Análise microscópica

Após a identificação dos casos com lesões macroscópicas sugestivas da PPCB, fragmentos de tecido dos pulmões e linfonodos foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%, durante 24 a 48 horas, para posterior processamento histológico (PIRES et al., 2002; MOURA et al., 2015). Após fixação, as amostras teciduais foram aparadas, colocadas em cassetes histológicos e processadas no Laboratório de Patologia do Hospital Central do Huambo, Angola. Realizou-se a histotécnica de desidratação, diafanização, emblocagem em parafina (MICHALANY, 1990) (Quadro 1).

Quadro 1 – Protocolo para o processamento histológico das amostras teciduais

REAGENTES	TEMPO
Álcool 70%	1 h
Álcool 95%	1 h
Álcool 100%	1 h
Álcool 100%	1 h
Álcool 100%	1 h
Álcool 100%	1 h
Álcool 100%	1 h
Xilol I	1 h
Xilol II	1 h
Xilol III	2 h
Parafina I	4 h
Parafina II	4 h
Por fim, o material foi emblocado nos moldes com parafina em temperatura de 75°C	

A preparação dos cortes histológicos foi realizada no Departamento de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz, as quais foram coradas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Os cortes de 3 µm foram estendidos em banho-maria (45°C) e colocados sobre lâminas de vidro histológicas. Em seguida, colocou-se a lâmina em estufa 60°C por 2 h. Para a coloração das lâminas pelo método de hematoxilina e eosina (H&E), os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em álcoois, colorados, desidratação em álcoois e diafanizados em xilol (Quadro 2). Para a montagem das lâminas, empregou-se a resina sintética Entellan (Merck®). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus CX22LED), em aumento de 100×. As lesões pulmonares avaliadas microscopicamente foram hiperplasia linfóide, edema, fibrina, pleurite, broncopneumonia, dilatação dos septos, vasculite, enfisema, necrose, fibrose e congestão.

Quadro 2 - Protocolo de coloração das lâminas pelo método de Hematoxilina & Eosina

REAGENTES	TEMPO
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Xilol III	10 min
Álcool 100%	3 min
Álcool 95%	3 min
Álcool 70%	3 min
Água corrente	3 min
Hematoxilina	6 min
Água corrente	Tirar excesso
Álcool Ácido	Rápido
Água corrente	10 min
Eosina	1 min
Álcool 95%	Rápido
Álcool absoluto I	2 min
Álcool absoluto II	3 min
Álcool + Xilol	3 min
Xilol diafinização	3 min
Xilol montagem	
Montagem das lâminas e lamínula com resina sintética Entellan (Merck®).	

4.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR

4.3.1 Processamento do material parafinado para extração de DNA

Durante os cortes dos blocos de parafina contendo o tecido pulmonar, foram seguidas instruções rígidas para evitar a contaminação cruzada das amostras que seriam utilizadas para a extração de DNA e, posteriormente, realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional (PCR qualitativo) (GREER, WHEELER e MANOS, 1994). Desta maneira, foi realizada a limpeza rigorosa no micrótomo, na lâmina de corte do micrótomo e qualquer outro material usado, além da limpeza da superfície de cada bloco com álcool 70%, descartando sempre os primeiros cortes (GREER, WHEELER e MANOS, 1994). Para a extração de DNA do cada material parafinado, foram realizados 8 cortes de 10 µm cada, sendo armazenados à -80°C em *ependorf* de 1,5 ml, até o momento da extração.

4.3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido segundo o protocolo do kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, EUA), com todos os reagentes pertencentes ao kit. Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados pela incubação em óleo mineral, durante 1 min a 80°C. Após, as amostras foram submetidas a lise celular pela incubação em tampão de digestão, contendo (20 µl) de proteinase K, durante 1 h a 56°C, seguida de nova incubação por 4 h a 80°C. Posteriormente, o material foi tratado com RNase, adicionado tampão de ligação e etanol P.A. (para biologia molecular), sendo então centrifugado a 10.000 rpm, por 15 seg. Então, a fase aquosa foi transferida para colunas de sílica, lavada com tampão de lavagem 1x (Wash Buffer) e, finalmente, o DNA capturado pela coluna foi recuperado em tampão de eluição após centrifugação a 16.000 rpm, por 1 min. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C, até o momento do uso. A pureza e a quantificação do DNA total extraído foi avaliada por espectrofotômetro (Nanoespectrofotometro-DS-11DeNaVix, EUA).

4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional (PCR qualitativo)

A PCR para a identificação do agente etiológico nas 50 amostras do tecido pulmonar parafinado de animais com lesões compatíveis com a PPCB foi realizada no Laboratório de *Mycoplasma* do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Inicialmente, foi realizada PCR para amplificação de um gene endógeno do tecido bovino, para avaliar a quantidade e qualidade do DNA extraído do material parafinado. Na sequência, foi realizada a PCR para a detecção de microrganismos da classe *Mollicutes* e, posteriormente, comprovação da espécie *Mycoplasma mycoides mycoides* SC (*MmmSC*), também por PCR. Como controles positivos para os testes moleculares, foram utilizados o DNA extraído de cepas de referência de *Mycoplasma bovis* e *MmmSC*, ambas obtidas da coleção do laboratório de *Mycoplasma* do Departamento de Microbiologia do ICB-USP.

4.3.3.1 PCR para o controle interno bovino

Como controle interno da quantidade e qualidade do DNA extraído a partir do tecido parafinado, foi avaliada a detecção do gene 12S RNAr, utilizando-se o conjunto de *primers* **12SFW** (5'AAAGGACTTGGCGGTGCTT3') e **12SMR2** (5'GGGTTTGCTGAAGATGGCG-3') (Quadro 3) (CALLEJA et al., 2005b). Como controle positivo da reação, utilizou-se o DNA extraído de células Hela. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Bio-Rad, EUA), para um volume final de 25 µl, contendo: 2,5 µl de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4), 1,0 µl de MgCl₂ (50 mM), 4,0 µl dNTPs (1,0 mM), 0,4 µl de cada *primer* (50 pmol), 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (1,0 U) (Invitrogen, Life Technologies, EUA). Para amplificação, inicialmente as amostras foram incubadas a 95°C por 5 min para a desnaturação, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg; e uma extensão final de 72°C por 10 min. O produto de amplificação do gene 12S RNAr é de 119 bp. Para a observação dos amplicons, preparou-se um gel de agarose a 1,5% e 10 µl do produto amplificado foi submetido a eletroforese durante 50 minutos, a 100 V. Os produtos foram analisados e visualizados sob luz ultravioleta após a adição de 0,5 mg/mL de brometo de etídio. Em cada gel foram adicionados 2,5 µl do marcador de peso molecular Ladder (Invitrogen, Life Technologies, EUA).

4.3.3.2 PCR para identificação de microrganismos da classe *Mollicutes*

As amostras positivas na PCR para o controle endógeno bovino foram submetidas ao PCR qualitativo para a detecção de microrganismos pertencentes a classe *Mollicutes*, utilizando o gene ribossômico (16s RNAr) como método de triagem. Para a reação, foram utilizados os *primers* **MGSO** (5´TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC3´) e **GPO3** (5´GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3´) (VAN KUPPEVELD et al., 1992) (Quadro 3). A reação de PCR foi realizada em termociclador (Bio-Rad, USA), para um volume final de 25 µl contendo: 2,5 µl de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4) 1,0 µl de MgCl₂, (50 mM), 4,0 µl de dNTPs (1,0 mM), 0,4 µl de cada *primer* (50 pmol) e 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (1,0 U) (Invitrogen, Life Technologies, EUA). Para amplificação, inicialmente as amostras foram incubadas a 94°C por 5 min para a desnaturação, seguido por 34 ciclos de 94°C por 30 seg, 57,7°C por 30 seg e 72°C por 30 seg; e uma extensão final de 72°C por 10 min. O produto de amplificação do gene 16s RNAr é de 270 bp. Para a observação dos amplicons, preparou-se um gel de agarose a 1,5% e 10 µl do produto amplificado foi submetido a eletroforese durante 50 minutos, a 100 V. Os produtos foram analisados e visualizados sob luz ultravioleta após a adição de 0,5 mg/mL de brometo de etídio. Em cada gel foram adicionados 2,5 µl do marcador de peso molecular Ladder (Invitrogen, Life Technologies, EUA)

4.3.3.3 PCR para o agente *Mycoplasma mycoides mycoides* Small Colony (*MmmSC*)

As amostras positivas na PCR qualitativa para os microrganismos da classe *Mollicutes*, foram submetidas a mesma técnica para a detecção do *MmmSC*, utilizando os *primer* **MSC1** (5'-ATACTTCTGTTCTAGTAATATG3') e **MSC2** (5'CTGATTATGATGACAGTGGTCA-5') (Tabela 1) (DEDIEU,1994). A reação de PCR foi realizada em termociclador (Bio-Rad, EUA), para um volume final de 25 µl. Os parâmetros da reação foram: 2,5 µl de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4), 0,75 µl de MgCl₂, 4,0 µl de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (1,0 U) (Invitrogen, Life Technologies, EUA). Para amplificação, inicialmente as amostras foram incubadas a 94°C por 5 min para a desnaturação, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min; e

uma extensão final de 72°C por 5 min. O produto de amplificação do gene 16s RNAr é de 275 bp. Para a observação dos amplicons, preparou-se um gel de agarose a 1,5% e 10 µl do produto amplificado foi submetido a eletroforese durante 50 minutos, a 100 V. Os produtos foram analisados e visualizados sob luz ultravioleta após a adição de 0,5 mg/mL de brometo de etídio. Em cada gel foram adicionados 2,5 µl do marcador de peso molecular Ladder (Invitrogen, Life Technologies, EUA).

Quadro 3 - Conjunto de *primers* utilizados nas reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Primer	Sequência	Produto	Referências
12SFW 12SMR2	5'-AAAGGACTTGGCGGTGCTT-3' 5'-GGGTTTGCTGAAGATGGCG-3'	119pb	CALLEJA et al., 2006
MGSO GPO3	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	270pb	VAN KUPPEVELD et al., 1992
MSC1 MSC2	5'-ATACTTCTGTTCTAGTAATATG-3' 5'-CTGATTATGATGACAGTGGTCA-5'	275pb	DEDIEU et al., 1994

4.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica de imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz. Foi aplicada a técnica de detecção por Polímero HRP EasyLink one (EP-12-20501, Easypath Diagnósticos, EUA). Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram depositados em lâminas histológicas silanizadas e, em seguida, permaneceram em estufa a 60°C por 4 horas para melhor fixação do tecido à lâmina. Após este procedimento, foram submetidos aos processos de desparafinização, hidratação em soluções decrescentes de álcool até imersão em água destilada. Após, os cortes foram tratados com tampão citrato (pH 6,0), previamente aquecido a 95°C, em panela de pressão para a recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada em solução de peróxido de hidrogênio a 6% (Rioquímica, Brasil), por 30 minutos, a 37°C. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 3 minutos e banhadas em tampão fosfato-salina (PBS), com 3 trocas de 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas com as diluições indicadas dos anticorpos primários (Quadro 4), em câmara úmida, por 18 horas a 4°C. Cada anticorpo primário foi diluído em solução de 1% de albumina sérica

bovina (BSA) (Sigma, A9647, EUA). Após lavagens em PBS, a detecção dos antígenos foi realizada pelo sistema de Polímero (EasyLink one) por 1h30, em câmara húmida, a 37°C. Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução contendo 100 mg de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA), 100 µl de água oxigenada (H₂O₂), 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) em 100 ml de PBS. Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris, por 30 seg, desidratadas em banhos de álcool, clarificadas em banhos de xilol e montadas com Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha). Como controle positivo foi usado amostras de tecido de linfonodo de bovino. O controle negativo da técnica consistiu na substituição dos anticorpos primários pelo diluente do anticorpo, contendo BSA. A reação foi considerada positiva quando se visualizou a imunomarcacão castanho-dourada, ou negativa quando não foram observadas tais marcações. Todas as lâminas foram analisadas através de microscópio óptico (Olympus CX22LED), em aumento de 400×.

A avaliação imunohistoquímica das células linfocitárias foi realizada pelo percentual de células marcadas para os anticorpos CD3 e Pax5. Foram contadas as células positivas em 1000 células totais, as quais foram avaliadas em 10 campos de forma aleatória. A marcação foi considerada focal quando < de 10% das células eram positivas (PEDRERA et al., 2007; ALEXANDRE, 2008; GÓMEZ, 2012; RISALDE et al., 2014). A intensidade de marcação das interleucinas (IL-4 e IL-1β) nas células inflamatórias foi avaliada semiquantitativamente, pela observação em 10 campos em um microscópio óptico, em áreas com maior concentração de células imunomarcadas (*hotspots*). Cada amostra foi graduada de acordo com a média da intensidade obtida, considerando ausência de marcação (-); marcação fraca ou discreta (+); marcação moderada (++) e marcação intensa (+++) (KOCK et al, 2016).

Quadro 4 - Especificações dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica
Anti-Pax5 (Invitrogen-39-6800) (Monoclonal)	Invitrogen	1:200	Tampão citrato 10mM pH 6,0
Anti-CD3 (Dako-A0452) (Policlonal)	DakoCytomation	1:100	Tampão citrato 10mM pH 6,0
Anti-IL4 (LS-C165210) (Policlonal)	LSBio	1:400	Tampão citrato 10mM pH 6,0
Anti-IL1β (C165185-400) (Policlonal)	Abcam	1:150	Tampão citrato 10mM pH 6,0

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação anatomopatológica, foram determinadas as frequências das lesões macro e microscópicas de acordo com a localização nos pulmões (direito ou esquerdo), assim como nos lobos pulmonares (apical, mediastínicos, diafragmático direito ou esquerdo e acessórios); e de acordo com a ocorrência de duas ou mais lesões concomitantemente.

Após a determinação dos animais positivos e negativos com o exame de PCR para *MmmSC*, foram verificadas as associações entre a presença e localização da lesão e a sua positividade com o teste de qui-quadrado e a intensidade da associação com estimativa de odds-ratio e seu intervalo de confiança de 95%, considerando significativo quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

5.1.1 Análise macroscópica

A análise macroscópica foi realizada imediatamente após o abate de 50 bovinos em dois abatedouros de Huambo, Angola. Foram identificadas e caracterizadas as lesões macroscópicas compatíveis com a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (Tabela 1), atendendo aos critérios previamente estabelecidos (FAO, 2008). Macroscopicamente, observou-se a presença de aderência da pleura em 33/50 (66%) animais, na qual a pleura visceral e parietal estiveram aderidas à parede costal e intercostal da cavidade torácica da carcaça ou, em alguns casos, pela presença de fragmentos do pulmão aderidos as costelas e com focos de fibrina (Figura 5A). Na sequência, observou-se a presença de fibrina em 14/50 (28%) casos e edema em 13/50 (26%) casos. Ainda, foi observado intensa pleurite em 9/50 (18%) casos, caracterizada pela presença de fibrina na pleura (Figura 5B). O pulmão marmoreado foi observado em 6/50 (12%) animais, no qual os septos interlobular dos pulmões estavam dilatados, apresentando focos de pneumonia nos diversos lóbulos (Figura 5C). Em 6/50 (12%) animais, observou-se o sequestro pulmonar, caracterizado pela presença de uma massa de aspecto consistente no seu interior, delimitada por uma capsula fibrosa (Figura 5D).

Dentre as 50 amostras avaliadas nesse estudo, as lesões estavam situadas de forma unilateral, ou seja, atingindo quer o pulmão direito quer o esquerdo. No entanto, o exame revelou o predomínio das lesões localizadas no pulmão esquerdo (30/50; 60%), enquanto que em 20/50 (40%) casos estavam localizadas no pulmão direito. Diversos lobos pulmonares (mediastínico, apical, mediastínico e acessórios) foram atingidos, sendo com maior frequência o lobo diafragmático esquerdo (30/50; 60%) (Tabela2).

Tabela 1: Frequências das lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB e da localização anatômica nos pulmões – São Paulo, 2018

	Número de animais*	%*
Lesão macroscópica		
Aderência	33	66,0%
Fibrina	14	28,0%
Edema	13	26,0%
Pulmão marmoreado	6	12,0%
Sequestro	6	12,0%
Pleurite	9	18,0%
Aderência e fibrina	5	10,0%
Pleurite e fibrina	4	8,0%
Pulmão marmoreado e fibrina	4	8,0%
Pulmão marmoreado e edema	2	4,0%
Localização		
Pulmão esquerdo	30	60,0%
Pulmão direito	20	40,0%
Lobo pulmonar apical esquerdo	4	8,0%
Lobo pulmonar apical direito	1	2,0%
Lobo pulmonar mediastínico esquerdo	12	24,0%
Lobo pulmonar mediastínico direito	5	10,0%
Lobo pulmonar diafragmático esquerdo	30	60,0%
Lobo pulmonar diafragmático direito	20	40,0%
Lobos pulmonares acessórios	2	4,0%

*as frequências somam mais de 100% devido à presença de lesões concomitantes, assim como o número de animais somam mais de 50 animais.

A avaliação dos linfonodos mediastínicos e traqueobrônquicos nos animais com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB revelou aumento de volume por hiperplasia do tecido linfoide (linfadenite) em 42/50 (84%) animais, a qual foi mantida sob tensão pela cápsula. Ao corte, observaram-se áreas congestionadas/hemorrágicas e com edema em 12/50 (24%) animais (Figuras 6A-B).

Figura 5 – Fotomacrografia, Pulmão Bovino. Lesões compatíveis com a PPCB

Fonte (ALEXANDRE, 2016)

(A) Aderência da pleura visceral e parietal nas costelas, com presença marcante de fibrina. (B) Pulmão direito, pleurite com depósito de fibrina na superfície. (C) Pulmão marmoreado, superfície de corte é marmoreada, com a presença de septos interlobular dilatados. (D) Presença de sequestro no lobo diafragmático, envolvida por capsula fibrosa.

Figura 6 - Fotomacrografia dos linfonodos regionais de animais com lesões compatíveis com a PPCB

(ALEXANDRE, 2016)

(A) Linfonodo mediastínicos, Linfadenite. (B) Área medular e cortical com edema e focos congestivos-hemorrágicos.

5.1.2 Análise microscópica

Foram processadas amostras de pulmão e linfonodos para a análise histopatológica dos 50 animais com lesões macroscópicas compatíveis com a CBPP (Tabela 2), a qual revelou a presença de nódulos linfóides dispersos no parênquima pulmonar (hiperplasia linfóide) em 23/50 (46%) casos (Figura 7A), presença de fibrina em 8/50 (16%) casos e congestão em 25/50 (50%) casos. Foram observadas áreas de fibrose e edema (Figuras 7B-C), individualmente, em 9/50 (18%), necrose em 3/50 (6%) casos (Figura 7D), vasculite em 2/50 (4%) casos (Figura 7E) e enfisema em 17/50 (34%) casos. Ainda, foram observados 7/50 (14%) casos de broncopneumonia fibrinosa, com predomínio de infiltrado celular de neutrófilos (Figura 7F), bronquiolite em 2/50 (4%) casos (Figura 7G), além de dilatação dos septos interlobulares pela presença de exsudato inflamatório e edema (Figura 7H). Em relação à pleura, observou-se pleurite fibrinosa em 11/50 (22%) casos, assim como espessamento da pleura (Figuras 8A-B).

Tabela 2 – Frequências das lesões histopatológicas pulmonares nos animais – São Paulo, 2018

Lesão microscópica	Número de animais*	%*
Hiperplasia linfóide	23	46,0%
Edema	9	18,0%
Fibrina	8	16,0%
Pleurite fibrinosa	11	22,0%
Broncopneumonia	7	14,0%
Dilatação dos septos	8	16,0%
Bronquiolite	2	4,0%
Vasculite	2	4,0%
Enfisema	17	34,0%
Necrose	3	6,0%
Fibrose	9	18,0%
Congestão	25	50,0%
Hiperplasia e enfisema	2	4,0%
Hiperplasia e congestão	2	4,0%
Hiperplasia e fibrose	2	4,0%

Edema e fibrina	1	2,0%
Pleurite e fibrose	1	2,0%
Pleurite e congestão	1	2,0%
Broncopneumonia e dilatação dos septos	1	2,0%
Dilatação dos septos e fibrose	1	2,0%
Enfisema e congestão	1	2,0%
Sem lesões	1	2,0%

*as frequências somam mais de 100% devido à presença de lesões concomitantes, assim como o número de animais somam mais de 50 animais.

Figura 7 - Fotomicrografias de corte histológico do pulmão de bovinos com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB

Fonte (ALEXANDRE, 2017)

(A) Pulmão apresentando hiperplasia linfóide peribronquiolar. (B) Hiperplasia linfóide intersticial e presença de fibrose que se prolonga no espaço intersticial (C) Parênquima pulmonar com presença de

edema. **(D)** Presença de necrose intensa no parênquima pulmonar. **(E)** Vasculite - infiltrado inflamatório ao redor do vaso. **(F)** Broncopneumonia - pulmão com infiltrado inflamatório intersticial composto de neutrófilos e eosinófilos dentro do espaço intersticial do pulmão e presença de fibrina nos alvéolos **(G)** Bronquiolite - presença de exsudato muco celular no interior dos bronquíolos. **(H)** Septos alveolares espessados com inflamação mista, intersticial nos septos alveolares e no espaço intersticial. **H&E** (100×).

Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão e pleura de bovinos com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB

Fonte (ALEXANDRE, 2017)

(A) Presença de pleurite fibrinosa. **(B)** espessamento da pleura. **H&E** (100×).

Na análise microscópica dos linfonodos, observou-se hiperplasia paracortical e medular, com expansão e proliferação de linfócitos e imunoblastos, histiocitose medular e área de manto folicular estreita em todos os casos analisados (Figura 9)

Figura 9- Fotomicrografia dos linfonodos regionais de animais com lesões compatíveis com a PPCB.

Fonte (ALEXANDRE, 2017)

(A) Linfonodo mediastínico com hiperplasia paracortical e centros germinativos ativado. **(B)** Hiperplasia medular, histiocitose sinusoidal. **H&E** (100×)

5.2 DETECÇÃO DO AGENTE ETIOLOGICO DA PPCB

5.2.1 PCR para o controle positivo (gene endógeno bovino)

As amostras de tecido pulmonar dos 50 bovinos com diagnóstico macroscópico presuntivo de PPCB foram avaliadas, inicialmente, para a detecção do DNA genômico bovino e verificação da qualidade e quantidade de DNA viável nas amostras extraídas do material parafinado. Após a amplificação do gene endógeno 12S RNAr e eletroforese em gel de agarose, o amplicon de 119 pb foi visualizado em 43/50 (86%) amostras. Ou seja, não houve amplificação em 7 amostras de DNA extraídas do tecido parafinado, indicando sua baixa qualidade, as quais foram excluídas nas análises seguintes (Tabela 3).

5.2.2 PCR para detecção do *Mycoplasma mycoides mycoides* SC.

Após a seleção das amostras viáveis, realizou-se a PCR do gene ribossômico 16s RNAr para a triagem e detecção de microrganismos pertencentes a classe *Mollicutes*. Após a amplificação e eletroforese em gel de agarose, o amplicon de 270 pb foi visualizado em 16/43 (37,2%) amostras. Posteriormente, estas 16 amostras foram submetidas ao PCR para a amplificação dos dois iniciadores de oligonucleotídios (MSC1/MSC2), utilizados para determinar a subespécie destes microrganismos. Após a amplificação e eletroforese em gel de agarose, o amplicon de 275 pb foi visualizado nas mesmas 16 amostras positivas na primeira triagem, indicando serem o agente infeccioso *MmmSC* (Tabela 3 e Figura 10).

Tabela 3 - Análise dos resultados obtido com a técnica molecular – São Paulo, 2018

	PCR Endógeno	%	PCR <i>MmmSC</i>	%
Positivo	43	86	16	37,2
Negativo	7	14	27	62,8
Total	50	100	43	100

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após reação para amplificação do fragmento de 275 pb do genoma de *MmmSC*

Fonte (ALEXANDRE,2017)

PM: marcador de peso molecular de 100 pb. Colunas de 1 a 8: amostras de bovinos. C-: controle negativo da PCR; C+: controle positivo (cultura de *MmmSC*)

5.3 CORRELAÇÃO DOS ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS COM A DETECÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA PPCB

Dos 50 animais inicialmente analisados, 7 foram excluídos do estudo por não apresentarem DNA com qualidade suficiente para a realização da PCR. Posteriormente, a análise molecular do tecido pulmonar destes 43 bovinos demonstrou positividade para o agente etiológico da PPCB (*MmmSC*) em 16 animais, ou seja, 37,2% da população com material genético viável. Nestes animais positivos, a lesão macroscópica mais frequente foi a aderência, presente em 7/16 (43,8%) casos; enquanto a lesão microscópica mais frequente foi a hiperplasia linfóide, presente em 9/16 (56,2%) animais.

Quando avaliada a associação entre a presença da lesão macroscópica e a amostra ser positiva na PCR, houve associação significativa nos animais com pulmão marmoreado ($p=0,012$), aderência ($p=0,047$) e sequestro pulmonar ($p=0,001$). Os animais que apresentaram pulmão marmoreado, aderência e sequestro pulmonar tiveram, respectivamente, 11,82 vezes, 22,75 vezes e 0,27 vezes mais chances de serem positivos do que os animais que não tinham estas lesões. Em relação a localização das lesões nos pulmões, e seus respectivos lobos, não foi observada diferença estatística significativa (Tabela 4). Em relação aos achados microscópicos, houve associação significativa com a fibrose pulmonar ($p<0,05$). Ou seja, os animais que apresentaram fibrose tiveram 4,4 vezes mais chances de serem positivos do que os que não tinham esta lesão (Tabela 5).

Tabela 4 - Associação entre a presença e localização das lesões macroscópicas e a amostra ser positiva na PCR para *MmmSC*, pelo teste estatístico de qui-quadrado e odds-ratio. São Paulo, 2018

Lesão macroscópica	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total	OR (IC 95%)	P
Aderência					
Sim	7 (25,9)	20 (74,1)	27	0,27 (0,07 - 1,00)	0,047*
Não	9 (56,2)	7 (43,8)	16		
Fibrina					
Sim	6 (42,8)	8 (57,2)	14	1,32 (0,37 - 4,66)	0,663
Não	10 (34,5)	19 (65,5)	29		
Edema					
Sim	6 (54,5)	5 (45,5)	11	2,72 (0,71 - 10,41)	0,137
Não	10 (31,3)	22 (68,7)	32		
Marmoreado					
Sim	4 (80,0)	1 (20,0)	5	11,82 (1,23 - 113,23)	0,012*
Não	12 (28,9)	26 (71,1)	38		
Sequestro					
Sim	5 (83,6)	1 (16,4)	6	22,75 (1,42 - 213,72)	0,001*
Não	11 (29,8)	26 (70,2)	37		
Pleurite					
Sim	4 (44,4)	5 (55,6)	9	1,47 (0,33 - 6,51)	0,614
Não	12 (35,3)	22 (64,7)	34		
Lobo apical E					
Sim	1 (33,3)	2 (66,7)	3	0,83 (0,07 - 9,99)	0,885
Não	15 (37,5)	25 (62,5)	40		
Lobo Mediast. E					
Sim	4 (44,4)	5 (55,6)	9	1,40 (0,31 - 6,24)	0,658
Não	12 (36,4)	21 (63,6)	33		
Lobo Diafrag. E					
Sim	11 (42,3)	15 (57,7)	26	1,76 (0,48 - 6,47)	0,392
Não	5 (29,4)	12 (70,6)	17		
Lobo Apical D					
Sim	0 (0,0)	1 (100,0)	1	-	0,451
Não	15 (36,6)	26 (63,4)	41		
Lobo Mediast. D					
Sim	1 (33,3)	2 (66,7)	3	0,83 (0,07 - 9,99)	0,885
Não	15 (37,5)	25 (62,5)	40		
Lobo Diafrag. D					
Sim	5 (26,3)	14 (73,7)	19	0,42 (0,11 - 1,56)	0,189
Não	11 (45,8)	13 (54,2)	24		
Lobos Acessórios					
Sim	1 (100,0)	0 (0,0)	1	2,73 (1,83 - 4,09)	0,197
Não	15 (36,6)	26 (63,4)	41		
Pulmão direito					
Sim	5 (27,7)	13 (72,3)	18	1,40 (0,34 - 5,79)	0,642
Não	11 (31,2)	14 (68,8)	16		
Pulmão esquerdo					
Sim	11 (50,0)	11 (50,0)	22	3,20 (0,87 - 11,82)	0,076
Não	5 (23,8)	16 (76,2)	21		

Tabela 5 - Associação entre a presença de lesões microscópicas e a amostra ser positiva na PCR para *MmmSC*, pelo teste estatístico de qui-quadrado e odds-ratio. São Paulo, 2018

Lesão microscópica	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total	OR (IC 95%)	P
Hiperplasia					
Sim	10 (43,5)	13 (56,5)	23	1,91 (0,52 – 7,01)	0,327
Não	6 (30,0)	14 (70,0)	20		
Edema					
Sim	5 (62,5)	3 (37,5)	8	3,64 (0,73 – 18,00)	0,101
Não	11 (31,4)	24 (68,6)	35		
Fibrina					
Sim	5 (62,5)	3 (37,5)	8	3,64 (0,73 – 18,00)	0,101
Não	11 (31,4)	24 (68,6)	35		
Pleurite					
Sim	6 (46,2)	7 (53,8)	13	1,71 (0,45 – 6,47)	0,424
Não	10 (33,3)	20 (66,7)	30		
Broncopneumonia					
Sim	2 (40,0)	3 (60,0)	5	1,14 (0,17 – 7,69)	0,891
Não	14 (36,8)	24 (63,2)	38		
Dilatação Septos					
Sim	3 (33,3)	6 (66,7)	9	0,81 (0,17 – 3,80)	0,787
Não	13 (38,2)	21 (61,8)	34		
Bronquiolite					
Sim	1 (100,0)	0 (0,0)	1	-	0,189
Não	15 (35,7)	27 (64,3)	42		
Vasculite					
Sim	1 (100,0)	0 (0,0)	1	-	0,189
Não	15 (35,7)	27 (64,3)	42		
Enfisema					
Sim	7 (41,2)	10 (58,8)	17	1,32 (0,37 – 4,66)	0,663
Não	9 (34,6)	17 (65,4)	26		
Necrose					
Sim	2 (66,7)	1 (33,3)	3	3,71 (0,31 – 44,66)	0,274
Não	14 (35,0)	26 (65,0)	40		
Fibrose					
Sim	8 (61,5)	5 (38,5)	13	4,40 (1,12 – 17,48)	0,030*
Não	8 (26,7)	22 (73,3)	30		
Congestão					
Sim	8 (36,4)	14 (63,6)	22	0,81 (0,23 – 2,88)	0,747
Não	8 (38,1)	13 (61,9)	21		

5.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS E INTERLEUCINAS NO PULMÃO DE ANIMAIS COM PPCB

A técnica de imunohistoquímica foi realizada nas 16 amostras com lesões de PPCB e positivas pela PCR para o agente *MmmSC*. A detecção para as subpopulações de linfócitos B e T foi realizado pela identificação das células imunomarcadas para os anticorpos Pax5 e CD3, respectivamente. Foram identificadas células positivas em todas as amostras em ambos os marcadores, com distribuição no parênquima (septos interalveolares, epitélio alveolar, epitélio bronquiolar, peribronquiolar, intrabronquiolar e ao redor dos vasos sanguíneos), assim como na pleura (Figuras 11A-B). A imunomarcagem para linfócitos B foi focal em 14/16 (87,5%) casos e difusa em 2/16 (12,5%) casos, enquanto a imunomarcagem para linfócitos T foi difusa em apenas 1/16 (6,25%) caso. A média das células imunomarcadas foi de 3,7% para Pax5 e de 2,8% para o CD3 (Tabela 6).

Tabela 6 Avaliação quantitativa para células linfocitárias imunomarcadas em pulmão de bovinos com lesões da PPCB. São Paulo, 2018

Animal	Pax5		CD3	
	Total de células	%	Total de células	%
1	10	1,0	15	1,5
2	30	3,0	18	1,8
3	7	0,7	31	3,8
4	34	3,4	30	3,0
5	100	10	100	10
6	49	4,9	31	3,1
7	54	5,4	20	2,0
8	18	1,8	17	1,7
9	41	4,1	33	3,3
10	100	10	49	4,9
11	24	2,4	19	1,9
12	19	1,9	34	3,4
13	17	1,7	6	0,6
14	52	5,2	26	2,6
15	38	3,8	20	2,0
16	10	1,0	10	1,0
Média		3,7		2,8

Os tecidos pulmonares com lesões de PPCB também foram avaliados para determinar a imunoexpressão das IL-1 β e IL-4. As amostras de todos os animais com lesões da PPCB e positivos para *MmmSC* demonstraram imunomarcacão para as interleucinas estudadas (Figuras 11C-D). No entanto, a intensidade de marcação das células reativas frente a estes marcadores variou de fraca (+) a moderada (++) em todos os casos. No presente trabalho, observou-se imunomarcacão discreta para IL-1 β em 10/16 (62,5%) casos, enquanto que a IL-4 apresentou marcação discreta em 14/16 (87,5%) casos (Tabela 7)

Tabela 7 - Avaliação semi-quantitativa de interleucinas em pulmão de bovinos com lesões da PPCB. São Paulo, 2018

Amostras	IL-1 β	IL-4
1	+	+
2	++	+
3	+	+
4	++	+
5	+	++
6	+	++
7	+	+
8	++	+
9	++	+
10	+	+
11	++	+
12	+	+
13	+	+
14	++	+
15	+	+
16	+	+

– (ausência de marcação); Intensidade da marcação: + fraca marcação (1-20 células); ++ moderada marcação (21-40 células)

Figura 11- Fotomicrografia da reação imunohistoquímica para detecção de células linfocitárias e interleucinas em pulmão de bovino com lesões da PPCB

Fonte (ALEXANDRE,2017)

Imunohistoquímica. (A) Marcação positiva para linfócitos B (Pax5). (B) Marcação positiva para linfócitos T (CD3). (C) Marcação positiva para macrófagos (IL-1 β). (D) Marcação positiva para macrófagos (IL-4). Detecção por Polímero.HRP, contra coloração em hematoxilina de Harris (400 $\times$).

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a PPBC é uma das principais doenças infecciosas que afeta o gado bovino na África, sendo relatada como a causadora de perdas econômicas significativas neste continente, maiores até do que a peste bovina (OIE, 1995). No presente trabalho, foram identificados 50 animais com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB e abatidos em abatedouros na cidade de Huambo, Angola. Após avaliação molecular, 43 amostras foram consideradas com qualidade suficiente para seguir na identificação do agente, na qual foram identificados 16/43 (37,2%) animais positivos para o agente etiológico da PPCB, o *Mycoplasma mycoides mycoides* *Small Colony* (*MmmSC*).

Em estudo realizado por SWAI et al. (2013), na Tanzânia, foram identificadas 41 bovinos com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB num efetivo de 4460 bovinos no período de um ano, ou seja, uma prevalência de 0,9% na população estudada. No entanto, os autores não realizaram a identificação molecular do *MmmSC*. Em estudo semelhante realizado em Camarões, WADE et al. (2015) detectaram 114 animais com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB em uma população de 384 animais, os quais foram selecionados, aleatoriamente, em um total de 2.458 bovinos abatidos no período de um ano. Assim, os autores demonstraram uma prevalência de 29,7% nesta casuística, porém, apenas 3,4% destes animais foram positivos no teste molecular. Em nosso estudo, a prevalência no período de três meses foi de 11,1%, dos quais 37,2% dos animais com lesões macroscópicas foram positivos para o agente infeccioso da PPCB. Estes dados refletem diferenças regionais na prevalência da doença, no período de estudo, assim como diferença na sensibilidade e acurácia dos métodos de investigação utilizados para o diagnóstico definitivo da doença.

Macroscopicamente, foram observados aderência da pleura visceral e parietal a parede da cavidade torácica (66%), seguida pela deposição de fibrina (28%), edema (26%), pleurite fibrinosa (18%), pulmão com aspeto marmoreado (12%) e sequestro pulmonar (12%). Nos linfonodos, foram identificados aumento de tamanho (84%) e áreas de congestão e edema (24%). As lesões macroscópicas observadas em nosso estudo refletiram os padrões patológicos compatíveis com a PPCB, descritos em estudos realizados na Itália, Quênia e África do Sul (THIAUCOURT et al., 2004; CASWELL e WILLIAMS, 2007; FAO, 2008; SWAI et al., 2013). Ainda, SCACCHIA (2011) observou a presença de septos interlobulares dilatados por um fluido seroso (edema), dando a aparência de um pulmão marmoreado em animais abatidos no Okavango, norte da Namíbia. Alguns estudos relatam que o sequestro pulmonar é uma lesão patognomônica da PPCB, caracterizada na fase crônica da doença e que representa uma fonte

de infecção contínua em áreas de criação animal (CARVALOLHO, 2008; FAO, 2008). No entanto, das 16 amostras positivas para o agente infeccioso da PPCB em nosso estudo, apenas 5 (31,2%) animais apresentaram o sequestro; enquanto um animal negativo para *MmmSC* também apresentou o sequestro. Padrão semelhante foi observado em relação ao pulmão em padrão marmoreado. Estes resultados podem estar relacionados ao estágio da doença no momento do abate dos animais, mas, principalmente, indicam que estas lesões não apresentam 100% de especificidade para a doença, sendo necessário incluir ferramentas adicionais para o diagnóstico definitivo da PPCB, além dos achados macroscópicos.

SWAI et al. (2013) observaram exsudação pleural exuberante em animais abatidos, de cor amarelo-acastanhada, contendo, por vezes, fragmentos de fibrina. No entanto, esta característica não estava presente nos bovinos analisado em nosso estudo, o que também pode estar relacionado a fase da doença, sendo mais raro encontrar fluídos na cavidade torácica durante a fase crônica (FAO, 2008). Das lesões encontradas macroscópicas nos linfonodos regionais, nossos achados estão de acordo com a literatura (OIE, 2008), que afirma que os linfonodos mediastínicos e traqueobrônquicos podem apresentar-se aumentados de tamanho.

Em relação à localização anatômica das lesões, todos os animais positivos para *MmmSC* apresentaram lesões unilateralmente, com maior frequência no pulmão esquerdo (60%) e no lobo diafragmático esquerdo (60%). Estes achados estão de acordo com a literatura (FERREIRA et al., 1999; FAO, 2008; SCACCHIA et al., 2011; KOCK et al., et al (2015), na qual a maioria das lesões patomorfológicas da PPCB estão presentes unilateralmente e no pulmão esquerdo. Adicionalmente, MBULU et al. (2004) identificaram as lesões compatíveis com a PPCB no lobo diafragmático esquerdo em 63% dos casos, corroborando os nossos dados. Por outro lado, GIZAW (2004) avaliou sete bovinos com lesões compatíveis com a PPCB e confirmados pela sorologia, demonstrando que apenas o pulmão direito estava comprometido. Porém, estes resultados podem estar relacionados ao baixo número de animais avaliados.

As lesões microscópicas pulmonares variam de acordo com a progressão da doença, sendo que a lesão principal observada é a broncopneumonia intersticial com hiperplasia linfoide (GAVRISH, 2003; PILO et al., 2007). No presente estudo, observamos que 14% dos animais positivos para a PPCB apresentaram broncopneumonia intersticial, enquanto 46% apresentaram hiperplasia linfoide. Também foram observadas áreas de fibrose, acompanhadas por uma infiltração generalizada de linfócitos e espessamento dos septos interalveolares. Estes achados estão de acordo com a literatura (GIZAW, 2004; KARAM et al., 2005; KOCK et al., 2015), incluindo um estudo com a análise histopatológica em 108 seções de pulmões de animais com a PPCB, confirmados pela sorologia (KARAM et al., 2005).

Ainda, foi identificado enfisema pulmonar em 34% nos animais do nosso estudo. Apesar de não serem as características clássicas da infecção pelo *MmmSC*, outros estudos também descrevem esses achados na doença (KARAM et al., 2005; KOCK et al., 2015). Do mesmo modo, observamos que 4% dos animais apresentaram vasculite, característica observada também em infecções experimentais em bovinos (KOCK et al., 2015). Os achados microscópicos de hiperplasia folicular centrogerminativa e expansão dos seios medulares, com intensa histiocitose sinusoidal em linfonodos regionais também estão de acordo com o relatado na literatura (KOCK et al., 2015). Todos estes achados indicam, semelhantemente aos dados macroscópicos, que as lesões microscópicas geralmente são complexas e inespecíficas para a doença, novamente sendo necessário a associação de testes complementares para o diagnóstico definitivo da PPCB.

O material fixado em formol e embebido em parafina (FFEP) muitas vezes é o único material biológico disponível para análises moleculares. Assim, a amplificação do DNA de microrganismos nestas amostras tem um impacto profundo no diagnóstico patológico, especialmente quando os agentes são de difícil isolamento em cultivos celulares e/ou as lesões anatomopatológicas são inespecíficas (KANG et al., 2012). No presente estudo, inicialmente foi realizado a PCR qualitativa para amplificação de um gene endógeno do tecido bovino nas 50 amostras de pulmão (FFEP) com lesões macroscópicas compatíveis com a PPCB, para avaliar a presença e qualidade do DNA extraído. Nossos resultados demonstraram que 86% (43/50) das amostras amplificaram o gene controle, indicando haver um material de boa qualidade para a identificação do material genético do agente infeccioso, evitando resultados falso-negativos devido à qualidade das amostras. A ineficiência destas sete amostras pode estar relacionada à degradação do DNA pela ação do formol, uma vez que este fixador causa ligações cruzadas com as proteínas responsáveis pela morfologia do DNA, resultando em extensivo enovelamento e, conseqüentemente, fragmentação dos nucleotídeos (GILLOTOS et al., 2007).

Na sequência, a detecção de microrganismos da classe *Mollicutes*, assim como a comprovação da espécie *Mycoplasma mycoides mycoides SC*, foi realizada nas 43 amostras selecionadas na primeira avaliação, revelando positividade em 16 animais. Apesar de todos os animais avaliados terem apresentado lesões anatomopatológicas compatíveis com a PPCB, apenas 37,2% dos animais foram positivos para o agente *MmmSC*. Corroborando nosso estudo, BASHIRUDDIN et al. (1999) analisaram 37 bovinos com lesões compatíveis com a PPCB em um abatedouro no norte da Itália e identificaram positividade pela PCR em 64% das amostras extraídas de tecido pulmonar fresco. Da mesma forma, WADE et al. (2015) demonstraram positividade molecular em apenas 3,4% dos 114 animais com lesões da PPCB. Estes estudos,

realizados em países e por equipes diferentes, indicam que muitos animais com as características macroscópicas da PPCB são negativos na pesquisa de seu agente etiológico. Assim, uma possibilidade real é que estes animais apresentaram lesões pulmonares pelo envolvimento de outros agentes infecciosos, como a infecção pelo *M. bovis*, que resulta em algumas lesões macroscópicas semelhantes caracterizadas por múltiplos focos necróticos, fibrose extensa e pleurite fibrinosa (PILO, 2007). Ou ainda, como manifestação secundária a outros processos patológicos sistêmicos, principalmente a pasteurelose. Também não pode ser descartada a possibilidade, apesar de pequena, dos materiais analisados não conterem a bactéria ou a mesma estar em quantidade insuficiente neste tipo de amostra (BASHIRUDDIN et al., 1999; THIAUCOURT et al., 2004). Um exemplo é o estudo molecular realizado por DEDIEU (1994), que identificou o agente infeccioso em 100% das amostras de fluidos pleurais de 27 bovinos infectados naturalmente. O curso da doença também poderia estar diretamente relacionado com a quantidade do microrganismo nos diferentes tipos de amostra, considerando que os fluídos pleurais são mais frequentes nos casos agudo da infecção.

É importante ressaltar que, embora as lesões macroscópicas não tenham apresentado 100% de especificidade, os animais que possuíam aderências, sequestro pulmonar e pulmão marmoreado tiveram maiores chances de serem positivos em relação aos animais que não as possuíam. TRICHARD et al. (1989) avaliaram 22 bovinos doentes com lesões compatíveis com a PPCB na Namíbia e não identificaram diferença significativa entre a presença das lesões patológicas e a positividade dos animais. Porém, ressalta-se que o sequestro pulmonar foi identificado em 8 animais, envolvendo mais de um lobo pulmonar, e pulmão marmoreado foi ainda mais frequente, observado em 14 animais. Estes dados reforçam que o diagnóstico preciso e definitivo da PPCB deve ser realizado pela associação dos achados epidemiológicos, anatomopatológicos, imunológicos e moleculares destes animais.

A avaliação imunohistoquímica das células linfocitárias, assim como a expressão das interleucinas, foi realizada nas amostras de tecido pulmonar dos animais com diagnóstico positivo para *MmmSC*, pela PCR. Nossos resultados demonstraram imunomarcagem positiva para os linfócitos B e T em todas as amostras, predominantemente com marcação focal, tanto no parênquima pulmonar quanto na pleura. Resultados semelhantes foram demonstrados por COUTO (2004), em amostras de pulmão obtidas a partir de sete bovinos experimentalmente infectados por *MmmSC*. Porém, o autor demonstrou marcação predominantemente difusa no interstício pulmonar e, em menor grau, no epitélio bronquiolar. Esta diferença pode estar relacionada, principalmente, a fase analisada da doença, assim como ao fato de ser uma infecção experimental e controlada, o que não é possível determinar em animais naturalmente infectados

e que foram encaminhados ao abatedouro, provavelmente sem sinais clínicos da doença pulmonar.

Acredita-se que as citocinas tenham um papel importante no recrutamento, proliferação e sobrevivência das células inflamatórias em doenças pulmonares de mamíferos (KOCK et al., 2015). Sendo assim, diversos estudos têm sido realizados para investigar a expressão destas moléculas, a fim de compreender melhor suas funções no sistema imunológico (JUNGI et al., 1999). No presente estudo, foram avaliadas a imunoexpressão das IL-1 β e IL-4 nos animais com diagnóstico molecular de PPCB. Ambas as interleucinas estavam presentes no tecido pulmonar afetado, porém com intensidade variando de fraca a moderada. Estes resultados foram diferentes do encontrado por KOCK et al. (2015), que demonstrou que 90% dos animais apresentaram imunomarcção moderada das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-17A, sendo que 10% dos bovinos apresentaram intensa marcação. No entanto, como mencionado anteriormente, os autores avaliaram a imunoexpressão em bovinos experimentalmente infectados pelo *MmmSC*, em ambiente controlado e sem as variações do curso natural da doença.

6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina está presente em bovinos na cidade de Huambo, Angola, porém com lesões anatomopatológicas e resposta inflamatória pouco específicas. A população analisada de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de PPCB apresentou uma prevalência de 32,7% de animais positivos para o agente infeccioso *MmmSC*, o qual foi detectado por PCR a partir de DNA extraído do material parafinado. Os animais com as características anatomopatológicas de aderência, pulmão marmoreado, sequestro e fibrose pulmonares apresentaram maiores chances de serem positivos no PCR. No entanto, devido a ocorrência destas mesmas lesões em animais negativos e a variabilidade existente entre as diferentes fases da doença, ressalta-se a importância da avaliação integrada de dados epidemiológicos, anatomopatológicos, imunológicos e moleculares para estabelecer um diagnóstico preciso e definitivo da PPCB nestes animais.

REFERÊNCIAS

- ABDO, E. M; NICOLET, J.; FREY, J. Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 2000.
- AMANFU, W. The use of antibiotics for CBPP control: the challenges. In FAO, Proceedings -CBPP Control: Antibiotics to the Rescue? FAO-OIE-AU/IBAR-IAEA Consultative Group Meeting on CBPP in Africa. Rome, FAO Animal Production and Health, (pp.7-11). 2006.
- AMES, I. Tarjeta de Datos de la Enfermedad para Especialistas Ganaderos Pleuroneumonía contagiosa bovina. **Journal Article**. p.1 - 3. 2009.
- ANON. C. Contagious bovine pleuropneumonia. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines. 2012. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/_CBPP.pdf. Acesso em: 25 Julh. 2016.
- ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, N. T.; ROSALES, R. S.; DE LA FE, C.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B.; DAVEY, H. M. Flow cytometric method for the assessment of the minimal inhibitory concentrations of antibacterial agents to *Mycoplasma agalactiae*. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 69, n. 10, p. 1071–6, 1 out. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998868>
- BASHIRUDDIN, J.B.; SANTIS, P.; VISAGGIO, M.C. FRANCESCOG. ; D`ANGELO, A.; NICHOLAS, R.A.. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* in tissues from an outbreak of contagious bovine pleuropneumoniam by culture, immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *The Veterinary Record. Journal Article*. 1999.Disponível vem em: <http://europepmc.org/abstract/med/10579536> 23-07. Acesso em Agot. 2017.
- BENKIRANE, A. - Contagious bovine pleuropneumonia: this cow is having difficulty in breathing. EMPRES.1994. Disponível em: http://www.fao.org/eims/secretariat/empres/eims_search/3_dett.asp?calling=simple_s_result&publication=&webpage=&photo=&press=&lang=en&pub_id=140096_ Acedido em Jan. 6, 2017.
- BOROWSKI. S.M. Pasteurelose Pulmonar: Peripneumonia contagiosa bovina de Pesquisa Veterinária “Brasil, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90001-970. 2001. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/abravessc/pdf> Acesso em julh. 2016.
- CARVALHO C.I.C. **Estudo da inibição da aderência de *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC* a células epiteliais de pulmão de bovino**. 2008. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Técnica de Lisboa. 2008. Disponível em: <http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/847>. Acesso em 22 de mar. 2016.

CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory System. In: Maxie MG, editor. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. New York: **Elsevier Saunders, Edinburgh**. 2007. Disponível em: «www.ncbi.nlm.nih.gov». Acesso em: 30 dez. 2016.

CATLEY, A.; ALDERS, R. G.; WOOD, J. L. N. Participatory epidemiology: methods, experiences. **Medical and Veterinary Entomology** 2013. Disponível em: «www.ncbi.nlm.nih.gov». Acesso em: 25 dez. 2016.

COUTO, C. M. R. R. Interação do *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* com células epiteliais de pulmão de bovino. Trabalho de fim de curso da Licenciatura em Engenharia da Produção, ramo Produção Animal. Santarém: Escola Superior Agrária de Santarém – Instituto Politécnico de Santarém. Cytoadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances. **Veterinary Microbiology**.307-316. 2014.

DEDIEU, L. Contagious bovine pleuropneumonia: A rationale for the development of a mucosal sub-unit vaccine. Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Diseases**, 31 p. 227-238. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>». Acesso: em 10 de mai.2016.

DEDIEU, L. Viable *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* Small Colony-Mediated Depression of the Bovine Cell Responsiveness to the Mitogen Concanavalin A. **Journal compilation**. France. 2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3083.2006.01799.x/full> Acesso em: mai.de 2017.

DEDIEU, L. MADY, V., LEFEVRE, P.C. Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides S.C.* Contagious bovine pleuropneumonia agent. 1994. **Veterinary Microbiology**, 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90064-7](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(94)90064-7). Acesso em: 10 de mai.2017

DIAS, E. Brasil livre da pleuropneumonia contagiosa bovina. 2017.**Blog**, FCAT UNESP 2017. Disponível em:<http://coimma.com.br/balancas-e-troncos/leiamais.php?id=70>. Acesso: em Set. 2017

DONE, S.H.; NICHOLAS, R.; PLMER, N. Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) an emerging disease in Europe. **Recherche Cattle Practice**. 13 – 20.1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). EMPRES Unit. 1997 RECOGNISING CBPP, **A Field Manual for Recognition**. EMPRES

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS FAO. Electronic Conference on Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) Comments and Discussions. ? **The Merck Veterinary Manual**.2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) .Draft code of hygienic practice for meat. Report of the 10th Session of the Codex Committee on Meat Hygiene. **Alinorm. Rome**. 2004. Disponível em:

ftp://ftp.fao.org/codex/Alinorm04/AL04_16e.pdf. Acesso em: 21 de janeiro de 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Contagious Bovine Pleuropneumonia. **The Merck Veterinary Manual**, 8 ed.2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS FAO. Can Contagious bovine Pleuropneumonia be eradicated? **The Merck Veterinary Manual**, 2015. Disponível em: «<http://www.fao.org>». Acesso em: 15 mar. 2016.

FERNANDES, J. I. M. Teleriose em Bovinos de carne na região do Ribatejo: Peripneumonia Contagiosa Bovina. Lisboa: p. 43. 2010. Disponível em: «<https://www.repository.utl.pt>». Acesso em: 30 de julh. 2016.

FERREIRA A. FERREIRA C. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos. **Fundação Calouste Gulbenfiam** 4 ed. 330-342. 1999.

FISCHER, A.; SHAPIRO, B.; MURIUKI, C.; HELLER, M.; SCHNEE, C.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; VILEI, E. M.; FREY, J.; JORES, J. The Origin of the 'Mycoplasma mycoides Cluster' **Coincides with Domestication of Ruminants**. 2012.

GAVRISH, V.G. Diretório veterinário, 4 ed. Rostov-on-Don: Phoenix. 2003.

GILLOTOS, A. SIMANOT A. Efficient extraction from 25 year-old paraffin-mbedded tussuis . 2007.

GIZAW, G. M. **Serological, Clinical end Participatory Epidemiolocal Survery of Contagious Bovine Pleuropneumonia in Somali Region**, Ethiopia. 2004. Tese(Master of Science in Tropical Veterinary Epidemiology)- Faculty of Veternary Medicine, University University in partial, Ethiopia. 2004.

GOMES, A. F. Entidades Nosológicas em Angola: Peripneumonia contagiosa dos bovinos: p. 15 -16. **Boletim Ordem dos médicos veterinários**. 2008.

GULL, T.; FRENCH, R. A.; GORTON, T. S.; BURRAGE, T. G.; PROZESKY, L.; GEARY, S. G. Models of Contagious Bovine Pleuropneumonia: Evaluation of Two Novel Strains. **The Open Veterinary Science Journal**. 2013.

GREER, C. E, WHEELER, C.M.; MANOS, M.M. Sample Preparation na PCR Amplification from Paraffin-embedded Tissues. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, n3 v, 6 p.113-122. 1994.

HELLER, M.; GICHERU, N.; TJIPURA-ZAIRE, G.; MURIUKI, C.; YU, M; BOTELHO, A.; NAESENS, J.; JORES, J & LILJANDER, A. Development of a Novel Cocktail Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a Field-Applicable Lateral-Flow Rapid Test for

Diagnosis of Contagious Bovine Pleuropneumonia. 2016. Disponível em «<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>». Acesso em: 25 dez. 2016.

JUNGI, T.W., KRAMPE, M., SILEGHEM, M., GRIOT, C., NICOLET, J., 1996. **Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage lymphocytes effector functions by mycoplasmas**. *Microbial Pathogenesis*, 21, 487–498

KANG, I., KIM, D. HAN, H. SEO, H.W.OH,Y., PARK,C.L.J. GOTTSCHALK,M., CHAE,C. optimized protocol. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2012

KARAM, I. E. S. M. SAAD, A. Z. SHALLALI, A. M. A.O. Studies on Contagious Bovine Pleropneumonia in Khartoum State-Sudan. Department of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine University of Khartoum. **Veterinary Science Journal**. 2005.

KOCK, S. A; HAIDER, W.; SACCHINI, F.; LILJANDER A.; MEENS, J.; POOLE, J.; GUSCHLBAUER, M.; HELLER, M.; JANNAESSENS, J.; JORES, J. Morphological characterization and immunohistochemical detection of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-17A, and TNF- α in lung lesions associated with contagious bovine pleuropneumonia. Kénia. 2016. Disponível em: «<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>». Acesso mar. 2016.

KHARKOV, B. V. A. Contagious Pleuropneumonia gado. 2007. Disponível em: «<http://materiale-didactico.info/index.php?newsid=33196> enews». Acesso em: 20 de julh. 2016.

LAACK, E.A. Contagious bovine pleuropneumonia a review, **Veterinary Quarterly**.1992 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.1992.9694343>

MAIR, G.; VILEI, E. M.; WADE, A.; FREY, J. & UNGER, H. Isothermal loop-mediated amplification (lamp) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. **BMC Veterinary Research**. 2013. Disponível em: «<http://www.bmcvetres.biomedcentral.com/articles>». Acesso em: 20 mai. 2016.

MENDES, A. M. A Medicina veterinária em Angola: A evolução do problema da Peripneumonia contagiosa dos bovinos em Angola. Ordem dos médicos veterinários de Angola, **Casa das Nações**: p. 123-138. 2006.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. Ed. São Paulo: Gráfica-Editora Michalany, p.40-112. 1990.

MILTADOU, D. R.; MATHER, A.; VILEI, E. M. & DU PLESSIS, D. H. Identificação de genes que codificam para antígenos de células B de *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* pequena colónia (MmmSC) usando exibição em fagos. **BMC Microbiol**. 9: p. 215. 2009.

MINAG. Principais doenças animais em Angola. Doenças transfronteiriças presentes em Angola. **Projecto Portal do Governo**: 24-4. 2008.

MOURA, V. M. D.; BRITO, L. A. B.; FISCHER, P.; MATOS, M. P. C.; THOMAS, H. E. Técnica de Necrópsia e Colheita de Material para Exames Laboratoriais, em Ruminantes, Equinos e Suínos. 1ªed. São Paulo. **Med. Vet.**: p. 45. 2015. Disponível: em <http://www.medvetlivros.com.br>. Acesso em: 26 de novembro de 2016.

MUUKA, G. M.; BANDA, F.; BOUNAVOGLIA, D.; PINI, A. & MASSIMO, S. M. Clinical Cases of Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) among Calves in Vaccinated Cattle Herds in Zâmbia: A Case Study. **J. Vet Sci. Med. Diagn.** 2013.

MBULU, R., TJIURA-ZAIRE, G., LELLI R., FREY, J., PILO, P., VILEI, E.M., METTLER, F., NICHOLAS, R.A.J.; HUEBSCHLE, O.J.B. Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC*. **Veterinary Microbiology**. 229-234. 2004.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; TJIPURA-ZAIRE, G.; ROWAN, T. Treatment of contagious bovine pleuropneumonia. **Veterinary Record**. p. 510-511. 2012. Disponível em: <http://www.Afrivip.com.org>. Acesso em: 13 set. 2016.

NKANDO, I.; NDINDA, J.; KURIA, J.; NAESSENS, J.; MBITHI, F.; CHRISTIAN, S. C. Efficacy of two vaccine formulations against contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) in Kenyan indigenous cattle. **Res Vet Sci.** 2012.

NSALAMBI, D. **Quadro nosológica referente a doença de importância económica em Angola**. Luanda: p23. 2014.

OFFCE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Animal diseases data - Technical diseases cards: Contagious bovine Pleuropneumonia. 2002. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/maladies/fiches>. Acesso em: 30 de agos. 2016.

OFFCE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). World Animal Health Information Database - Event Summary: Contagious bovine pleuropneumonia. **Central African Republic**. 2004. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em 14 de junho de 2016.

OFFCE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Contagious Bovine Pleuropneumonia". **2006**. Disponível em: <http://www.oie.int/hs2/report.asp>. Acesso em: 30 agos. 2016.

OFFCE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Contagious Bovine Pleuropneumonia 2007. Disponível em: http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A060.htm. Acesso em: 14 de jun. 2016.

OFFCE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Code Contagious bovine Pleuropneumonia. **Health standards- Terrestrial Animal Health**. 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Ficha de Informação geral sobre Enfermedades animales, Contagious Bovine Pleuropneumonia. 2009.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Contagious bovine Pleuropneumonia. OIE Terrestrial Manual. **Veterinary Sciences: Research and Reviews**. v.2. p 59 pp. 1-16. 2014

PEDRERA, M. SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J. ROMERO-J.L, RAYA A.I, NÚÑEZ A. GÓMES-VILLAMANDOS, C. Cytokine Expression in Paraffin Wax-embedded Tissues from Conventional Calves. **J Comp Pathol** .2007.

PENRITH, M. L. Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). África do Sul. 2014. Disponível em: «<http://www.AfriVip.org>». Acesso 13 de set. 2016.

PEREIRA, L.O.; DANELLI M.G.M., MAZUR, C.; GALLER, R.. Identificação molecular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolado do conduto auditivo externo de caprinos clinicamente saudáveis. **Ciência Rural**. 2003.

PILO, P.; FREY, J.; VILEI, E. M. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **The Veterinary Journal**, 174 (3), 513-521. 2007.

PILO, P.; VILEI E. M.; PETERHANS, E.; BONVIN-KLOTZ', L.; STOFFEL, M. H.; DOBBELAERE, D.; FREY, J. A Metabolic Enzyme as a Primary Virulence Factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. **Journal of bacteriology**. 2005.

PIRES, I.; ALVES, A.; OLIVEIRA, J.; GAMA, A. Aspectos lesionais macroscópico: Critérios de descrição. v 3. **Vila real. SDE**: p. 30. 2002.

REGALLA, J.; AMADO, A.; GONSALVES, R.; BOTELLO, A.; VIERA, R. As doenças Bacterianas e a saúde animal. Lisboa, Portugal: p. 217 - 218. 2007. Disponível em: «https://sigarra.up.pt/icbas/pt/web_gessi_docs.download_file?p_name=F209525264/». Acesso em: 20 de mai.2016.

REGALLA, J.; CAPORALE, V. GIOVANNINI, A.; SANTINI, F.; MARTEL, J.; PENHA, G. A. Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. **Revue Scientifique et Technique-office International des epizootics**, p 1309 – 1329.1996.

RISALDE, M. A, MOLINA. V, SÁNCHEZ-CORDÓN PJ, ROMERO-PALOMO F, PEDRERA M, GÓMEZ-VILLAMANDOS JC. 2015. Effects of Preinfection With Bovine Viral Diarrhea Virus on Immune Cells From the Lungs of Calves Inoculated With Bovine Herpesvirus **Vet Pathol**. 2014.

RODRIGUES, V.; HOLZMULLER, P.; PUECH, C. ; WESONGA, H. THIAUCOURT, F.; MANSO-SILVÁN, L. Whole Blood Transcriptome Analysis of *Mycoplasma mycoides*

Subsp. *mycoides*-Infected Cattle Confirms Immunosuppression but Does Not Reflect Local Inflammation. France. Kenyan Agricultural Research Institute. **Research article**. 2015.

SIMÃO D.L. Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, Instituto de Investigação Veterinária. Estratégia de Controlo da PPCB em Angola. República de Angola. 2007.

SCACCHIA, M.; TJIPURA-ZAIRE, G.; LELLI, R.; SACCHINI, F.; PINI, A. Histological study of Contagious bovine pleuropneumonia: humoral and pathological events in cattle infected by endotracheal intubation or by exposure to infected animals. **Vet Ital.** 407-13. 2011.

SWAI, E.; MWEZIMPYA, I.; ULICKY, E.; MBISE, A.; MOSHY, W. An abatter survey of contagious bovine pleuropneumonia usions in slaughtered cattle in selected ristrict in Northern Tanzania. 2013. Disponível em: «<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>». Acesso 25 Dez. 2016.

TAMBI, N. E.; MAINA, W.O.; NDI, C. An estimation of the economic impact of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. **Rev Sci Tech.** P 999-1011. 2006. Disponível em: «<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>». Acesso 30 de dez. 2016.

TOTTÉ, P.; RODRIGUES, V.; YAYA, A.; HAMADOU, B.; CISSE, O.; DIALLO, M.; NIANG, M.; THIAUCOURT, F.; DEDIEU, L. Analysis of cellular responses to *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony* biotype associated with control of contagious bovine pleuropneumonia. **Veterinary Research**. 2008. Disponível em: «<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073095>». Acesso em 18 mai. 2016.

THIAUCOURT, F., YAYA, A., WESONGA, H., HUEBSCHLE, O. J. B. TULASNE, J. E PROVOST, J. Contagious bovine pleuropneumonia, **Annals of the New York Academy of Science**. 916:71- 80. 2004.

THIAUCOURT, F., YAYA, A., WESONGA, H., HUEBSCHLE, O. J. B., TULASNE, J. J. E PROVOST, A. Contagious bovine pleuropneumonia: a reassessment of the efficacy of vaccines used in Africa. **Annals of the New York Academy of Science**. 916: 71- 80. 2015.

THIAUCOURT, F.; VAN DER LUGT, J. J.; PROVOST, A. Contagious bovine pleuropneumonia. In J.A.W. Coetzer, R.C. Infectious Diseases of Livestock. South Africa: Oxford University Press Southern Africa. **Annals of the New York Academy of Science**. 2004. Disponível em: «<http://www.ojvr.org/index.> ». Acesso em 13 julh. 2016.

TRICHARD, C. J. V., BASSON, P. A., VANDER LUGT, J. J.; JACO~SZ, ELSIE P. An outbreak of contagious bovine pleuropneumonia in the Owam~ Mangettt area South Africa/Namibia: microbiological, immunofluorescent, pathological and serological findmgs. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 56, 2n-284 1989.

VILEI, E. M.; FREY, J. Detection of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* in bronchoalveolar lavage fluids of cows based on a TaqMan real-time PCR discriminating wild

type strains from an lppQ mutant vaccine strain used for DIVA-strategies. **J Microbiol Methods**. 2010.

WADE, A.; YAYA, A.; EL-YUGUDA, A. D.; UNGER, H., NAFARND A.; DANIEL, W.; IKECHUKWU, E. S.; EGWU, G. O. The Prevalence of Contagious Bovine Pleuropneumonia in Cameroon: A Case Study Garoua Central Abattoir, Cameroun. **Journal of Veterinary Medicine and Research**. J Vet Med Res 2(4): 1029. 2015.

WESTBERG, J.; PERSSON, A.; HOLMBERG, A. ; GOESMANN, A.; LUNDEBERG, J.; JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B. ; UHLEN, M.. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1^T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Genome Res. **Journal of Bacteriology**. 2004.