

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS EM CASOS NATURAIS E  
EXPERIMENTAIS DE DISENTERIA DE INVERNO EM BOVINOS ADULTOS

SAULO PETINATTI PAVARINI

PORTO ALEGRE  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS EM CASOS NATURAIS E  
EXPERIMENTAIS DE DISENTERIA DE INVERNO EM BOVINOS ADULTOS.

SAULO PETINATTI PAVARINI

Dissertação apresentada como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias na área de  
concentração em Cirurgia, Morfologia  
e Patologia Animal, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.  
Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE  
2009

P377a Pavarini, Saulo Petinatti

Achados clínicos e patológicos em casos naturais e experimentais de disenteria de inverno em bovinos adultos. / Saulo Petinatti Pavarini. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

55 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. David Driemeier, Orient.

1. Patologia veterinária 2. Diarréia: bovinos 2. Coronavírus bovino  
I. Driemeier, David, Orient. II. Título.

CDD 619.62

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**APROVADO POR:**

**Prof. Dra Ana Lucia Schild,  
Membro da Banca.**

**Prof. Dr. Aldo Gava,  
Membro da Banca.**

**Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz,  
Membro da Banca.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e pela oportunidade de estar neste plano.

Ao meu pai Airton José Pavarini e minha mãe Elenir Aparecida Petinatti Pavarini pelo amor, carinho, educação, apoio e confiança incondicional.

Ao meu Irmão Daniel Petinatti Pavarini pelo amor e amizade eterna.

Ao Professor Doutor David Driemeier pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos nesses anos de convivência.

Ao Professor Doutor Pedro Soares Bezerra Junior pela amizade, conhecimentos e experiências compartilhadas.

Aos funcionários, estagiários e pós-graduandos do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, pela ajuda, convivência e amizade.

Ao Professor Doutor Paulo Brandão pela realização dos exames da PCR.

Às amigas Adriana Silva Santos e Débora Lumke pelo convívio e amizade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	6
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1 Histórico .....	12
2.2 Etiologia .....	12
2.3 Epidemiologia.....	13
2.4 Patogenia .....	16
2.5 Sinais clínicos e diagnóstico diferencial.....	17
2.6 Achados de necropsia e histopatológicos .....	17
2.7 Diagnóstico.....	18
2.8 Tratamento e controle.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Surto 1 .....	21
3.2 Surto 2 .....	22
3.3 Reprodução Experimental .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	25
4.1 Surto 1 .....	25
4.2 Surto 2 .....	29
4.3 Reprodução experimental.....	34
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
<b>ANEXO A</b> .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino 2 apresentando diarreia sanguinolenta.....	26
<b>Figura 2</b> – Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino1. Cólon distendido por coágulos de sangue presente no lúmen.....	26
<b>Figura 3</b> - Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino 1. Cólon espiral. Criptas dilatadas, revestidas por epitélio pavimentoso ou cuboidal e preenchidas por debris necróticas e infiltrado mononuclear com eosinófilos na lâmina própria. Coloração de hematoxilina e eosina, Obj. 40.....	28
<b>Figura 4</b> - Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino 1. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando no cólon espiral antígenos virais em enterócitos, macrófagos e debris necróticos no lúmen das criptas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 40.....	28
<b>Figura 5</b> - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino apresentando diarreia líquida e esverdeada. ....	30
<b>Figura 6</b> - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino apresentando diarreia de coloração marrom escura. ....	30
<b>Figura 7</b> - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino apresentando diarreia sanguinolenta. ....	31
<b>Figura 8</b> - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino com corrimento nasal seroso com estrias de fibrina (detalhe). ....	31
<b>Figura 9</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Bovino apresentando diarreia esverdeada. ....	35
<b>Figura 10</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Cólon espiral. Criptas dilatadas, revestidas por epitélio pavimentoso ou cuboidal e preenchidas por debris necróticas e infiltrado mononuclear com eosinófilos na lâmina própria. Coloração de hematoxilina e eosina, Obj. 20. ....	37
<b>Figura 11</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Jejun. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos que recobrem as vilosidades. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20.....	37

<b>Figura 12</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Íleo. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos que recobrem as vilosidades. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20. ....	38
<b>Figura 13</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Íleo. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos das criptas e macrófagos. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 40. ....	38
<b>Figura 14</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Cólon espiral. Imuno-histoquímica para coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos, macrófagos e debris necróticos no lúmen das criptas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20. ....	39
<b>Figura 15</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Cólon descendente. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos, macrófagos e debris necróticos no lúmen das criptas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20. ....	39
<b>Figura 16</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Ceco. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais no epitélio de revestimento das pregas intestinais. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20. ....	40
<b>Figura 17</b> - Infecção experimental com coronavírus bovino. Corneto Nasal. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em células epiteliais necróticas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 40. ....	40



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -Achados hematológicos dos bovinos com disenteria de inverno do surto2... 32	32
<b>Tabela 2</b> - Leucograma dos bovinos com disenteria de inverno no surto2. .... 33	33
<b>Tabela 3</b> - Temperatura retal* dos bovinos afetados por disenteria de inverno no surto 2. .... 34	34
<b>Tabela 4</b> - Temperatura retal* dos bovinos 16, 17 e 18 após a infecção experimental com coronavirus bovino. .... 36	36

## RESUMO

Disenteria de inverno é uma doença causada pelo coronavírus bovino que afeta animais adultos. Descrevem-se dois surtos de disenteria de inverno em rebanhos leiteiros nos municípios de Viamão e Vespasiano Corrêa, Rio Grande do Sul. A doença foi reproduzida experimentalmente em dois bovinos adultos. O quadro clínico se caracterizou por diarreia, inicialmente líquida esverdeada com estrias de sangue e muco, que em alguns animais, evoluiu para coloração marrom escura à sanguinolenta e que persistiu, em média, cinco dias. Na propriedade de Vespasiano Corrêa os animais apresentaram sinais respiratórios como tosse e corrimento nasal. Diminuição na produção de leite e no consumo de alimentos, além de graus variados de depressão foram também observados. Foi detectada a presença do coronavírus bovino nas fezes e secreção nasal dos animais pela técnica da *nested* RT-PCR. Foi realizada necropsia de um animal naturalmente infectado que morreu devido à doença. Na necropsia, observou-se mucosas pálidas, conteúdo sanguinolento com presença de grande quantidade de coágulos, principalmente no cólon espiral e petéquias na mucosa do cólon. No cólon espiral, foram observados os principais achados histológicos que incluíram criptas dilatadas sem epitélio de revestimento, ou revestidas por epitélio pavimentoso e/ou cuboidal, às vezes, com núcleos grandes e nucléolos proeminentes. Algumas criptas eram preenchidas por debris necróticos e polimorfonucleares. Amostra de fezes de um animal naturalmente infectado foi usada, através de uma suspensão administrada via oral e nasal, para tentar induzir infecção experimental em 3 bovinos de 20 meses. Foi observada diarreia em dois desses animais, no 5º dia após a inoculação. Esses animais foram eutanasiados ao 2º e 3º dias de diarreia. As lesões histológicas dos casos experimentais foram semelhantes àquelas do caso natural. Na imuno-histoquímica anti-coronavírus bovino (8F2) em cortes de tecido incluído em parafina do cólon espiral, houve marcação positiva no citoplasma de enterócitos das criptas, nos debris necróticos dessas criptas e em macrófagos na lâmina própria, tanto no caso natural como nos experimentais. Nos casos experimentais, também foi observada marcação imuno-histoquímica positiva em duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon descendente e epitélio de revestimento dos cornetos nasais.

**Palavras-chave:** disenteria de inverno, diarreia, coronavírus bovino

## ***ABSTRACT***

Winter dysentery is caused by bovine coronavirus that affects adult animals. This report describes two outbreaks of the disease in dairy herds located in the counties of Viamão and Vespasiano Corrêa, Rio Grande do Sul. The disease was induced experimentally in two adult cattle. The most significant clinical sign was profuse and watery diarrhea, which ranged from greenish to brownish coloration with occasional blood streaks and mucus to a bloody diarrhea. In one herd, animals showed respiratory signs such as cough and nasal discharge. Most cases persisted for 5 days and also included depression, decreased milk production, and diminished food intake. The presence of bovine coronavirus was detected in feces and nasal secretions of animals by *nested* RT-PCR. Necropsy was performed in one animal naturally affected and died due to the disease and revealed pale mucosa, sanguineous contents, and blood clots particularly within the spiral colon and pinpoint hemorrhages on the colonic mucosa. Histopathological lesions were predominant in the spiral colon and consisted of a high number of dilated crypts without epithelium or with replaced pavement epithelium with occasional immature cuboidal cells, which sometimes showed enlarged nucleus and prominent nucleolus. Some crypts were filled with epithelial desquamation and polymorphonuclear cells. Fecal samples from one naturally infected animal were used as a suspension and inoculated orally and nasal in three 20-month-old heifers. Diarrhea was observed in 2 of them and started on the 5<sup>th</sup> day post infection. These animals were euthanized at the second and third days of diarrhea. The histological lesions of experimental cases were similar to the natural case. Anti-bovine coronavirus (8F2) immunostaining was applied on paraffin embedded sections of the spiral colon and showed positive reactions in the cytoplasm of the infected crypt epithelium, sloughed necrotic cells, and within macrophages in the lamina propria of both, natural and experimental cases. Positive reactions were also seen in duodenum, jejunum, ileum, cecum, descending colon and the epithelium lining the nasal turbinate from experimental cases.

**Key Words:** Winter dysentery, diarrhea, bovine coronavirus

## 1. INTRODUÇÃO

A disenteria de inverno é uma doença contagiosa causada pelo coronavírus bovino e afeta frequentemente bovinos adultos durante a estação fria. A doença acarreta grandes prejuízos à bovinocultura devido à diminuição na produção de leite e na conversão alimentar, além dos gastos com tratamentos. A doença foi relatada em diversos países; entretanto, ocorre principalmente em países de clima temperado do Hemisfério Norte. (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990, CHO *et al.*, 2000, NATSUAKI *et al.*, 2007).

No Brasil, apesar de escassos registros de surtos de diarreia em bovinos adultos em diferentes regiões, os estudos etiológicos nestes casos são inconsistentes. A associação de surtos de diarreia com coronavírus bovino foi estabelecida por Brandão *et al.* 2002 através da detecção do vírus em amostras fecais de vacas afetadas no Estado de São Paulo. Desta forma, pesquisas que associem os achados clínicos e patológicos da doença com métodos de diagnóstico adequados são fundamentais para caracterizar a doença e sua distribuição no país.

Devido à baixa mortalidade causada pela doença e a dificuldade em reproduzi-la experimentalmente, os estudos histológicos e imuno-histoquímicos das lesões são escassos (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; CHO *et al.*, 2000; TRAVEN *et al.*, 2001; NATSUAKI *et al.*, 2007), o que, muitas vezes, impede pesquisas mais aprofundadas acerca da patogenia do coronavírus bovino em animais adultos. As infecções por coronavirus bovino se caracterizam por dois dos sinais clínicos mais amplamente observados, além de muitas vezes negligenciados na rotina da clínica de bovinos: diarreia e corrimento nasal (RADOSTITS, 2000). Portanto, enfatiza-se a importância deste trabalho que inclui método diagnóstico definitivo para tais condições.

Esse trabalho relata surtos de disenteria de inverno em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul e descreve a reprodução experimental da doença em bovinos adultos. Além disso, salienta as alterações clínico-patológicas dos animais afetados, a pesquisa de patógenos nas fezes desses animais e demonstra a presença do coronavírus bovino através da técnica de imuno-histoquímica nos tecidos dos animais infectados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

No passado a disenteria de inverno foi associada com diversos agentes tais como *Campylobacter* (*Vibrio jejuni*), enterovírus (WD-42), parvovírus bovino, vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e da diarréia viral bovina (BVDV) (SAIF, 1990).

Desde a década de 70, vários trabalhos indicam o envolvimento do coronavírus nos surtos de disenteria de inverno pela detecção do vírus nas fezes de animais enfermos e/ou pelo acompanhamento da soroconversão dos animais durante os surtos (HORNER; HUNTER; KIRKBRIDE, 1975; TAKAHASHI *et al.*, 1980; ESPINASSE *et al.*, 1982; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; SAIF *et al.*, 1988a; SAIF *et al.*, 1991).

Reforçando o envolvimento do coronavírus bovino nesta doença, Van Kruiningen *et al.* (1987) demonstraram a presença do vírus nas lesões intestinais e Travén *et al.* (2001) reproduziram uma doença clínica comparável à disenteria de inverno em bovinos adultos a partir de material de casos naturais da doença.

No início desta década, o interesse pelo coronavírus aumentou consideravelmente devido sua associação com o agente etiológico de um processo respiratório agudo que afetou humanos no sudeste asiático. Esta síndrome respiratória ficou conhecida pela sigla em inglês SARS (síndrome respiratória aguda grave) (KSIAZEK *et al.*, 2003; REST; MINDELL, 2003).

### 2.2 Etiologia

A disenteria de inverno é causada pelo coronavírus bovino. Os coronavírus são classificados dentro da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*. O gênero *Coronavirus* é subdividido em três grupos (Grupo I, Grupo II e Grupo III) de acordo com os epítomos presentes nas glicoproteínas de envelope, sequências de nucleotídeos e hospedeiros naturais. O coronavírus bovino pertence ao Grupo II, juntamente com o coronavírus humano OC-43, coronavírus entérico humano 4408, vírus hemaglutinante da encefalomielite suína, vírus da hepatite murina, coronavírus equino, coronavírus respiratório canino e vírus da sialodacrioadenite (GONZÁLEZ *et al.*, 2003; MASTER, 2006).

Os coronavírus são vírus envelopados, com morfologia predominantemente esférica, diâmetro de aproximadamente 100-150 nm, entretanto apresentam alto pleomorfismo devido à presença de envelope formado por uma dupla camada de lipídeos. O capsídeo tem simetria helicoidal com predomínio da fosfoproteína N (nucleocapsídeo), envolvendo o genoma viral constituído por uma fita simples de RNA não segmentado e de polaridade positiva com 32 Kb (LAI; CAVANAGH, 1997; MASTER, 2006).

O envelope viral possui quatro ou cinco proteínas estruturais (M, Sm, HE, S e I) que se projetam de uma dupla camada lipídica e dão à partícula viral o aspecto de uma coroa (do latim *corona*) (RISCO *et al.* 1996). As proteínas do envelope estão relacionadas como as principais propriedades ligadas à infectividade, virulência e variabilidade viral. (LAI; CAVANAGH, 1997; BRANDÃO *et al.*, 2001).

A principal e mais proeminente proteína de envelope dos coronavírus é a proteína S (“spike”). Esta é responsável pela aparência espiculada da partícula viral com projeções de cerca de 20nm de comprimento, pela atividade hemoaglutinante, pela adsorção do vírus aos receptores da célula do hospedeiro e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes. É considerada também a proteína mais polimórfica dos coronavírus, organizada como dímeros ou trímeros. (COLLINS *et al.*, 1982; MASTER, 2006).

A proteína não-estrutural mais importante dos coronavírus é a RNA-replicase ou polimerase-RNA-dependente (Rp Rd), que é responsável pela transcrição e pela replicação viral. (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999; MASTER, 2006).

### **2.3 Epidemiologia**

O coronavírus bovino é responsável por outras duas síndromes, além da disenteria de inverno. A doença mais comumente causada pelo coronavírus em bovinos é a diarreia neonatal, que afeta animais entre 2 a 30 dias, e normalmente está associada a outros agentes como o rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* sp. e *Cryptosporidium parvum*. (SNODGRASS *et al.*, 1986). Um processo patológico no trato respiratório superior causado pelo coronavírus bovino, caracterizado por tosse, febre, descarga nasal serosa a mucopurulenta e inapetência foi observado em bezerros

não neonatos com menos de seis meses de idade e em bovinos em confinamento (MCNULTY *et al.*, 1984; HECKERT *et al.*, 1990; HECKERT *et al.*, 1991; LATHROP *et al.*, 2000). O vírus tem sido associado também a uma nova apresentação clínica de disenteria em bovinos adultos durante estações quentes (PARK *et al.*, 2006; DECARO *et al.*, 2008). Além dessas apresentações, há um relato de transmissão acidental do coronavírus bovino para um humano (STORZ; ROTT, 1981).

Apesar da sua participação nas diferentes formas clínicas, apenas pequenas variações entre amostras causadoras de diarreia em bezerros, disenteria de inverno e a síndrome respiratória tem sido reportados (CHOULJENKO *et al.*, 1998). Além disso, apenas um sorotipo de coronavírus bovino foi identificado, embora os dados obtidos em estudos sorológicos com anticorpos monoclonais e policlonais sugiram a existência de diferenças sorológicas entre subtipos do coronavírus bovino (TSUNEMITSU; SAIF, 1995). Animais que se recuperam de infecções com amostras de coronavírus bovino, tanto em quadros de diarreia em bezerros, disenteria de inverno, ou síndrome respiratória, foram protegidos contra coronavírus após a exposição a um desafio com amostras heterólogas ou homólogas de coronavírus (CHO *et al.*, 2001), o que sugere a existência de apenas um sorotipo de coronavírus bovino. Reforçando essa hipótese, Travén *et al.* (2001) reproduziram uma doença clínica comparável à disenteria de inverno em vacas e bezerros soronegativos para o vírus com material de casos naturais da doença.

O vírus é transmitido pela ingestão de alimentos ou água contaminados com fezes ou secreções respiratórias. Após um período de incubação 3-7 dias, há o início do surto de diarreia. Em um rebanho, os reservatórios do agente podem ser bezerros com a doença clínica ou vacas e bezerros com a infecção subclínica, visto que antígenos do coronavírus bovino têm sido encontrados em fezes de bovinos adultos normais, sugerindo que os adultos podem ser o reservatório e transmissores persistentes do coronavírus dentro do rebanho (CROUCH; ACRES, 1984b; RADOSTITS *et al.*, 2000). Coronavírus bovino foi identificado também em amostras de fezes de ruminantes silvestres em cativeiro e em vida livre, o que os caracteriza como possíveis reservatórios do agente (TSUNEMITSU *et al.*, 1995).

A disenteria de inverno afeta principalmente gado leiteiro (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF *et al.*, 1988a; SAIF, 1990; SAIF *et al.*, 1991; TRAVÉN *et al.*, 1993; NATSUAKI *et al.*, 2007),

mas também foi descrita em gado de corte manejado a campo (ESPINASSE *et al.*, 1982) ou em confinamentos (CHO *et al.*, 2000).

As vacas jovens são mais frequentemente afetadas e a doença tende a ser mais intensa em vacas prenhes ou recém paridas com altos índices de produção de leite (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990).

Usualmente a infecção apresenta morbidade alta (50-100%) e mortalidade baixa (0-2%) e os relatos de afecção em bezerros durante os surtos são contraditórios (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007).

Rebanhos com história anterior de disenteria de inverno são mais propensos a sofrer novos casos da doença, possivelmente, devido à presença de animais portadores (CLARK, 1993, SMITH *et al.*, 1998). Os surtos ocorrem em intervalos médios de 3 a 4 anos, em uma mesma propriedade (TRAVEN *et al.*, 1993).

Vários fatores predisponentes para o aparecimento da disenteria de inverno são descritos, mas as quedas bruscas de temperatura são os mais comuns. Os coronavírus sobrevivem melhor a baixas temperaturas e em baixa intensidade de luz ultravioleta. Portanto, níveis mais elevados de contaminação ambiental ocorrem no inverno (ROBERTS, 1957; CLARK, 1993; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978). Fatores estressantes, práticas de manejo, mudanças bruscas de dieta, confinamento, ingestão de água com baixa temperatura, lactação e gestação também são fatores predisponentes (CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; SAIF, 1990; SMITH *et al.*, 1998). O estado imunológico do animal e as infecções associadas ao coronavírus bovino com outros microrganismos podem contribuir para o aparecimento e severidade da doença (SMITH *et al.*, 1998).

Um estudo sorológico realizado em rebanhos leiteiros na Suécia, área endêmica para o coronavírus bovino, mostrou que propriedades com sistemas de produção orgânica apresentam menor soro prevalência do coronavírus bovino do que propriedades convencionais. Com isso, foi sugerido que a gestão agrícola orgânica pode ser mais eficaz na redução da soro prevalência do coronavírus em comparação com métodos convencionais de agricultura (BIDOKHTI *et al.*, 2008).



## 2.4 Patogenia

A patogênese da disenteria de inverno não está completamente compreendida. Dados acerca da patogenia são baseados em infecções experimentais em bezerros infectados com amostras de coronavírus bovino de episódios de disenteria de inverno (PARK. *et al.*, 2007). Em um recente estudo, Park *et al.* (2007) demonstraram o tropismo e ação destrutiva do coronavírus bovino da disenteria de inverno sobre o intestino delgado, grosso e trato respiratório em bezerros que não ingeriram colostro. Inicialmente, os animais apresentaram atrofia progressiva das vilosidades do intestino delgado e, posteriormente, lesões nas criptas do intestino grosso, além de dano nas células epiteliais dos cornetos nasais, traquéia, pulmão e pneumonia intersticial (PARK *et al.*, 2007).

O coronavírus bovino foi identificado primeiramente no intestino delgado e posteriormente no trato respiratório no mesmo dia em que foi detectado transitoriamente nas amostras de soro, o que sugere que o coronavírus bovino induza viremia após prévia lesão intestinal (PARK *et al* 2007). É possível que o coronavírus bovino penetre a barreira do intestino após a destruição dos enterócitos nas vilosidades, exponha a membrana basal, atinja o sistema circulatório e se espalhe para os cornetos nasais, traquéia e pulmões com a replicação no epitélio (AZEVEDO *et al.*, 2005).

O mecanismo do efeito citopático causado pelo coronavírus bovino nas células epiteliais do trato intestinal e respiratório são pouco compreendidos (KYUWA *et al.*, 1994). Algumas cepas de coronavírus da hepatite em ratos apresentam uma rápida redução nos níveis de RNAm de actina, cuja proteína interage com os microtúbulos. Como consequência, o vírus induz uma imparidade dos filamentos de actina com os microtúbulos, perdendo sua conexão com a membrana plasmática, cobrindo as microvilosidades e cílios, resultando na perda dos mesmos (PARK *et al* 2007). Além disso, algumas cepas de coronavírus relacionadas à gastroenterite transmissível dos suínos têm a capacidade de induzir apoptose das células (AN *et al* 1999). Portanto, é possível que a perda de microvilosidades e cílios induzida pelo coronavírus bovino da disenteria de inverno no aparelho digestivo e vias respiratórias ocorra através de mecanismos semelhantes (PARK *et al* 2007).

## 2.5 Sinais clínicos e diagnóstico diferencial

A síndrome clínica inclui disenteria profusa de surgimento agudo, fezes esverdeadas com estrias de sangue, sanguinolentas ou marrom-escuras e acentuada redução da produção de leite. Corrimento nasolacrimal mucoso, por vezes com estrias de fibrina e tosse, pode acompanhar ou preceder a diarreia. Outros sinais incluem cólica leve, desidratação, depressão, breve período de anorexia, diminuição da condição corporal e polidipsia compensatória. A motilidade rumenal está geralmente reduzida, mas os borborigmos intestinais podem estar aumentados. Frequentemente, a recuperação espontânea dos animais ocorre em poucos dias e, no rebanho, a duração da doença é de algumas semanas. Porém, a produção de leite pode não voltar ao normal durante vários meses. Quando a doença aparece, 5% a 10% do rebanho estão doentes e esses animais apresentarão os sinais clínicos mais graves. No segundo dia, 30% a 50% do rebanho estão afetados e, no terceiro dia, a morbidade pode chegar a 100%. (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978, VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007).

Os animais acometidos podem apresentar aumento de temperatura retal (39,5 - 40,5°C) dois dias antes do aparecimento dos sinais clínicos, os quais quando aparecem, cursam com temperatura usualmente normal. (ROBERTS, 1957; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; TRÁVEN *et al.*, 1993).

Não são observadas alterações hematológicas consistentes, as quais representem benefícios diagnósticos. Em animais severamente afetados, pode-se observar anemia, devida à hemorragia massiva no trato intestinal (NATSUAKI *et al.*, 2007; MURRAY; SMITH, 2002).

Os principais diagnósticos diferenciais dessa enfermidade são causas de diarreia de curso abrupto e curto em bovinos adultos e incluem infecção aguda pelo BVDV, salmonelose, coccidiose, diarreia dietética e deficiência de cobre (RADOSTITS *et al.*, 2000; MURRAY; SMITH, 2002).

## 2.6 Achados de necropsia e histopatológicos

Durante a necropsia de animais que morrem de disenteria de inverno se pode observar avermelhamento na mucosa do abomaso e, no intestino delgado, há hiperemia

segmentar, graus variáveis de dilatação e flacidez com conteúdo liquefeito e esverdeado. O cólon espiral pode estar vazio ou preenchido por grandes coágulos de sangue. Na mucosa, visualizam-se inúmeras petéquias, por vezes com arranjo linear de forma irregular sobre as placas linfóides do cólon, ou em fileiras paralelas ao longo das pregas da mucosa colônica. As mucosas oral e ocular usualmente estão pálidas e pode haver retração do globo ocular devido à desidratação (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; NATSUAKI *et al.*, 2007).

Microscopicamente, as principais lesões se localizam no cólon, principalmente na alça espiral. As criptas se apresentam dilatadas, com necrose do epitélio de revestimento e preenchidas por agregados de células degeneradas em picnose, cariorrexe, degeneração hidrópica e em gota hialina. Núcleos semelhantes fragmentados e picnóticos também ocorrem na lâmina própria e no epitélio de revestimento de criptas afetadas (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; NATSUAKI *et al.*, 2007).

## 2.7 Diagnóstico

Infecção pelo coronavírus bovino pode ser diagnosticada por detecção do vírus ou antígenos virais em tecidos, excreções e secreções de animais infectados. Para tal, as técnicas que têm sido empregadas incluem microscopia eletrônica direta (SAIF *et al.*, 1991; ATHANASSIOUS *et al.*, 1994; DAR; KAPIL; GOYAL, 1998), ensaio imunoenzimático (ELISA) (ATHANASSIOUS *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1996; CHO *et al.*, 2000; JEONG *et al.*, 2005), hemaglutinação/inibição da hemaglutinação, (BRANDÃO *et al.*, 2002), RT-PCR (JEONG *et al.*, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2007a; BRANDÃO *et al.*, 2007b; NATSUAKI *et al.*, 2007), imuno-microscopia eletrônica (ATHANASSIOUS *et al.*, 1994; CHO *et al.*, 2000; JEONG *et al.*, 2005a), isolamento viral *in vitro* (SAIF, 1990; JEONG *et al.*, 2005a; NATSUAKI *et al.*, 2007), hibridização *in situ* (ZHANG *et al.*, 1997), imunofluorescência (DAR; KAPIL; GOYAL, 1998) e imuno-histoquímica (ZHANG *et al.*, 1997; NATSUAKI *et al.*, 2007).

O diagnóstico laboratorial das coronaviroses iniciou com a microscopia eletrônica de coloração negativa. Porém, devido ao alto grau de polimorfismo das partículas virais e a presença de partículas membranosas pleomórficas no conteúdo fecal que lembram o coronavírus, houve a introdução da imuno-microscopia eletrônica, com

a utilização de anticorpos específicos para agregação das partículas virais, aumentando tanto a sensibilidade, quanto a especificidade do teste (CLARK, 1993; HERCKERT; SAIF; AGNES, 1989).

ELISA utilizando um *pool* de anticorpos monoclonais contra coronavírus bovino se mostrou sensível e específico para a detecção do coronavírus bovino nas fezes de animais (CROUCH; RAYBOULD; ACRES, 1984a; SMITH, 1996). Tal teste tem a vantagem de ser aplicável em um grande número de amostras, porém, em um estudo (SMITH *et al.*, 1998) foi menos sensível do que a imuno-microscopia eletrônica para a detecção de coronavírus bovino em casos de diarreia de inverno, possivelmente devido à interferência pela presença generalizada de anticorpos para coronavírus bovino nos animais adultos utilizados.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) para diagnóstico de coronaviroses é de alta sensibilidade e especificidade. Para tal, têm sido empregados *primers* dirigidos ao gene codificador das proteínas M, S e da RNA-polimerase RNA-dependente. Esta apresenta alta identidade entre as amostras, evitando diagnósticos falsos negativos (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999; BRANDÃO 2007a).

Para o isolamento do coronavírus bovino é necessário cultivo celular. Os primeiros isolamentos do coronavírus bovino foram realizados em células renais primárias de bezerro, incluindo linhas de células Vero, Madin-Darby de rim bovino (MDBK), além de células de adenocarcinoma retal humano (HRT-18G). As células da linhagem HRT-18G têm sido as mais utilizadas para o isolamento do coronavírus em casos de disenteria de inverno. Apesar da metodologia laboriosa, o isolamento do coronavírus bovino é importante, pois proporciona uma caracterização da amostra e a formação de um banco de dados (SAIF *et al.*, 1988b; BENFIELD; SAIF, 1990; TSUNEMITSU; SAIF, 1995).

Anticorpos para coronavírus bovino têm sido quantificados por diversos métodos a partir de amostras de soro. Provas de soro-neutralização do vírus, usando como referência amostras de coronavírus bovino Mebus e amostras de campo podem ser realizadas utilizando culturas de células MDBK ou HRT-18 (SAIF, *et al.*, 1988b; BENFIELD; SAIF, 1990; TSUNEMITSU; SAIF, 1995a; TSUNEMITSU, *et al.* 1995b). Testes de ELISA também foram desenvolvidos para detectar anticorpos de coronavírus bovino em amostras de soro de animais e sua sensibilidade e especificidade foram confirmadas em vários estudos (HECKERT; SAIF; AGNES, 1990; HECKERT, *et al.* 1991; SMITH, *et al.* 1998; LATHROP, *et al.* 2000). Por apresentar uma ampla

distribuição em diversos rebanhos, anticorpos contra coronavírus bovino são identificados em vários animais, assim é necessária a avaliação de amostras pareadas de soro de animais enfermos (coletados durante a fase aguda da doença e após duas a quatro semanas) para realização de diagnóstico sorológico (HECKERT; SAIF; AGNES, 1990; HECKERT, *et al.* 1991; CLARK, 1993).

Para demonstração do coronavírus bovino em tecidos têm sido utilizadas técnicas como a imunofluorescência em cortes de congelamento, imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e microscopia eletrônica em tecidos fixados em formol e embebidos na parafina (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; ZHANG, *et al.* 1997; DAR; KAPIL; GOYAL, 1998; NATSUAKI *et al.*, 2007).

## **2.8 Tratamento e controle**

O tratamento da doença é duvidoso, pois parece recuperar espontaneamente em até três dias. A antibioticoterapia pode evitar infecções secundárias e a aplicação de fluidoterapia / eletrólitos pode reverter animais severamente desidratados. Devido à natureza insidiosa e à falta de informações quanto aos fatores predisponentes, medidas de controle são pouco conhecidas. Entretanto medidas apropriadas gerais de manejo nutricional (nutrição adequado e alterações de dietas lentas e gradativas), ambiental (ambientes limpos e secos, nos quais não haja contato entre rebanhos diferentes) e sanitário (programas básicos de vacinas, vermífugos e parasiticidas) devem ser estabelecidas. Recomenda-se o cuidado com a disseminação da infecção através de botas, utensílios de alimentação, ou de manejo das camas de confinamentos. Mesmo os maiores cuidados com tais medidas não parecem prevenir a disseminação da doença em um rebanho (RADOSTITS, 2000).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Surto 1

Dados epidemiológicos e sinais clínicos da enfermidade foram obtidos com o proprietário e o veterinário do rebanho durante visita à propriedade. Amostras de tecidos foram coletadas durante a necropsia de um animal que morreu pela doença (Bovino 1), fixadas em formol a 10% tamponado por 24 a 48 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992).

Fragmentos de cólon ascendente na altura da alça espiral (cólon espiral), cólon descendente, ceco, íleo, jejuno, duodeno, linfonodos mesentéricos e pulmão foram submetidos ao teste de imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino (8F2) na diluição de 1:300 em Phosphate Buffered Saline (PBS) (incubados em câmara úmida em “overnight” a 4°C), empregando-se o método streptavidina-biotina (LSAB). Foram feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath), secadas verticalmente em temperatura ambiente, antes de aquecê-las em estufa a 60°C por 3 a 4 horas. Após os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por 20 minutos em temperatura ambiente e lavados em água destilada três vezes por dois minutos. Para recuperação antigênica, utilizou-se solução de tampão citrato (2,1 gramas de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%) por 20 minutos em banho-maria à 100°C. Para a diminuição das ligações inespecíficas (*background*), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. O cromógeno utilizado foi VECTOR®NovaRED durante 5 minutos. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações crescente de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co., Staint Louis, USA). O anticorpo foi obtido comercialmente da empresa Rural Technologies Inc., South Dakota, EUA.

Simultaneamente, cortes de cólon espiral com lesão foram incubados com PBS e cortes de cólon espiral sem lesão, com anticorpo para coronavírus bovino (8F2), como controles. Fragmentos de orelha e de intestino foram submetidos ao teste imunohistoquímico com anticorpo monoclonal anti-BVDV (15CS Syracuse) na diluição de 1:500 pelo método streptavidina-biotina. Para recuperação antigênica, foi utilizado Protease XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma, Chemical Co., St Louis, Mo) a 0,005% em PBS por 15 minutos em câmara úmida. VECTOR®NovaRED foi o cromógeno utilizado (NAAJ *et al.*, 2000; SCHMITZ, 2006). Controles positivos foram inseridos simultaneamente (SCHMITZ, 2006). Amostras de fezes foram colhidas do reto de dois animais afetados (Bovinos 1 e 2) para exame bacteriológico aeróbico, para *Salmonella* sp. em meio específico (KONEMAN *et al.*, 2001) e exame parasitológico incluindo contagem de ovos (opg) e oocistos por grama de fezes (oopg) (UENO; GONÇALVES, 1998). Variações da temperatura nos dias da ocorrência do surto foram obtidas no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET 2007). Sangue de uma vaca afetada (Bovino 2) foi coletado 3 dias após o início do quadro clínico para hemograma.

Para a pesquisa de coronavírus bovino, amostras fecais dos bovinos 1 e 2 foram inicialmente preparadas como suspensões a 20% (v/v) em água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocarbonato (água DEPC) e clarificadas por centrifugação a 12.000 x g/30min a 4°C. A seguir, aplicou-se uma reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase nested (nested RT-PCR) para a amplificação de um segmento de 136 pares de bases (pb) do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) conforme descrito por Brandão *et al.*, 2007a, utilizando-se como controle positivo a amostra Kakegawa de coronavírus bovino (AKASHI *et al.*, 1980) e, como negativo, água DEPC. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

### 3.2 Surto 2

Dados epidemiológicos e sinais clínicos da enfermidade foram obtidos durante visita a propriedade através de observação do rebanho e com o proprietário e o veterinário responsável. Fezes do reto e secreção nasal foram colhidas de 13 animais afetados, destes 8 animais do lote de alta produção (bovinos 3 a 10) e 5 animais do lote

de baixa produção (bovinos 11 a 15). A temperatura retal dos 13 animais foi aferida. Amostras de fezes foram encaminhadas para realização de exame bacteriológico aeróbico, para *Salmonella* sp. em meio específico (KONEMAN *et al.*, 2001), exame parasitológico incluindo contagem de ovos (opg) e oocistos por grama de fezes (oopg) (UENO; GONÇALVES, 1998). Secreção nasal e fezes foram submetidas à pesquisa de coronavírus bovino pela técnica de *nested* RT-PCR, utilizando o protocolo anteriormente descrito. Amostras de sangue foram coletadas dos 13 animais durante o surto, para realização de hemograma e para obtenção de soro. Vinte e cinco dias após a primeira visita foram coletadas novas amostras de sangue dos 13 animais para realização de sorologia pareada para diarreia viral bovina (BVD). As amostras pareadas de soro foram encaminhadas para o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria para diagnóstico sorológico de BVD pela prova de soro-neutralização (RIDPATH; FLORES, 2007). Variações da temperatura nos dias da ocorrência do surto foram obtidas no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET 2007).

### 3.3 Reprodução Experimental

Amostras de fezes colhidas do reto de um animal que apresentava diarreia sanguinolenta durante o surto 1 (Bovino 2) foram misturadas, em proporções de 1:1, com dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% em PBS, então conservadas a temperatura de -20°C. Para reprodução experimental, inoculou-se 100 ml dessa solução no rúmen (por sonda gástrica) e 3ml em cada narina de três bovinos fêmeas, da raça Hereford de 20 meses (Bovino 16, 17 e 18) conforme metodologia descrita por Travén *et al.*, 2001.

Os animais foram mantidos em baias de alvenaria, com água, feno e ração à vontade e inspecionados diariamente. Coletaram-se amostras de fezes diariamente do reto, antes da infecção experimental e até a eutanásia dos animais (realizada com barbitúricos). Acondicionaram-se as fezes em recipientes plásticos fechados, identificados e submetidos a exame bacteriológico aeróbico, para *Salmonella* sp. (KONEMAN *et al.*, 2001) parasitológico incluindo contagem de ovos (opg) e oocistos por grama de fezes (oopg) (UENO; GONÇALVES, 1998) e para pesquisa de coronavírus através da técnica de RT-PCR (BRANDÃO *et al.*, 2007a) descrita acima. Amostras de sangue foram coletadas diariamente para realização de hemograma e adicionalmente foi aferida a temperatura retal dos animais. Coletaram-se amostras de



tecidos durante a necropsia dos três animais (bovino 16, 17 e 18), fixadas em formol a 10% tamponado, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992).

Fragmentos de cólon ascendente na altura da alça espiral (cólon espiral), cólon descendente, ceco, íleo, jejuno, duodeno, linfonodos mesentéricos, corneto nasal e pulmão foram submetidos ao teste de imuno-histoquímico para coronavírus bovino utilizando o protocolo descrito acima. Realizou-se teste imuno-histoquímico em fragmentos de orelha e de intestino com anticorpo monoclonal anti-BVDV (15CS Syracuse) utilizando o protocolo citado acima.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Surto 1

Em uma propriedade rural localizada no município de Viamão, Rio Grande do Sul, durante o mês de abril de 2006, dez de um total de 24 vacas leiteiras adultas apresentaram diarreia profusa sanguinolenta. Destes, uma vaca de 7 anos morreu (Bovino 1). Todas as dez vacas que apresentaram diarreia eram mantidas separadas do resto do rebanho em um piquete com pastagem de milheto (*Pennisetum glaucum*) de melhor qualidade, por apresentarem melhores índices de produção leiteira. As demais ficavam em outro piquete de campo nativo, mas todo rebanho era suplementado (silagem de milho, bagaço de malte e ração comercial) no mesmo cocho, durante a ordenha. A ordenha dos dois grupos de animais era feita separadamente. Os animais foram imunizados previamente contra febre aftosa, brucelose, leptospirose, carbúnculo hemático e BVD.

A diarreia, de surgimento agudo, foi inicialmente acompanhada por graus variáveis de depressão e se apresentou esverdeada com muco e, às vezes, foi acompanhada de estrias de sangue e se tornou sanguinolenta ou marrom-escura (Figura 1). Os sinais persistiram por aproximadamente cinco dias e foram mais evidentes do segundo ao quarto dias. Verificou-se, nesse período, diminuição de cerca de 50% na produção de leite e na ingestão de alimentos. Durante o surto, não foi observada diarreia nos bezerros.

Na necropsia da vaca que morreu pela diarreia (Bovino 1), observou-se palidez das mucosas oral, oculares e vaginal. Havia desidratação acentuada caracterizada por olhos no fundo das órbitas e perda da elasticidade da pele. Conteúdo sanguinolento e grande quantidade de coágulos foram encontrados no intestino grosso, principalmente no cólon espiral e com petéquias na mucosa (Figura 2).



**Figura 1** – Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino 2 apresentando diarreia sanguinolenta.

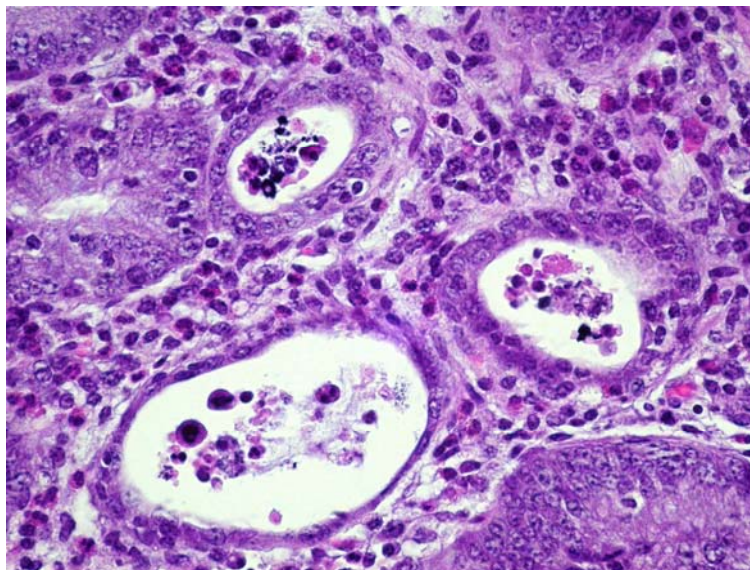


**Figura 2** – Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino1. Cólon distendido por coágulos de sangue presente no lúmen.

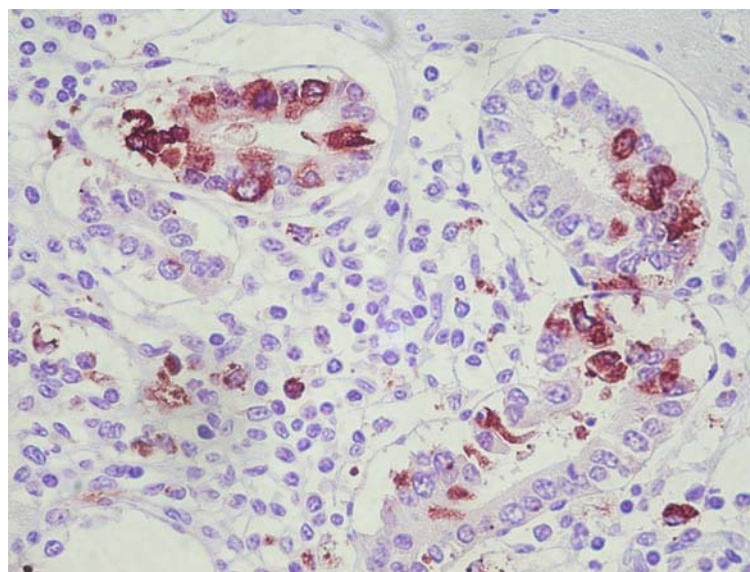
Os principais achados histológicos foram vistos no cólon espiral e consistiram de grande número de criptas dilatadas, desnudas ou revestidas por um epitélio pavimentoso e/ou cuboidal, por vezes, com núcleos grandes e nucléolos proeminentes. Algumas criptas estavam preenchidas por debris necróticos e polimorfonucleares (Figura 3). Na lâmina própria havia infiltrado inflamatório moderado, constituído predominantemente por linfócitos e, em menor número, por macrófagos, plasmócitos e eosinófilos. Na submucosa foi observado infiltrado semelhante, porém de menor intensidade. Não houve crescimento bacteriológico significativo e os exames parasitológicos de opg e oopg não foram expressivos.

Na imuno-histoquímica anti-coronavírus bovino (8F2), somente em cortes do cólon espiral houve marcações, as quais foram mais evidentes no citoplasma de enterócitos das criptas, nos debris necróticos e em macrófagos na lâmina própria (Figura 4). Não houve marcação nos fragmentos de orelha e intestinos submetidos à imuno-histoquímica anti-BVDV. A temperatura do ambiente durante a semana do surto variou de 24°C a 16°C e não houve chuvas (INMET-2007). O hemograma de uma vaca afetada (Bovino 2) revelou anemia (hematócrito 19%) normocítica, normocrômica e leucocitose (leucócitos totais 20700/mm<sup>3</sup>) com neutrofilia (7245/mm<sup>3</sup> de segmentados) e linfocitose (linfócitos 12627/mm<sup>3</sup>). Os neutrófilos apresentavam evidências de toxicidade.

As duas amostras fecais (Bovinos 1 e 2) foram positivas para a *nested* RT-PCR para a detecção de coronavírus bovino, tendo resultado na produção da banda esperada de 136pb, bem como a amostra padrão Kakegawa, sendo que nos controles negativos não se evidenciou qualquer banda.



**Figura 3** - Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino 1. Cólon espiral. Criptas dilatadas, revestidas por epitélio pavimentoso ou cuboidal e preenchidas por debris necróticas e infiltrado mononuclear com eosinófilos na lâmina própria. Coloração de hematoxilina e eosina, Obj. 40.



**Figura 4** - Disenteria de inverno. Surto 1. Bovino 1. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando no cólon espiral antígenos virais em enterócitos, macrófagos e debris necróticos no lúmen das criptas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 40.

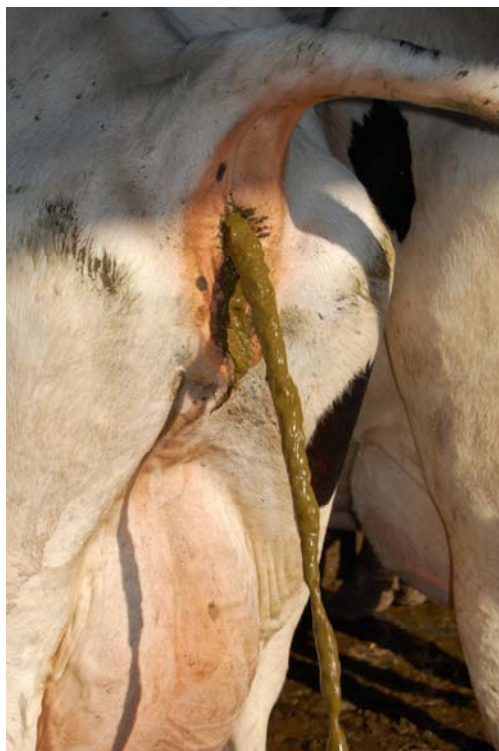
## 4.2 Surto 2

No final de outubro de 2007, em uma propriedade rural localizada no município de Vespasiano Corrêa, Rio Grande do Sul, 90% dos animais de um rebanho composto por 130 bovinos leiteiros apresentaram graus variáveis de diarreia e secreção nasal. Dos 130 animais, 72 estavam em lactação e eram divididos em dois lotes de 36 animais cada, de alta e baixa produção. Os demais animais do rebanho, 11 vacas em período seco, 32 novilhas e bezerras até sete meses, permaneciam, cada lote, em outros piquetes de campo nativo, não mantinham contato com o lote em produção. Animais em lactação eram suplementados com silagem de sorgo, bagaço de laranja, feno de azevém e concentrado comercial (LACTOBOV – Tortuga) (3,5kg / animal do lote de baixa produção e 9,5kg / animal do de alta). A silagem de sorgo e o bagaço da laranja foram incluídos na dieta dos animais 12 dias antes do início da enfermidade. Os animais receberam vacinas contra febre aftosa, brucelose, leptospirose, carbúnculo hemático e BVD.

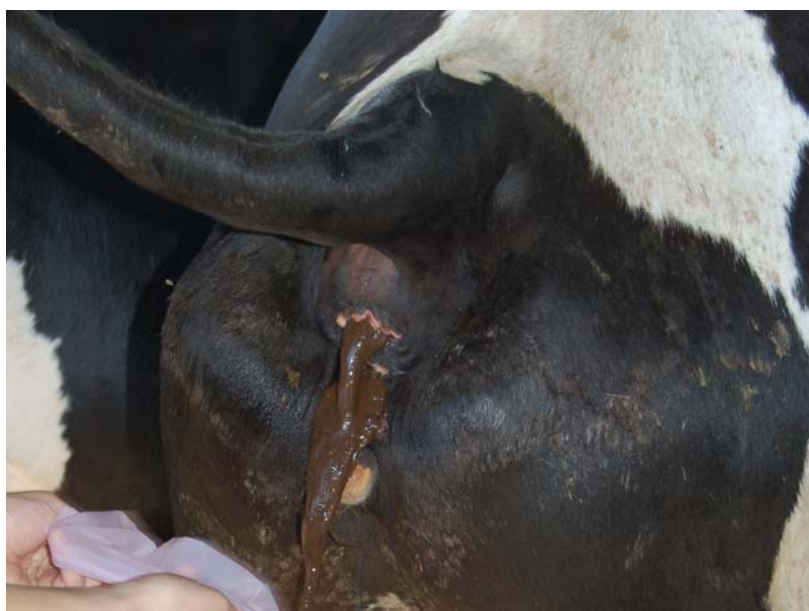
Os animais do lote de alta produção foram os primeiros a manifestar sinais clínicos, caracterizados por amolecimento das fezes no primeiro dia e diarreia aquosa esverdeada (Figura 5) e com muco até o terceiro dia, quando então, também passaram a apresentar estrias de sangue nas fezes. No quinto dia, os animais estavam com diarreia marrom-escura (Figura 6) ou sanguinolenta (Figura 7) que durava em média 2 dias. Todos os animais se recuperaram espontaneamente. Secreção nasal mucosa, por vezes com estrias de fibrina (Figura 8) e acompanhada de tosse foram vistas nesses animais.

Os animais do lote de baixa produção manifestaram os mesmo sinais clínicos, após 3 dias do início da doença no lote de alta produção; porém sangue vivo nas fezes não foi observado. O restante do rebanho (vacas secas, novilhas e bezerras) apresentou amolecimento das fezes e secreção nasal mucosa. Amostras de sangue, fezes e secreção nasal foram colhidas e a temperatura retal aferida no quarto dia de doença no lote de alta produção e, no segundo dia, no lote de baixa produção. Os valores de hemograma, leucograma e temperatura retal dos animais do surto 2 estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Durante esse surto, houve queda de cerca de 25% na produção de leite. Após 45 dias do início do surto, a produção de leite ainda estava defasada em 10%.





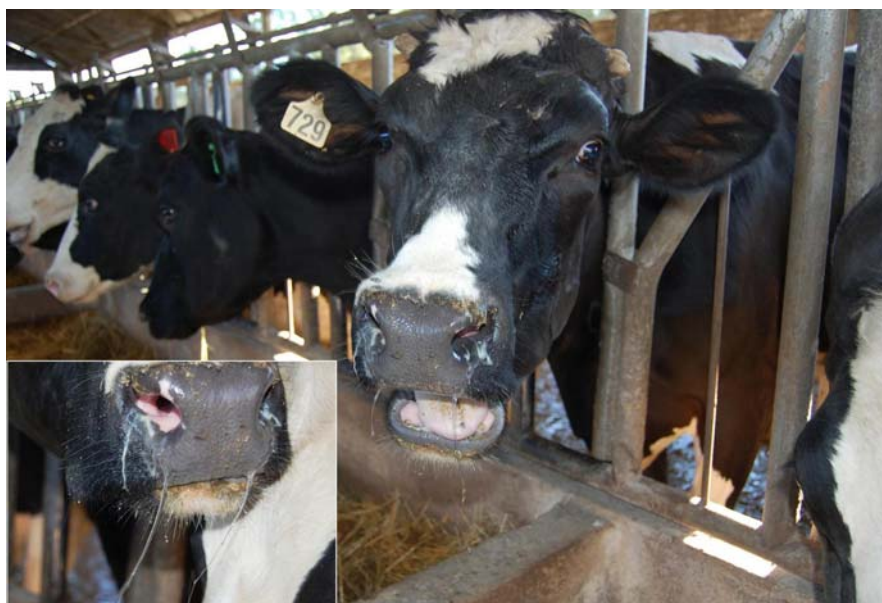
**Figura 5** - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino apresentando diarreia líquida e esverdeada.



**Figura 6** - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino apresentando diarreia de coloração marrom escura.



**Figura 7** - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino apresentando diarreia sanguinolenta.



**Figura 8** - Disenteria de inverno. Surto 2. Bovino com corrimento nasal seroso com estrias de fibrina (detalhe).



**Tabela 1-**Achados hematológicos dos bovinos com disenteria de inverno do surto<sup>2</sup>.

Amostras	Ht	Hb	Ppt	Eritrócitos	VCM	CHCM
	%	%	g/L	X 10 <sup>6</sup> /uL	fL	%
	24 a 46	8 a 15		5 a 10	40 a 60	30 A 36
3	28	8,7	80	6,13	45,68	31,07
4	32	9,8	82	6,87	46,58	30,63
5	29	9,5	82	5,69	50,97	32,76
6	29	8,8	80	5,34	54,31	30,34
7	29	8,6	82	7,21	40,22	29,66
8	29	9,8	82	7,11	40,79	33,79
9	24	8,0	80	5,40	44,44	33,33
10	32	9,8	82	5,39	59,37	30,63
11	31	10,2	86	6,49	47,77	32,90
12	28	8,9	82	5,89	47,54	31,79
13	33	8,8	84	7,48	44,12	26,67
14	30	9,2	84	6,15	48,78	30,67
15	30	8,6	78	5,70	52,63	28,67

Ht (hematócrito), Ppt (proteína plasmática total), Et (eritrócitos totais), Hb (hemoglobina), VCM (volume corpuscular médio), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média).

**Tabela 2** - Leucograma dos bovinos com disenteria de inverno no surto2.

Bovinos	LT		NS		NB		EO		BASO		LINF		MONO	
	/uL	%	/uL	%	/uL	%	/uL	%	/uL	%	/uL	%	/uL	%
	4000 a 12000	600 a 4000	0 a 4000	0 a 1200	0 a 2400	0 a 200	2500 a 7500	0 a 840						
<b>3</b>	5500	18	990	0	0	3	165	0	0	63	3465	16	880	
<b>4</b>	4400	19	836	0	0	8	352	0	0	69	3036	4	176	
<b>5</b>	5900	42	2478	0	0	1	59	0	0	53	3127	4	236	
<b>6</b>	5000	36	1800	0	0	1	50	0	0	59	2950	4	200	
<b>7</b>	2200	33	726	0	0	5	110	0	0	52	1144	10	220	
<b>8</b>	4700	39	1833	0	0	5	235	0	0	46	2162	10	470	
<b>9</b>	8700	15	1305	0	0	0	0	0	0	77	6699	8	696	
<b>10</b>	4400	25	1100	0	0	0	0	0	0	65	2860	10	440	
<b>11</b>	2300	33	759	0	0	1	23	0	0	50	1150	16	368	
<b>12</b>	3700	26	962	0	0	18	666	0	0	49	1813	7	259	
<b>13</b>	4800	41	1968	0	0	5	240	0	0	43	2064	11	528	
<b>14</b>	3200	37	1184	0	0	8	256	0	0	45	1440	10	320	
<b>15</b>	5900	24	1416	0	0	8	472	0	0	56	3304	12	708	

LT (leucócitos totais), NS (neutrófilos segmentados), NB (neutrófilos em bastão), EO (eosinófilos), BASO (basófilos), LINF (linfócitos), MONO (monócitos)

**Tabela 3** – Temperatura retal\* dos bovinos afetados por disenteria de inverno no surto 2.

<b>Lote de alta produção</b>		<b>Lote de baixa produção</b>	
<b>Bovinos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Bovinos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
3	39,0	11	38,2
4	38,3	12	40,8
5	38,6	13	39,0
6	38,5	14	38,3
7	38,8	15	40,5
8	39,1		
9	38,7		
10	38,3		

\* Temperatura registrada no turno da tarde, após 15h00min.

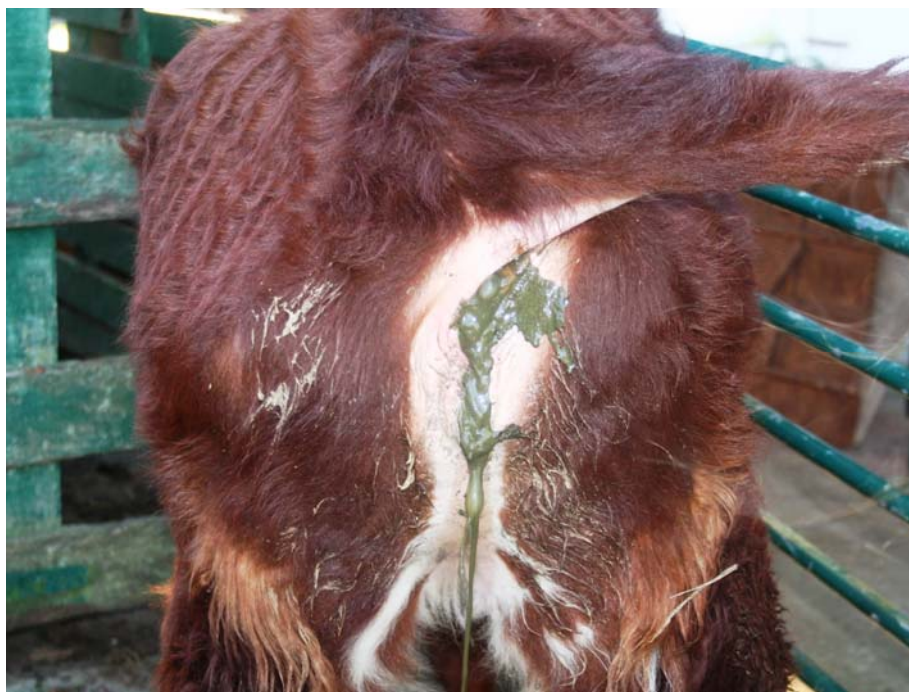
Nenhum dos 13 animais (bovinos 3 a 15) apresentou soroconversão para BVD. Adicionalmente, não houve crescimento bacteriológico significativo nas amostras de fezes e os exames parasitológicos de opg e oopg não foram expressivos, variando de índices não detectáveis a 300.

As treze amostras fecais e de secreção nasal (Bovinos 3 a 15) foram positivas para a *nested* RT-PCR para a detecção de coronavírus bovino, tendo resultado na produção da banda esperada de 136pb, bem como a amostra padrão Kakegawa, sendo que nenhuma banda foi evidenciada nas reações referentes aos controles negativos.

### 4.3 Reprodução experimental

Os bovinos 16 e 17 infectados experimentalmente manifestaram diarreia líquida e esverdeada (Figura 9) 5 dias após a inoculação. Leve aumento na temperatura foi constatado apenas nos bovinos 16 e 17 (Tabelas 5, 6 e 7). O bovino 18 foi eutanasiado 5 dias após a inoculação sem manifestar sinais clínicos; também não foram visualizadas alterações macroscópicas, microscópicas, nem marcação na imuno-histoquímica anti-coronavírus bovino (8F2). O bovino 16 foi eutanasiado um dia após iniciar a diarreia e o bovino 17, dois dias após, quando não apresentava mais as fezes líquidas. As principais alterações macroscópicas nos bovinos 16 e 17 foram hiperemia em partes do cólon espiral, duodeno, jejuno e íleo; conteúdo esverdeado líquido em todo o intestino grosso, acrescido de muco no final do cólon. Na análise histológica (bovino 16 e 17), o cólon espiral tinha moderado número de criptas dilatadas, desnudas ou revestidas por um epitélio pavimentoso, algumas eram preenchidas por debris necróticos e polimorfonucleares (Figura 10). Havia também moderada e multifocal proliferação de

enterócitos das criptas (aumento na celularidade e freqüentes mitoses) e infiltrado inflamatório moderado constituído predominantemente por linfócitos e, em menor número, por macrófagos e eosinófilos na lâmina própria do cólon espiral. Lesões semelhantes, porém mais discretas foram observadas no íleo, ceco e cólon descendente, neste último, de forma mais intensa que nos anteriores. No epitélio dos cornetos nasais, observou-se multifocais áreas de necrose leve, caracterizada por vacuolização e picnose nuclear. As amostras fecais dos bovinos 16, 17 e 18 foram negativas para a *nested* RT-PCR para a detecção de coronavírus bovino no dia 0 (antes da inoculação), mas positivas no dia 1 e até a eutanásia dos animais. Tanto os exames bacteriológicos, quanto os parasitológicos não tiveram resultados significativos. Os hemogramas realizados diariamente nos bovinos 16, 17 e 18, não revelaram alterações significativas.



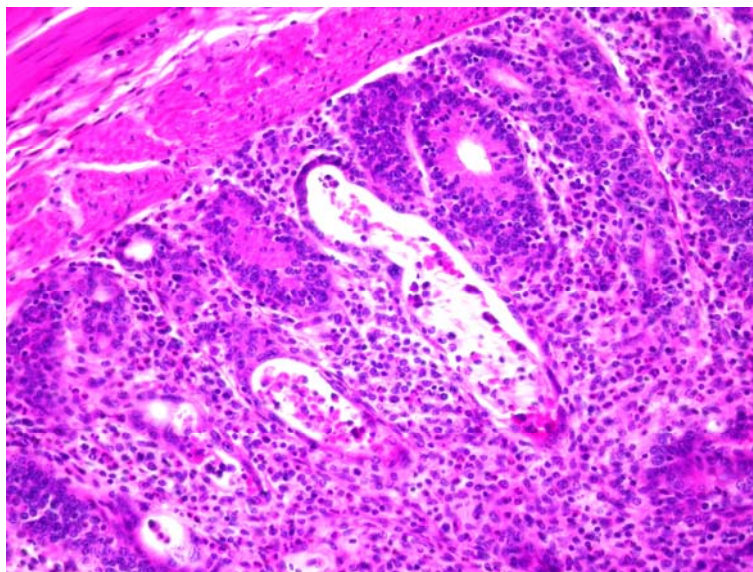
**Figura 9** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Bovino apresentando diarreia esverdeada.

**Tabela 4** – Temperatura retal\* dos bovinos 16, 17 e 18 após a infecção experimental com coronavírus bovino.

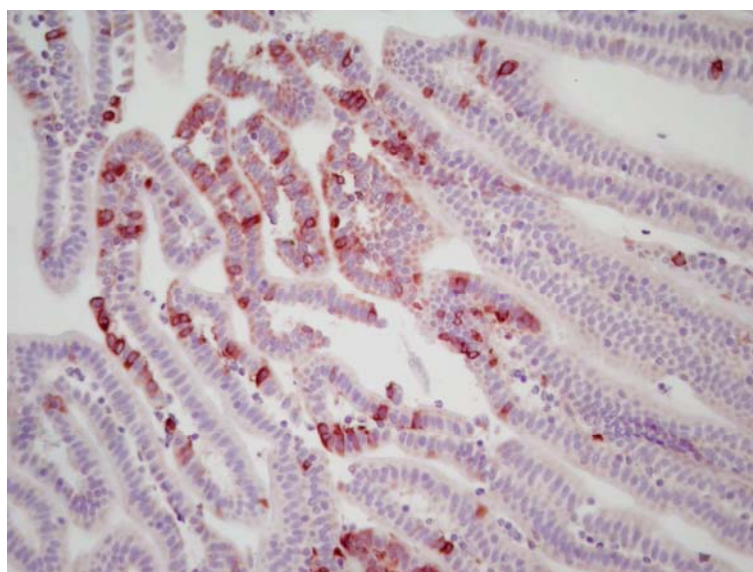
Bovinos	Dias							
	0	1	2	3	4	5	6	7
16	37,9 °C	39,9 °C	39,8 °C	39,3 °C	39,3 °C	39,2 °C	39,3 °C	-
17	38,5 °C	38,8 °C	39,7 °C	39,0 °C	38,9 °C	38,9 °C	38,8 °C	38,7 °C
18	38,5 °C	38,4 °C	38,3 °C	38,5 °C	38,7 °C	38,6 °C	-	-

\* Temperatura registrada no turno da tarde, após 15h00min.

Na imuno-histoquímica anti-coronavírus bovino (8F2), obteve-se marcação em todo o intestino e no epitélio dos cornetos nasais. No intestino delgado, as marcações foram observadas de forma moderada nos enterócitos que recobrem as vilosidades, em raros enterócitos das criptas do duodeno e jejuno (Figura 11). No íleo, além de marcação nas vilosidades (Figura 12), os enterócitos das criptas apresentavam moderada marcação incluindo debris necróticos no lúmen e em ocasionais macrófagos na lâmina própria (Figura 13). No intestino grosso, a marcação foi mais intensa no cólon espiral, sendo observadas no citoplasma de enterócitos das criptas, no epitélio de revestimento e glandular das pregas intestinais, nos debris necróticos no lúmen destas e em macrófagos na lâmina própria (Figura 14). Observaram-se as mesmas marcações no cólon descendente (Figura 15). No ceco, a marcação foi visualizada no epitélio de revestimento e glandular das pregas intestinais (Figura 16) e em ocasionais enterócitos de criptas. Nos cornetos nasais, houve marcação multifocal no epitélio e em células necróticas (Figura 17). Não houve marcação na imuno-histoquímica anti-BVDV em cortes de intestino e fragmentos de orelha.

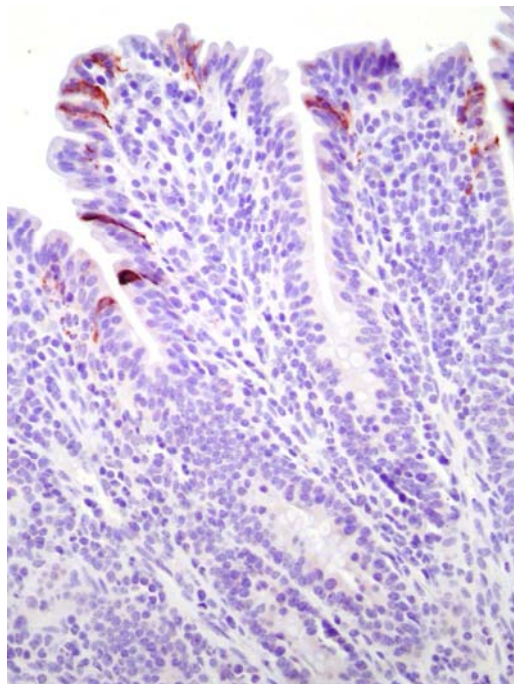


**Figura 10** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Cólon espiral. Criptas dilatadas, revestidas por epitélio pavimentoso ou cuboidal e preenchidas por debris necróticas e infiltrado mononuclear com eosinófilos na lâmina própria. Coloração de hematoxilina e eosina, Obj. 20.

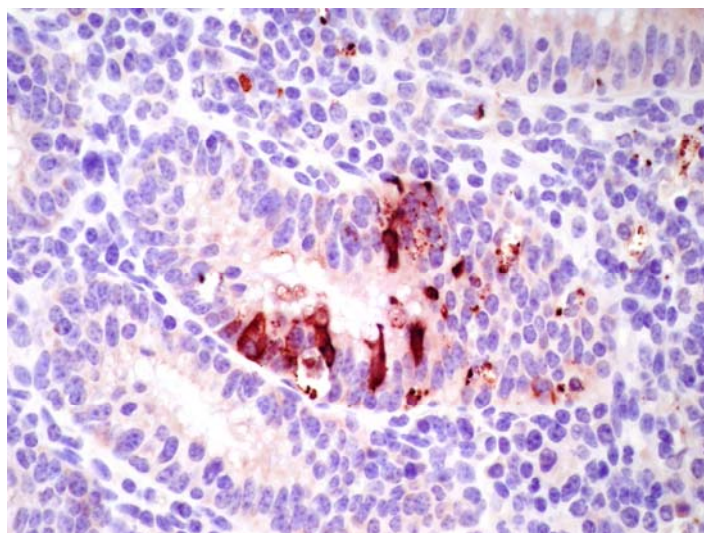


**Figura 11** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Jejunum. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos que recobrem as vilosidades. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20

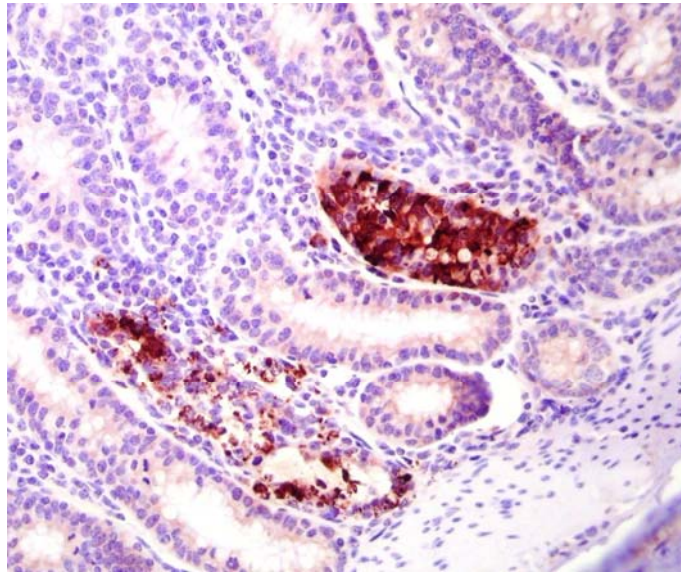




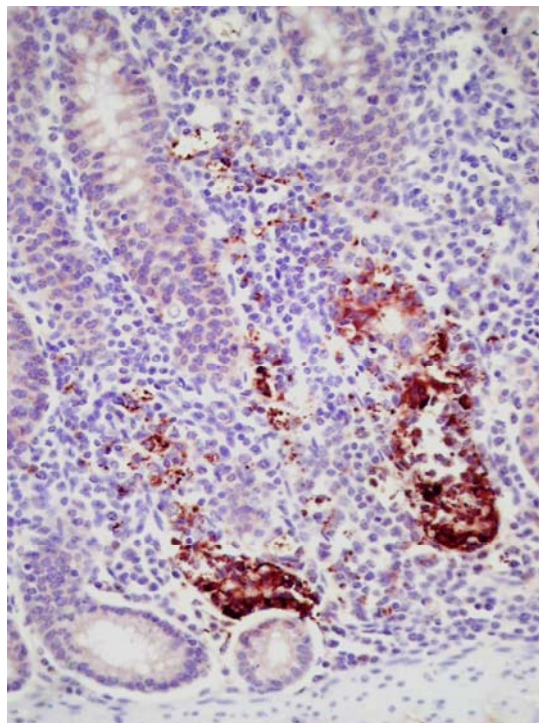
**Figura 12** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Íleo. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos que recobrem as vilosidades. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20.



**Figura 13** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Íleo. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos das criptas e macrófagos. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 40.

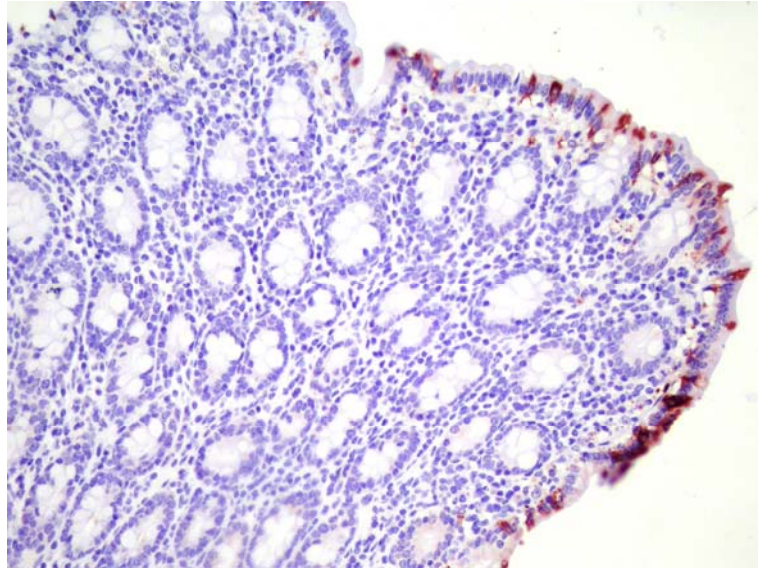


**Figura 14** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Cólon espiral. Imuno-histoquímica para coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos, macrófagos e debris necróticos no lúmen das criptas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20.

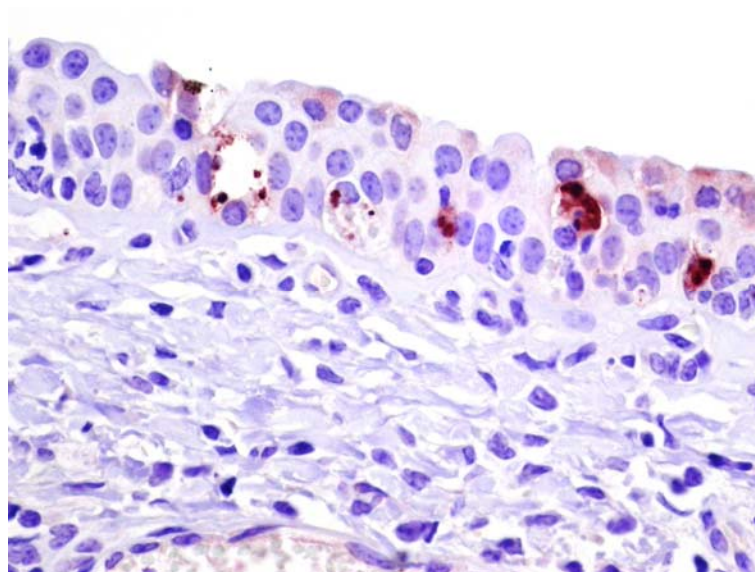


**Figura 15** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Cólon descendente. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em enterócitos, macrófagos e debris necróticos no lúmen das criptas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20.





**Figura 16** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Ceco. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais no epitélio de revestimento das pregas intestinais. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 20.



**Figura 17** - Infecção experimental com coronavírus bovino. Corneto Nasal. Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-coronavírus bovino demonstrando antígenos virais em células epiteliais necróticas. Método streptavidina-biotina, cromógeno Vector Nova Red. Obj. 40.

## 5. DISCUSSÃO

Os achados epidemiológicos, clínicos e patológicos apresentados pelos animais dos dois surtos são indistinguíveis dos descritos na doença denominada disenteria de inverno (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007). A presença de antígenos do coronavírus bovino nas lesões colônicas do bovino 1 e a detecção por *nested*-PCR para coronavírus nos bovinos 1, 2 e nos 13 bovinos do surto 2 são fortes evidências do envolvimento do vírus nessa doença, que é ainda reforçado pelos resultados negativos observados nas pesquisas bacteriológica, parasitológica e do vírus BVD.

Entre os vários fatores predisponentes para a disenteria de inverno, as quedas bruscas de temperatura são os mais comumente descritos (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978). Entretanto, a pequena variação da temperatura ambiente observada nesses surtos (16-24°C no surto 1 e 14-25 °C, no 2) (INMET 2007) pode não ter influenciado o surgimento da doença, conforme também verificado por Travén *et al* (2001). Entretanto, a mudança na dieta dos animais do surto 2, doze dias antes do início da doença pode ter contribuído como fator estressante e, portanto, predisponente.

As vacas jovens são mais frequentemente afetadas e a doença tende a ser mais intensa em vacas prenhes, recém paridas e em lactação (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990). As vacas afetadas no surto 1, em concordância com a literatura, estavam em início de lactação, período de ascendência da curva de produção. No surto 2, praticamente todos os animais foram afetadas, porém a doença foi mais intensa nos animais que apresentavam maiores índices produtivos.

Diarréia profusa, esverdeada, com estrias de sangue, sanguinolenta ou marrom-escura, alta morbidade, baixa mortalidade, curso de 5 dias, diminuição na produção de leite, depressão e diminuição no consumo de alimento são todos sinais compatíveis com casos de disenteria de inverno (ROBERTS, 1957; CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; SAIF, 1990; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007). A perda de sangue através das lesões intestinais foi provavelmente a causa da morte do bovino 1 e anemia foi constatada no bovino 2 através do hemograma. As

alterações observadas no leucograma, neutrofilia associada à presença de neutrófilos tóxicos e linfocitose, indicam toxicidade medular e estimulação antigênica, respectivamente.

Leucopenia (6 animais) e linfopenia (4 animais) observadas no leucograma dos bovinos do surto 2 são achados típicos de gastroenterites virais em bovinos (MORRIS, 2002).

Sinais respiratórios como descarga nasal serosa a mucopurulenta e tosse, observados no surto 2 também são relatados em casos de disenteria de inverno (RADOSTITS *et al.*, 2000; TRAVÉN *et al.*, 2001). Em um estudo realizado na Suécia, 73 de 256 rebanhos leiteiros tiveram surtos de disenteria de inverno e 59,9% destes apresentaram sinais respiratórios durante a doença (TRAVÉN, *et al.*, 1993). Este achado está de acordo com as recentes observações de que as cepas atuais circulantes de coronavírus bovino possuem tropismo entérico e respiratório (JEONG, *et al.*, 2005b; DECARO *et al.*, 2008).

As lesões histológicas observadas nas criptas do cólon espiral do bovino 1 são idênticas às descritas em casos de disenteria de inverno em bovinos (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007). A marcação positiva na imuno-histoquímica anti-coronavírus bovino associada com lesões no caso fatal sustentam a hipótese da atuação do vírus nesse surto (VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; ZHANG *et al.*, 1997; DAR *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007).

Devido à baixa mortalidade ocasionada pela doença, sua correlação com o coronavírus bovino tem sido feita pela detecção deste nas fezes e pela soroconversão dos animais de rebanhos afetados (SAIF, 1990). No entanto, há controvérsias sobre a associação da detecção do coronavírus nas fezes de animais com a doença clínica, visto que há relatos da presença do vírus nas fezes de animais clinicamente normais, com picos de eliminação nos meses de inverno e próximo ao parto (COLLINS *et al.*, 1987; CLARK, 1993; RADOSTITS *et al.*, 2000). Assim, a detecção do vírus nas lesões de vacas enfermas, conforme observada no bovino 1, auxilia no estabelecimento do diagnóstico (SAIF 1990).

Os principais diagnósticos diferenciais dessa enfermidade são infecções agudas por BVDV, salmonelose e coccidiose (RADOSTITS *et al.*, 2000). No presente caso, os resultados da imunoistoquímica anti-BVDV (surto 1 e animais experimentais), sorologia pareada para BVD (surto 2), exames bacteriológicos e parasitológicos

excluíram tais possibilidades. Entretanto, apesar de muitas vezes negligenciados, diarreia e corrimento nasal são dois sinais extremamente comuns em bovinos leiteiros que inclusive podem ser associados com diversas condições outras que não infecções (RADOSTITS, 2000). Portanto, a confirmação do envolvimento do coronavírus com estes sinais assume importância especial no diagnóstico diferencial dessas condições.

Os achados histopatológicos encontrados em dois dos três animais inoculados com suspensão de fezes de um bovino afetado do surto 1 foram caracterizados principalmente por lesões nas criptas do intestino grosso, especialmente cólon espiral e são similares aos observados em casos naturais da doença em bovinos adultos (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; NATSUAKI *et al.*, 2007).

Novamente, devido à baixa mortalidade associada com a doença, há escassez de dados sobre exames histológicos das lesões (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; VAN KRUININGEN *et al.*, 1987; CHO *et al.*, 2000; NATSUAKI *et al.*, 2007). Isto, muitas vezes, impede pesquisas mais aprofundadas acerca da patogenia do coronavírus bovino. Neste sentido, os dados de histopatologia, incluindo a imuno-histoquímica aqui apresentados, contribuem para demonstrar os sítios preferenciais de replicação do coronavírus bovino no trato digestivo e respiratório superior. Estes resultados são essenciais para o entendimento dos sinais clínicos, visto que a replicação intensa do vírus nas células das criptas foi provavelmente a causa da diarreia, da intensa eliminação de sangue nas fezes, e, de forma semelhante, no epitélio dos cornetos nasais, pelos sinais respiratórios observados.

A reprodução experimental da disenteria de inverno em bovinos adultos apresentou grande dificuldade no passado (TRAVÉN *et al.*, 2001). A disenteria de inverno foi reproduzida em vacas soropositivas para coronavírus bovino, porém, diarreia somente foi produzida por inoculação duodenal através de um cateter, após imunossupressão por injeções de dexametasona diárias, além da administração oral de grandes quantidades de água gelada (TSUNEMITSU *et al.*, 1999). Travén *et al.* 2001, reproduziram a doença em bovinos adultos soronegativos para coronavírus bovino mantendo estes em contato com um bezerro de 3 meses de idade inoculado anteriormente com 100ml (rúmen) e 3ml (cada narina) de uma solução de fezes de animais com disenteria de inverno misturadas em proporções de 1:1, com DMSO a 10% em PBS. A reprodução experimental neste estudo foi estabelecida por inoculação intra-

rumenal e intra-nasal de solução de fezes de animais enfermos diluídas na proporção de 1:1, com DMSO a 10% em PBS diretamente em bovinos de 20 meses.

A marcação de antígenos do coronavírus bovino no exame imuno-histoquímico no intestino delgado, grosso e epitélio dos cornetos nasais nos animais inoculados comprovam o tropismo entérico e respiratório do coronavírus bovino em animais adultos. Marcações similares foram observadas em bezerros privados de colostro inoculados com amostras de coronavírus bovino da disenteria de inverno (PARK *et al.*, 2007), casos em que também foram observadas marcações no epitélio de bronquíolos e tecido pulmonar, o que não ocorreu nos animais experimentais deste estudo. Adicionalmente, não foi observada pneumonia intersticial e lesões severas no jejuno nos bovinos 16 e 17, como observado nos animais do estudo de Park *et al.* 2007. Os principais focos de lesão no estudo experimental foram visualizados no intestino grosso, especialmente no cólon espiral, achados estes, os mais comumente encontrados em casos naturais da doença (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985; NATSUAKI *et al.*, 2007).

A ausência de marcação na imuno-histoquímica no intestino delgado no caso natural foi provavelmente associada com o maior tempo de evolução da doença. O epitélio colônico possui taxa de renovação celular mais lenta do que o intestino delgado; portanto, é possível que o cólon continue a abrigar provas da doença, enquanto que o intestino delgado pode ter recuperado (VAN KRUININGEN *et al.*, 1985).

O fato do bovino 18 não ter adoecido pode estar relacionado a fatores individuais como estado imunológico (SMITH *et al.*, 1998) ou alterações referentes ao inóculo utilizado. A detecção pela técnica de RT-PCR nas amostras de fezes do bovino 18 após a inoculação, provavelmente é devido à presença do vírus no inóculo.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram a importância do coronavírus bovino como causa de doença entérica e respiratória em bovinos adultos no Estado do Rio Grande do Sul, fato que deve ser considerado no planejamento sanitário de rebanhos leiteiros.

Inoculação de 100 ml no rúmen e de 3 ml em cada narina de uma solução de fezes de animais com disenteria de inverno misturadas em proporções de 1:1, com dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% em PBS foi eficiente para reproduzir a doença em bovinos adultos.

O coronavírus bovino apresenta tropismo pelos enterócitos intestinais e epitélio do trato respiratório superior em animais adultos.

O intestino grosso, em especial o cólon espiral, é o principal foco de lesão em bovinos adultos infectados pelo coronavírus bovino.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AKASHI, H. *et al.* Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 265-276, 1980.
- AN, S. *et al.* Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. **Journal of Virology**, v. 73, p. 7853–7859, 1999.
- ATHANASSIOUS, R. *et al.* Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 163-169, 1994.
- AZEVEDO M. S. *et al.* Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5428–5436, 2005.
- BENFIELD, D. A.; SAIF, L. J. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1454-1457, 1990.
- BIDOKHTI, M. R. M. *et al.* Reduced likelihood of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus infection on organic compared to conventional dairy farms. **The Veterinary Journal** (2008), doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.010.
- BRANDÃO, P. E. *et al.* Animal coronaviruses. **Virus Reviews and Research**, v. 6, p. 7-13, 2001.
- BRANDÃO, P. E. *et al.* Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 69, p.103-104, 2002.
- BRANDÃO, P. E. *et al.* Winter dysentery in cows associated with bovine coronavirus (BCoV). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1074-1076, 2007 a.
- BRANDÃO, P. E. *et al.* On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 398-402, 2007 b.

- CAMPBELL, S. G.; COOKINGHAM, C. A. The enigma of winter dysentery. **The Cornell Veterinarian**, v. 68, p.423-441, 1978.
- CHO, K. O. *et al.* Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, p. 1191-1194, 2000.
- CHO, K. O. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2401–2419, 2001
- CHOULJENKO, V. N. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 30 genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. **Virus Genes**, v. 17, p. 33–42, 1998.
- CLARK, M. A. Bovine coronavirus. **The British Veterinary Journal**, v. 149, p. 51-70, 1993.
- COLLINS, A. R. *et al.* Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for cell attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v. 119, p. 358-371, 1982.
- COLLINS, J. K. *et al.* Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 361-365, 1987.
- CROUCH, C. F.; RAYBOULD, T. J. G.; ACRES, S. D. Monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine enteric coronavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 338-393, 1984 a.
- CROUCH, C. F.; ACRES, S. D. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the faeces of normal cows. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p.338-393, 1984 b.
- DAR, A. M.; KAPIL, S.; GOYAL S. M. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for detection of bovine coronavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 152-157, 1998.



- DECARO, N. *et al.* Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 30-39, 2008.
- ESPINASSE, J. *et al.* Winter dysentery: a coronavirus-like agent in the faeces of beef and dairy cattle with diarrhoea. **Veterinary Record**, v. 110, p. 385, 1982.
- GONZÁLES, J. M. *et al.* A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. **Archives of Virology**, v. 148, p. 2207-2235, 2003.
- HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; MYERS, G. W. Development of protein A-gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: Comparison with ELISA and direct immunofluorescence of nasal epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 19, p. 217-231, 1989.
- HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; AGNES, A. G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 187-201, 1990.
- HECKERT, R. A. *et al.* Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 845-851, 1991.
- HORNER, G. W.; HUNTER, R.; KIRKBRIDE C. A. A coronavirus-like agent present in faeces of cows with diarrhoea. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, p. 98, 1975.
- INMET. Normais Climatológicas. Instituto Nacional de Meteorologia. Capturado em 30 de dezembro de 2007. Online. Disponível na Internet <http://www.inmet.gov.br>
- JEONG, J. H. *et al.* Detection and isolation of Winter Dysentery Bovine Coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 187-189, 2005 a.
- JEONG, J. H. *et al.* Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. **Virus Research**, v. 108, p.2007-212, 2005 b.

- KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**. 5° ed. MEDSI, São Paulo. 2001, 1465p.
- KSIAZEK, T. G. *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 38, p. 1953-1966, 2003.
- KYUWA, S. *et al.* Modulation of cellular macromolecular synthesis by coronavirus: implication for pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 68, p. 6815–6819, 1994.
- LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.
- LATHROP, S. L. *et al.* Antibody titers against bovine coronavirus and shedding of the virus via the respiratory tract in feedlot cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 1057–1061, 2000.
- MASTER, P. S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 66, p. 193-292, 2006.
- MCNULTY, M. S. *et al.* Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 425-434, 1984.
- MORRIS, D. D. Alterations in the erythron. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 3° ed., 2002, cap. 24, p. 415-419.
- MURRAY, M. J.; SMITH, B. P. Disease of the alimentary tract. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 3° ed., 2002, cap. 30, p. 593-789.
- NATSUAKI, S. *et al.* Fatal Winter Dysentery with severe anemia in an adult cow. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, p. 957-960, 2007.
- NJAA, B. L. *et al.* Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p. 393-399, 2000.
- PARK, S. J. *et al.* Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3178–3188, 2006.

- PARK, S. J. *et al.* Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives of Virology**, v. 152, p. 1885-1900, 2007.
- PROPHET, E. B. *et al.* **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC. 1992. 279.
- RADOSTITS, O. M. *et al.* **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9<sup>o</sup> ed. W.B. Saunders, London. 2000, 1877p.
- REST, J.; MINDELL, D. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 3, p. 219-225, 2003.
- RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Ed). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM. 2007. cap. 22, p.565-591.
- RISCO, C. *et al.* The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. **Journal of Virology**, v. 70, p. 4773-4777, 1996.
- ROBERTS, S. J. Winter dysentery in dairy cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 47, p. 372-388, 1957.
- SAIF, L. J. *et al.* Winter dysentery in adult dairy cattle: detection of coronavirus in the faeces. **Veterinary Record**, v. 123, p. 300-301, 1988a.
- SAIF, L. J. *et al.* Cell culture propagation of bovine coronavirus. **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 11, p. 139-145, 1988b.
- SAIF, L. J. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? **The Cornell Veterinarian**, v. 80, p. 303-311, 1990.
- SAIF, L. J. *et al.* Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. **Veterinary Record**, v. 128, p. 447-449, 1991.

- SCHMITZ, M. Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006, 63p.
- SMITH, D. R. *et al.* The evaluation of two antigen capture ELISAs employing polyclonal or monoclonal antibodies for detecting bovine coronavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 99-105, 1996.
- SMITH, D. R. *et al.* Evaluation of Cow-level risk factors for the development of winter dysentery in dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 986-993, 1998.
- SNODGRASS, D. R. *et al.* Etiology of diarrhoea in young calves. **Veterinary Record**, v. 119, p. 31-34, 1986.
- STEPHENSON, C. B.; CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. **Virus Research**, v. 60, p. 181-189, 1999.
- STORZ, J.; ROTT, R. Reactivity of antibodies in human serum with antigens of an enteropathogenic bovine coronavirus. **Medical microbiology and immunology**. v. 169, p. 169-178, 1981.
- TAKAHASHI, E. *et al.* Epizootic diarrhoea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 151-154, 1980.
- TRAVÉN, M. *et al.* Winter dysentery diagnosed by farms in dairy herds in central Sweden: incidence, clinical signs and protective immunity. **Veterinary Record**, v. 133, p. 315-318, 1993.
- TRAVÉN, M. *et al.* Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV – comparison with BCV infection in milk-fed calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 127-151, 2001.
- TSUNEMITSU, H.; SAIF, L. J. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. **Archives of Virology**, v. 140, p. 1303–1311, 1995a.

TSUNEMITSU, H. *et al.* Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3264-3269, 1995b.

TSUNEMITSU, H. *et al.* Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. **Archives of Virology**, v. 144, p. 167-175, 1999.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes**. 4 ed. Japan International Cooperation Agency, Porto Alegre. 1998, 143p.

VAN KRUININGEN, H. J. *et al.* Winter dysentery on dairy cattle: recent findings. **The Compendium on Continuing Education**, v.7, p. 591-599, 1985.

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

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

**ANEXO A****ACHADOS CLÍNICO PATOLÓGICOS DURANTE UM SURTO DE  
DISENTERIA DE INVERNO EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL**

**Saulo Petinatti Pavarini, Pedro Soares Bezerra Junior, Adriana da Silva Santos,  
Caroline Argenta Pescador, Paulo Eduardo Brandão, Sibeles Pinheiro de Souza e  
David Driemeier**

**ARTIGO PUBLICADO EM  
PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**

## Achados clínico patológicos durante um surto de disenteria de inverno em bovinos no Rio Grande do Sul<sup>1</sup>

Saulo Petinatti Pavarini<sup>2</sup>, Pedro Soares Bezerra Junior<sup>2</sup>, Adriana da Silva Santos<sup>2</sup>,  
Caroline Argenta Pescador<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Brandão<sup>3,4</sup>, Sibeles Pinheiro de Souza<sup>3,4</sup> e  
David Driemeier<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**- Pavarini S.P., Bezerra Junior P.S., Santos A.S., Pescador C.A., Sonne L., Pedrosa P.M.O. & Driemeier D. 2008. [**Clinic pathological features during a winter dysentery outbreak in cattle in Rio Grande do Sul.**] Achados clínico patológicos durante um surto de disenteria de inverno em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(12): 611-616.. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

This report describes a winter dysentery outbreak that affected 10 dairy cows from a ranch located in the county of Viamão, Rio Grande do Sul. The most significant clinical sign was profuse and watery diarrhea, which ranged from a greenish to a brownish coloration and from occasional blood streaks with mucus to a bloody diarrhea. Most cases persisted for 5 days and also included depression, drastic decrease in milk production and in food consumption. Only one of the affected animals died. The necropsy revealed pale mucosa and sanguineous content with high quantity of blood clots, particularly within the spiral colon, and petechiae on the colonic mucosa. Histopathological lesions were predominant in the spiral colon, and consisted of a high number of dilated crypts without epithelium or with the replacement of a pavement epithelium with occasional immature cuboidal cells, which sometimes showed enlarged nucleus and prominent nucleolus. Some crypts were filled with epithelial desquamation and polymorphnuclear cells. Bovine coronavirus (8F2) monoclonal antibody was used for immunohistochemistry on sections of the spiral colon that showed positive reactions in the cytoplasm of the infected crypt epithelium, sloughed necrotic cells, and within macrophages in the lamina propria of both.

**INDEX TERMS:** Winter dysentery, diarrhea, spiral colon, bovine coronavirus.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

<sup>4</sup> Coronavirus Research Group, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

**RESUMO.-** Descreve-se um surto de disenteria de inverno que afetou 10 vacas leiteiras de uma propriedade localizada em Viamão, Rio Grande do Sul. O quadro clínico caracterizou-se por uma diarreia inicialmente líquida esverdeada com estrias de sangue e muco, evoluindo, em alguns animais, para uma diarreia de coloração marrom escura à sanguinolenta, que persistiu, em média, cinco dias. Drástica diminuição na produção de leite e no consumo de alimentos, além de graus variados de depressão também foram observados. Apenas um dos 10 animais afetados morreu. Durante a necropsia, observaram-se mucosas pálidas, conteúdo sanguinolento com presença de grande quantidade de coágulos, principalmente no cólon espiral e petéquias na mucosa do cólon. Os principais achados histológicos foram encontradas no cólon espiral, onde havia criptas dilatadas, sem epitélio de revestimento ou revestidas por epitélio pavimentoso e/ou cuboidal, por vezes com núcleos grandes e nucléolos proeminentes. Algumas criptas eram preenchidas por debris necróticos e polimorfonucleares. Na imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal para coronavírus bovino (8F2) em cortes do cólon espiral, havia marcações positivas no citoplasma de enterócitos das criptas, nos debris necróticos destas e em macrófagos na lâmina própria.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Disenteria de inverno, diarreia, cólon espiral, coronavírus bovino.