

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AMEBÍASE SISTÊMICA E TOXOPLASMOSE ASSOCIADAS À CINOMOSE
EM CÃES NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA**

MARIA TALITA SOARES FRADE

PATOS-PB
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AMEBÍASE SISTÊMICA E TOXOPLASMOSE ASSOCIADAS À CINOMOSE
EM CÃES NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Mestranda: Maria Talita Soares Frade
Orientador: Antônio Flávio Medeiros Dantas

PATOS-PB
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

F799a Frade, Maria Talita Soares

Amebíase sistêmica e Toxoplasmose associadas à cinomose em cães no semiárido da Paraíba / Maria Talita Soares Frade. – Patos, 2014.

54 f.: color.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

“Orientação: Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas”

Referências.

1. Doenças de Cães. 2. Imunossupressão. 3. *Acanthamoeba sp.*,
I. Título.

CDU 616:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AMEBÍASE SISTÊMICA E TOXOPLASMOSE ASSOCIADAS À CINOMOSE
EM CÃES NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA**

Dissertação de Mestrado elaborada por

MARIA TALITA SOARES FRADE

Aprovada em / / .

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena
Departamento de Ciências Veterinárias/CCA/UFPB – Areia/PB

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB

**PATOS
2014**

Dedicatória

*Francisca Glória Soares da Costa Ramalho,
Tia Glória (in memorian), exemplo de força e determinação.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelas oportunidades concedidas e por mais essa conquista.

Ao recordar de cada um que contribuiu de forma direta ou indireta para que mais essa etapa fosse concluída, é recordar com saudade de quem não está mais fisicamente entre nós, e que estaria vibrando por mais essa conquista, tia Glória. Obrigada pelos conselhos, incentivo e pelos valores transmitidos. Você sempre será meu exemplo de força, determinação e dedicação.

Aos meus pais, Francisco Ferreira Frade (Tico Frade) e Francisca Lúcia Soares Frade por todo amor, dedicação e confiança. Durante todo esse tempo não mediram esforços para me proporcionar o melhor. A força que tenho pra prosseguir e lutar cada dia vem de vocês. Obrigada pelo apoio nas decisões em que tenho tomado e pela compreensão na minha ausência. Estendo essas palavras aos meus irmãos, Francisco, sempre cuidando e protegendo, e Tatiana, que com o sorriso mais puro e o abraço mais sincero tem o dom de mostrar o que realmente tem valor na vida. Amo vocês!

Aos meus avós, que são responsáveis pela grande família que tenho: tios, tias, primos e primas maternos e paternos. Minha grande família, meu bem maior!

Ao Laboratório de Patologia Animal (LPA). Aos que já passaram Clarice, Luciano, Glauco, Allan, Andrei, Rachel, Diego, Rômulo, Ewerton, Danilo, Fernando, Carlos, Luiza, Jeann e os que ainda continuam Fabrício, Lisanka, Eduardo e Robério. Sempre compartilhando conhecimentos e tornando a rotina diária (às vezes estressante) divertida e agradável. E a Maria das Neves (Nevinha), técnica do laboratório de histopatologia, pelo carinho, paciência e pelos cuidados. Aos funcionários Edinho, Dona Joana que fazem parte do LPA e ajudam a manter a rotina.

Ao grande mestre, orientador e amigo, Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas, meu muito obrigada! Pela paciência, apoio, confiança. Obrigada por todo conhecimento transmitido e pela oportunidade de fazer parte do LPA.

Aos amigos da graduação (Turma 2007.1), foram anos maravilhosos com vocês! Aos que foram mais persistentes e continuaram no mestrado ou residência (Rafaela, Roberta, Thais, Jefferson, Arthur, Jouberdan, Allan e Jeann), foi muito bom tê-los por perto por mais dois anos. Sentirei muitas saudades, espero reencontrá-los em breve!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

RESUMO

A cinomose canina é uma doença frequentemente diagnosticada na rotina da Clínica de Pequenos Animais e no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba. Com a imunossupressão resultante da infecção pelo vírus da cinomose canina, co-infecções com agentes oportunistas podem ser observadas. Objetivou-se com este trabalho descrever as infecções oportunistas por protozoários e suas complicações sistêmicas em cães infectados com o vírus da cinomose, sendo três casos de infecção por *Acanthamoeba* sp. e cinco casos de *Toxoplasma gondii*. Para isso, essa Dissertação foi formatada em dois capítulos, constituída de dois artigos originais. O primeiro submetido à *Veterinary Parasitology* descreve três casos de infecção sistêmica por *Acanthamoeba* sp. em cães com cinomose, caracterizando os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da doença diagnosticada na região semiárida da Paraíba, Nordeste do Brasil. Neste relato, os cães afetados desenvolveram sinais respiratórios e neurológicos progressivos que evoluíram para morte em 2 a 20 dias. Na necropsia havia áreas nodulares, irregulares e amarelo-avermelhadas distribuídas aleatoriamente nos pulmões, coração, rins, baço, linfonodos, adrenais e intestino. Um cão apresentava malacia no córtex parietal e outro em núcleos da base. Histologicamente, foram observados piogranulomas com áreas de necrose e hemorragia em todos os órgãos afetados, associados a miríades de amebas intralesionais. O diagnóstico foi realizado através dos achados microscópicos de infecção por amebas de vida livre e confirmado *Acanthamoeba* sp. pela imunohistoquímica (IHQ). O segundo artigo, submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira, relata a ocorrência de cinco casos de toxoplasmose associado à cinomose em cães no semiárido da Paraíba, sendo quatro com envolvimento do encéfalo e um com envolvimento do pulmão, descrevendo as características clínicas, patológicas e imunohistoquímica. Para tal, foram revisadas todas as fichas de necropsias de cães diagnosticados com cinomose no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2012. A IHQ foi realizada nos casos que apresentavam estruturas císticas intralesionais características de protozoários, compatíveis com *Toxoplasma gondii* com anticorpo anti-*Toxoplasma gondii*. As alterações clínicas observadas nesses casos foram semelhantes e consistiam de sinais digestivos, respiratórios, neurológicos e lesões

oculares, sugestivos de infecção pelo vírus da cinomose canina. Histologicamente havia no encéfalo áreas multifocais de malacia associadas a estruturas arredondadas basofílicas características de cistos de *Toxoplasma gondii*. Circundando essas áreas havia infiltrado inflamatório mononuclear, constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raros neutrófilos. No pulmão havia espessamento dos septos alveolares por infiltrado inflamatório mononuclear, constituído de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, com proliferação moderada de pneumócitos tipo II. Havia ainda áreas multifocais a coalescentes de necrose com macrófagos associadas a *T. gondii*. Os achados histológicos compatíveis com cinomose caracterizavam-se principalmente por encefalite não supurativa, desmielinização e mangitos perivascularres discretos, associada a corpúsculos de inclusões eosinofílicas intranucleares e/ou intracitoplasmáticos em astrócitos, neurônios e em células endimárias. Havia também corpúsculos de inclusões em órgãos extraneurais. O diagnóstico de toxoplasmose associado à infecção pelo vírus da cinomose nos cinco casos estudados foi baseado nos achados microscópicos, sendo confirmados através da imuno-histoquímica. Têm-se observado nos casos de cinomose com ocorrência simultânea de outros agentes que a evolução para morte do animal ocorre de forma mais rápida e severa. Quando da ocorrência de infecções sistêmicas por agentes infecciosos e principalmente quando há o envolvimento do sistema nervoso por agentes oportunistas, uma causa primária, como a cinomose, deve ser investigada.

PALAVRAS-CHAVE: Doenças de cães, cinomose, imunossupressão, *Acanthamoeba* sp., *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Canine distemper is a disease often diagnosed in routine Small Animal Clinic and Laboratory of Animal Pathology, Federal University of Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba. With immunosuppression resulting from infection with canine distemper virus co-infections with opportunistic agents can be observed. The objective of this study was to describe the opportunistic protozoan infections and its systemic complications in dogs infected with the virus of distemper, three cases of infection with *Acanthamoeba* sp. and five cases of *Toxoplasma gondii*. To this end, this dissertation was formatted into two chapters, consisting of two original articles. The first submitted to Veterinary Parasitology describes three cases of systemic infection *Acanthamoeba* sp. in dogs with distemper, featuring the epidemiological, clinical and pathological aspects of disease diagnosed in the semiarid region of Paraíba, Northeast Brazil. In this report, the affected dogs developed progressive neurological and respiratory signs that progressed to death within 2-20 days. At necropsy there was irregular and with yellow-reddish nodules randomly distributed in the lungs, heart, kidneys, spleen, lymph nodes, adrenals, and intestine. One dog had foci of malacia in the parietal cortex and another one in the caudate nucleus. Histologically, pyogranulomas with areas of necrosis and hemorrhage in all organs affected were observed, associated with myriads of intralésional amoebic trophozoites. All three cases were concomitant canine distemper, that possibly triggered immunosuppression in the dogs. The diagnosis was performed through microscopic findings of infection by free-living amoebae and confirmed *Acanthamoeba* sp. by immunohistochemistry. The second article, submitted to Brazilian Veterinary Research, report the occurrence of five cases of toxoplasmosis associated with distemper in dogs in the semiarid region of Paraíba, four with involvement of the brain and one with involvement of the lung, describing the clinical, pathological and immunohistochemistry characteristics. To this end, all were reviewed necropsies records of dogs diagnosed with canine distemper in the Laboratory of Animal Pathology, Federal University of Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba, in the period from January 2003 to December 2012. IHC was performed on cases that had a cystic characteristics intralésional of protozoan, *Toxoplasma gondii* compatible with anti-*Toxoplasma gondii*. The clinical alterations observed in these cases were similar and consisted of signs digestive, respiratory, neurological and ocular lesions suggestive

of infection with canine distemper virus. Histologically in the encephalon had multifocal areas of malacia, and these areas were observed near basophilic round structures, characteristic of cysts of *Toxoplasma gondii*. Encircling these areas had mononuclear inflammatory infiltrate composed mainly of lymphocytes, plasma cells, macrophages and rare neutrophils. In the lung had thickening of the alveolar septa by mononuclear inflammatory infiltrate composed of macrophages, lymphocytes and plasma cells, with moderate proliferation of type II pneumocytes. There were multifocal to coalescing areas of necrosis with macrophages associated with *T. gondii*. The histological findings compatible with distemper were characterized mainly by non-suppurative encephalitis, demyelination and perivascular cuffs discrete, associated the inclusion bodies eosinophilic intranuclear and/or intracytoplasmic in astrocytes, neurons and ependymal cells. There were also inclusion bodies in extraneural organs. The diagnosis of toxoplasmosis associated with infection with canine distemper virus in the five cases studied was based on the microscopic findings, and confirmed by immunohistochemistry. Toxoplasmosis shall be included in the differential diagnosis of dogs with severe progressive systemic signs, especially when respiratory and neurologic involvement. Has been observed in cases of distemper with simultaneous occurrence of other agents that evolution to animal death occurs more quickly and severely. Upon the occurrence of systemic infections by infectious agents and especially when there is involvement of the nervous system by opportunistic agents, a primary cause, such as distemper, should be investigated.

KEY WORDS: Diseases of dogs, canine distemper, immunosuppression, *Acanthamoeba* sp., *Toxoplasma gondii*.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de figuras	10
Lista de quadros	12
Introdução	13
Referências	14
Capítulo I <i>Acanthamoebíase sistêmica associada à cinomose canina em cães na região semiárida da Paraíba, Brasil</i>	15
Resumo	17
Referências	25
Capítulo II <i>Toxoplasma gondii</i> associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da Paraíba, Brasil	27
Abstract	29
Resumo	30
Introdução	31
Material e Métodos	32
Resultados	33
Discussão	36
Referências	38
Conclusão	41
Anexos	
1. Guide for authors - Veterinary Parasitology	43
2. Instruções aos autores - Pesquisa Veterinária Brasileira ..	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo I	
Acanthamoebíase sistêmica associada a cinomose canina em cães na região semiárida da Paraíba, Brasil	15
Figura 1	
Pulmão. Corte transversal do lobo pulmonar mostrando pequenas áreas multifocais a coalescentes vermelho-enegegido. Observar uma grande área discretamente proeminente e marcadamente vermelha	21
Figura 2	
Coração. Superfície do endocárdio do átrio e ventrículo esquerdo. Observar os nódulos amarelos cercados por áreas vermelhas no músculo papilar	21
Figura 3	
Rins. Nódulos amarelo-avermelhados distribuídos aleatoriamente por toda superfície subcapsular. Uma dessas áreas é maior e sobressai hemisfericamente	21
Figura 4	
Corte transversal do cérebro após a fixação, mostrando área focal de malacia em núcleos da base	21
Figura 5	
Coração. Inflamação predominantemente neutrofílica e histiocítica e necrose associada com miríades de amebas intralesionais. HE, obj. 20x	23
Figura 6	
Pulmão. Os alvéolos estão preenchidos por células inflamatórias, principalmente neutrófilos e amebas (setas). HE, obj. 40x	23
Figura 7	
Rim. Numerosas amebas na região periglomerular e dentro do tufo glomerular. A morfologia do glomérulo é quase completamente obliterada pelos êmbolos parasitários. HE, obj. 20x	23
Figura 8	
Fígado. Área focal de necrose e hemorragia repleta de amebas. Observar o halo claro em torno de um dos trofozoítos, que está dentro do citoplasma de uma célula de Kupffer (seta). HE, obj. 20x	23

Figura 9	Cérebro. Substância cinzenta (córtex parietal direito), malacia focal e manguitos perivasculares constituído de amebas. HE, obj. 20x	23
Figura 10	Coração. Intensa marcação vista na forma de estruturas redondas entre células inflamatórias. Estas estruturas correspondem, na histologia, as amebas. Imuno-histoquímica (utilizando o complexo avidina-biotina-peroxidase). Obj. 20x	23
Capítulo II	<i>Toxoplasma gondii</i> associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da Paraíba, Brasil	27
Figura 1	Toxoplasmose, cerebelo (substância cinzenta). Observam-se múltiplas estruturas de <i>Toxoplasma gondii</i> (setas), associadas a infiltrado inflamatório mononuclear. Obj. 20x.	34
Figura 2	Toxoplasmose, cerebelo. Imunomarcação positiva para <i>T. gondii</i> , mostrando múltiplos exemplares do protozoário (setas) nas camadas molecular e granular (substância cinzenta). Imuno-histoquímica, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-corada com hematoxilina de Harris. Obj. 20x.	35

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Capítulo II	
<i>Toxoplasma gondii</i> associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da Paraíba, Brasil	27
Quadro 1	
Casos de toxoplasmose associado à cinomose	33

INTRODUÇÃO

Muitas infecções secundárias oportunistas podem ocorrer nos animais e no homem, geralmente associadas a condições ou doenças que provocam imunossupressão. Essas infecções podem resultar em complicações clínicas sistêmicas graves que evoluem para a morte.

A principal causa de imunossupressão em cães está associada à infecção pelo vírus da cinomose. Essa patologia é considerada uma das doenças infecciosas mais importantes dessa espécie animal (ZACHARY, 2013), que pode favorecer a ocorrência de diversas infecções secundárias (SYKES, 2010). Mais frequentemente são relatados casos de infecções bacterianas (HEADLEY et al., 1999; RIBEIRO et al., 2008; SYKES, 2010), além de infecções por protozoários, fúngicas e virais (SILVA et al., 2007; GABRIEL et al., 2008; REED et al., 2010; AGUIAR et al., 2012). No Brasil tem sido descritos casos de infecções simultâneas do vírus da cinomose canina com *Bordetella bronchiseptica* (HEADLEY et al., 1999), *Nocardia* spp. (RIBEIRO et al., 2008), *Toxoplasma gondii* (SILVA et al., 2007) e *Parvovirus canino* (HEADLEY & SAITO, 2003).

A cinomose canina é frequentemente diagnosticada na rotina da Clínica de Pequenos Animais e no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba, representando uma taxa de 10,7% da causa de morte em cães da região semiárida, algumas associadas a infecções secundárias oportunistas (FRADE, 2011). Desta forma, objetivou-se com este trabalho descrever as infecções oportunistas por protozoários e suas complicações sistêmicas em cães infectados com o vírus da cinomose, sendo três casos de infecção com *Acanthamoeba* sp. e cinco casos de *Toxoplasma gondii*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; AMUDE A. M.; SANTOS L. G. F.; RIBEIRO M. G., UENO, T. E. H.; MEGID J.; PAES A.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; GENNARI, S.M. **Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.64, p.221-224, 2012.
- FRADE, M. T. S. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da cinomose canina.** Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 2011. 48p.
- GABRIEL, A. L. ; MASUDA, E. K.; RAMOS, A. T.; INKELMANN, M. A.; AZAMBUJA, E.; GRAÇA, D. L. **Canine adenovirus type-2 and canine distemper virus pulmonary co-infection in two Chow-Chow puppies with *Candida sp* esophagitis.** Braz J Vet Pathol. v. 1, p. 47-51, 2008.
- HEADLEY, S. A; GRAÇA, D. L.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. **Canine distemper virus infection with secondary *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in dogs.** Ciência Rural. v. 29, p. 741-743, 1999.
- HEADLEY, S. A & SAITO, T. B. **Simultaneous canine distemper encephalitis and canine parvovirus infection with distemper-associated cardiac necrosis in a pup.** Ciência Rural. v. 33, p. 1149-1151, 2003.
- REED, L. T.; MILLER, M. A.; VISVESVARA, G. S.; GARDINER, C. H.; LOGAN, M. A.; PACKER, R. A. **Diagnostic exercise: Cerebral mass in puppy with respiratory distress and progressive neurologic signs.** Vet. Pathol. v. 47, p.1116–1119, 2010.
- RIBEIRO, M. G.; SALERNO T.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; CAMELLO, T. C. F; LANGONI, H; SIQUEIRA, A. K.; PAES, A. C.; FERNANDES, M. C.; LARA, G. H. B. **Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v. 50, p. 177-185, 2008.
- SILVA, M. C., FIGHERA, A. R.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. **Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 27, p.215-220, 2007.
- SYKES, J. E. **Immunodeficiencies caused by infectious diseases.** Vet. Clin. Small Anim. v. 40, p. 409-423, 2010.
- ZACHARY, J.F. Sistema nervoso. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**, 5ed. (tradução). Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 14, p. 774-873.

CAPÍTULO I

Acanthamoebíase sistêmica associada a cinomose canina em cães na região semiárida da Paraíba, Brasil

Trabalho enviado à Veterinary Parasitology

**Acanthamoebíase sistêmica associada a cinomose canina em cães na região
semiárida da Paraíba, Brasil**

Maria Talita S. Frade, Luiza F. Melo, Clarice Ricardo de M. Pessoa, Jeann L. de
Araújo, Rafael A. Fighera, Antonio Flávio M. Dantas

Autor para correspondência: Rafael Almeida Fighera, Laboratório de Patologia
Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),
Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil. E-mail: anemiaveterrinaria@yahoo.com.br

¹Acanthamoebíase sistêmica associada a cinomose canina em cães na região semiárida da Paraíba, Brasil

Maria Talita S. Frade^a, , Luiza F. Melo^a, Clarice Ricardo de M. Pessoa^a, Jeann L. de Araújo^a, Rafael A. Fighera^{b,1}, Antonio Flávio M. Dantas^a

^a *Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, CEP 58708-110, Brasil*

^b *Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil*

RESUMO

Infecções por amebas de vida livre podem causar doença sistêmica nos animais e no homem. Descrevem-se os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de acanthamoebíase disseminada associada com cinomose em três cães na região semiárida da Paraíba, Nordeste do Brasil. Os cães afetados desenvolveram sinais respiratórios e neurológicos progressivos que evoluíram para morte em 2 a 20 dias. Na necropsia havia áreas nodulares, irregulares e amarelo-avermelhadas distribuídas aleatoriamente nos pulmões, coração, rins, fígado, baço, linfonodos, adrenal e intestino. Em um caso havia foco de malacia no córtex parietal e outro em núcleos da base. Histologicamente, foram observados piogranulomas com áreas de necrose e hemorragia em todos os órgãos afetados, associados a miríades de amebas intralésionais. Nos três casos havia infecção concomitante pelo vírus da cinomose, que possivelmente desencadeou imunossupressão nos cães. O diagnóstico foi realizado através dos achados microscópicos de infecção por amebas de vida livre e confirmado *Acanthamoeba* sp. pela imuno-histoquímica.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, amebíase, doenças oportunistas, cinomose, doenças de cães.

*Corresponding author. Tel.: +5532208168.

E-mail address: anemiaveterinaria@yahoo.com.br (R.A. Fighera).

Amebas de vida livre, incluindo os gêneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Balamuthia*, têm sido descritas nos últimos anos causando infecções em seres humanos e animais (Martinez e Visvesvara, 1997; Visvesvara et al., 2007).

Estes protozoários ubíquos são encontrados no solo, na água e no ar em várias regiões do mundo e têm sido incriminados como causa de doença clínica em ruminantes (Van der Lugt e Van der Merwe, 1990; Morales et al., 2006; Pimentel et al., 2012), equinos (Kinde et al., 2007), caninos (Ayers et al., 1972; Foreman et al., 2004; Kent et al., 2011) e animais selvagens (Lozano-Alarcón et al., 1997). Em cães, já foram relatados casos de infecções por *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris* no Vietnã e em várias regiões dos Estados Unidos (Ayers et al., 1972; Pearce et al., 1985; Bauer et al., 1993; Foreman et al., 2004; Dubey et al., 2005; Reed et al., 2010; Kent et al., 2011). Tais infecções apresentavam comprometimento sistêmico agudo ou crônico caracterizado principalmente por inflamação granulomatosa associada à necrose e hemorragia nos pulmões, coração, rins e cérebro. No Brasil, até o momento, apenas um caso de infecção por *Naegleria fowleri* foi diagnosticado em um bovino na região semiárida (Pimentel et al., 2012).

O objetivo deste trabalho é descrever as características epidemiológicas, clínicas e patológicas de três casos de infecção sistêmica causada por *Acanthamoeba* sp. associado a cinomose em cães na região semiárida da Paraíba, Nordeste do Brasil.

O primeiro caso ocorreu em agosto de 2011 e os outros dois em agosto e outubro de 2012. Foram acometidos um Dachshund, macho, de um ano de idade (Caso 1), um sem raça definida (SRD), fêmea, de três meses de idade (Caso 2) e um Husky siberiano, macho de 10 anos de idade (Caso 3). No caso 1, os sinais clínicos incluíram apatia, tosse persistente, diarreia, vômito, desidratação e perda de peso progredindo até a morte em 20 dias. No caso 2, os sinais clínicos incluíram perda de peso, secreção ocular e nasal bilateral purulenta, pústulas abdominais e desidratação. Por se tratar de um cão de rua não foi possível avaliar a evolução clínica. No caso 3, os sinais clínicos incluíram tetraparesia, espasticidade, opistótono e vocalização progredindo até a morte em aproximadamente dois dias. Os cães afetados eram provenientes do município de Patos, localizado na região semiárida da Paraíba, Nordeste do Brasil. Eles viviam em quintais e tinham acesso às ruas. Apenas um cão (Caso 3) havia sido vacinado contra a cinomose, mas não foi revacinado anualmente.

Os três cães foram necropsiados. Fragmentos de vários órgãos foram coletados, fixados em formol tamponado a 10% e processados para exame histopatológico e corados com hematoxilina e eosina. O encéfalo e medula espinal foram fixados e processados da mesma forma. Blocos de parafina contendo fragmentos de pulmão, coração e cérebro (Caso 1), pulmão (Caso 2) e rim (Caso 3) foram processados para imuno-histoquímica para *Acantamoeba* sp., *Balamuthia* sp. e *Naegleria* sp. como previamente descrito (Daft et al., 2005). Resumidamente, os cortes de quatro microns de espessura foram tratados com pepsina e soro de equino para bloqueio e recuperação antigênica, respectivamente. Seguida por incubação do anticorpo primário policlonal anti-*Balamuthia*, *Acanthamoeba* e *Naegleria* com soro de coelho. Em seguida, a técnica da avidina-biotina-peroxidase foi utilizado seguido pelo cromógeno. Cortes conhecidos por conterem amebas acima serviram como controles positivos. Os controles negativos consistiram de cortes idênticas usando soro de coelho normal diluído como anticorpo primário.

Imuno-histoquímica também foi realizada em fragmentos de estômago dos três casos para a confirmação da infecção pelo vírus da cinomose canina. Resumidamente, os cortes de quatro microns de espessura foram tratados com calor e soro de suíno para recuperação antigênica e bloqueio, respectivamente. Seguido por incubação do anticorpo primário monoclonal anti-cinomose canina com soro de coelho. Em seguida, foi utilizada a técnica de fosfatase alcalina-estreptavidina-biotina, seguida pelo cromógeno. Cortes conhecidos por conter o vírus da cinomose canina acima serviram como controles positivos. Os controles negativos consistiram de cortes idênticos usando soro normal de coelho diluído como anticorpo primário.

As lesões macroscópicas eram disseminadas em órgãos das cavidades torácica e abdominal. Em todos os casos havia envolvimento dos pulmões, coração, fígado e rins. Em dois cães havia lesões no baço, linfonodos, adrenal e encéfalo, e em um as lesões foram observadas na superfície serosa do intestino delgado. Macroscopicamente, as lesões predominantes observadas nesses órgãos eram nódulos granulomatosos associados à necrose e hemorragia.

No caso 1, os pulmões estavam não colapsados e vermelho-brilhantes com nódulos amarelados multifocais a coalescentes discretamente elevados e rodeado por borda vermelha e irregular, esses nódulos eram distribuídos por todo o pulmão e podia ser observado tanto na superfície pleural, quanto ao corte. Áreas com aspecto

semelhante também foram observadas no fígado, baço, coração, rins, linfonodos, serosa do intestino delgado e adrenal. Uma área focal e vermelha foi observada em um dos giros do lobo parietal direito do cérebro. No caso 2, lesões macroscópicas semelhantes foram observadas nos pulmões, coração, fígado e rins. Áreas de 0,1 a 0,2 cm de diâmetro foram observadas no epicárdio de ambos os ventrículos e áreas amarelas, irregulares e elevadas na superfície pleural do lobo caudal do pulmão esquerdo que ao corte fluía exsudado amarelo.

No caso 3, as lesões foram observadas nos pulmões, coração, fígado, baço, rins, adrenal, linfonodos traqueobrônquico e pancreático e cérebro. Os pulmões estavam não colapsados com áreas multifocais a coalescentes, vermelho-enegrecidas, levemente elevadas de 0,2 a 2,0 cm e distribuídas aleatoriamente por toda a superfície pleural, essas lesões eram firmes e se aprofundavam no parênquima (Figura 1) e ocasionalmente apresentavam-se centralmente friáveis. No coração havia áreas multifocais vermelhas, irregulares, centralmente amareladas e levemente proeminentes na superfície epicárdica dos ventrículos direito e esquerdo e no átrio esquerdo. Na superfície do endocárdio, havia nódulos amarelados de 0,1 a 0,3 cm de diâmetro, rodeadas por áreas vermelhas, mais proeminentes nos músculos papilares (Figura 2), onde se aprofundavam no miocárdio dos ventrículos direito e esquerdo. Havia também uma área levemente vermelha e irregular na inserção das cordas da válvula atrioventricular esquerda. O fígado estava aumentado e recoberto por fibrina e havia acentuação do padrão lobular e áreas irregulares e amarelas, multifocais a coalescentes, distribuídas aleatoriamente por toda superfície capsular e superfície de corte. Os rins estavam aumentados, com nódulos vermelhos e centralmente amarelos elevados de 0,1 a 0,5 cm, distribuídos aleatoriamente sob a superfície subcapsular (Figura 3). Na superfície de corte de ambos os rins, estas áreas se aprofundavam por toda a extensão da cortical. Linfonodos traqueobrônquicos e pancreáticos estavam aumentados e difusamente vermelhos com áreas amarelas e irregulares na região cortical e com cavitações contendo sangue. Após a fixação do cérebro foi observada área focal amarronzada de 0,5 cm de diâmetro, com pequenas cavitações em núcleos da base (Figura 4).

Histologicamente, as lesões eram semelhantes nos três casos e caracterizadas por áreas multifocais a coalescentes de necrose e hemorragia, circundadas por macrófagos e neutrófilos. A maioria dos macrófagos tinha um citoplasma espumoso e a maioria dos neutrófilos eram degenerados.

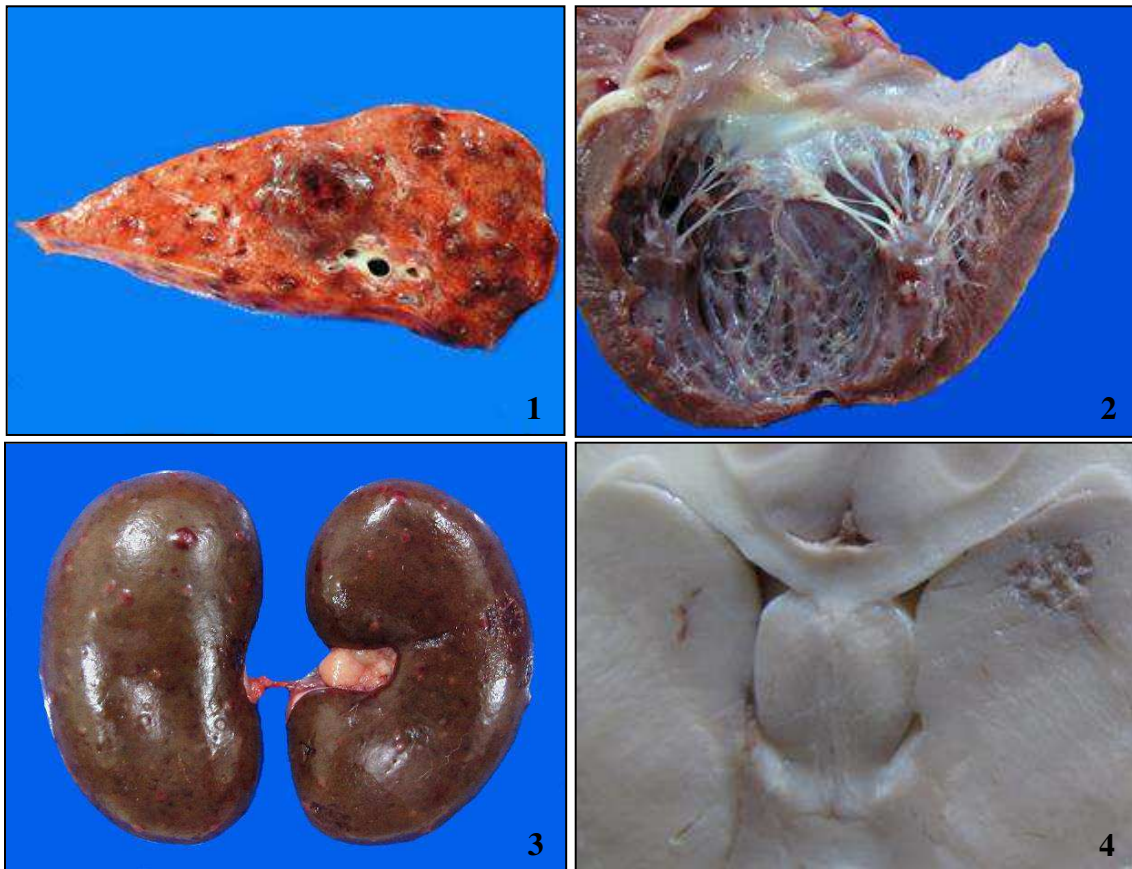


Figura 1. Pulmão. Corte transversal do lobo pulmonar mostrando pequenas áreas multifocais a coalescentes vermelho-enequizado. Observar uma grande área discretamente proeminente e marcadamente vermelha. **Figura 2.** Coração. Superfície do endocárdio do átrio e ventrículo esquerdo. Observar os nódulos amarelos cercados por áreas vermelhas no músculo papilar. **Figura 3.** Rins. Nódulos amarelo-avermelhados distribuídos aleatoriamente por toda superfície subcapsular. Uma dessas áreas é maior e sobressai hemisfericamente. **Figura 4.** Corte transversal do cérebro após a fixação, mostrando área focal de malacia em núcleos da base.

Essas alterações variaram em intensidade e afetavam a região bronquíolo-alveolar e os alvéolos, o interstício renal, as meninges, os espaços de Virchow-Robin e sinusoides hepáticos. No intestino, o infiltrado ocorreu desde a submucosa até a serosa, poupando a lâmina própria, e os rins eram afetados, principalmente, na região cortical, especialmente nas regiões periglomerular e perivascular. No cérebro do Caso 1, havia meningoencefalite granulomatosa. Em ambos os casos (Caso 1 e 3), havia área focal de malacia no lobo parietal direito e em núcleos da base, respectivamente, com rarefação e cavitações que continham numerosos macrófagos espumosos (células *gitter*) e neutrófilos.

Em todos esses tecidos foram observadas miríades de estruturas arredondadas basofílicas intralesionais, variando aproximadamente de 20 a 30 μm de diâmetro (Figura 5), que tinham núcleo redondo com um cariossomo conspicuo excêntrico rodeado por um halo claro e citoplasma granular ou vacuolar (Figura 6), morfológicamente sugerindo trofozoítos de ameba. Os protozoários eram observados livres no interstício ou parênquima dos órgãos, principalmente nas áreas de necrose, dentro de vasos sanguíneos, incluindo o glomérulo (Figura 7), em sinusoides hepáticos e capilares alveolares. Eles foram também observados no citoplasma de macrófagos, principalmente células de Kupffer (Figura 8), na luz de bronquíolos e formando manguitos perivasculares (Figura 9).

Os trofozoítos de ameba foram fortemente positivos para *Acanthamoeba* sp. (Figura 10) e negativos para *Naegleria* spp. e *Balamuthia* spp. na imuno-histoquímica. Corpúsculos de inclusão virais eosinofílicos e intracitoplasmáticos foram observadas principalmente nas células principais. Os corpúsculos de inclusão virais foram positivos para o vírus da cinomose canina na imuno-histoquímica.

O diagnóstico de amebíase foi baseado nas lesões microscópicas associadas a grande quantidade de trofozoítos. Através da imuno-histoquímica foi possível estabelecer o diagnóstico etiológico de *Acanthamoeba* sp. Achados semelhantes têm sido descritos em outras regiões (Ayers et al., 1972; Pearce et al., 1985; Bauer et al., 1993; Dubey et al., 2005; Reed et al., 2010; Kent et al., 2011).

Infecção sistêmica por *Acanthamoeba* spp. é rara em cães e está geralmente associada a condições de imunossupressão, como a cinomose (Reed et al., 2010), como visto nos três casos deste relatório, e terapia com corticosteroides (Foreman et al., 2004). No entanto, alguns casos foram descritos com ausência dos sinais característicos da imunossupressão (Ayers et al., 1972; Bauer et al., 1993).

Nos casos do presente relato, os cães apresentaram sinais clínicos de cinomose. Os cães afetados apresentavam sinais respiratórios e neurológicos progressivos. O curso clínico variável observado nesses casos pode ser atribuído à gravidade e localização das lesões, como observado no caso 3, em que o cão morreu depois de apresentar um curso clínico de cerca de dois dias. Uma evolução curta, se considerado que geralmente as infecções por amebas apresentam uma evolução crônica e progressiva (Ayers et al., 1972; Kent et al., 2011).

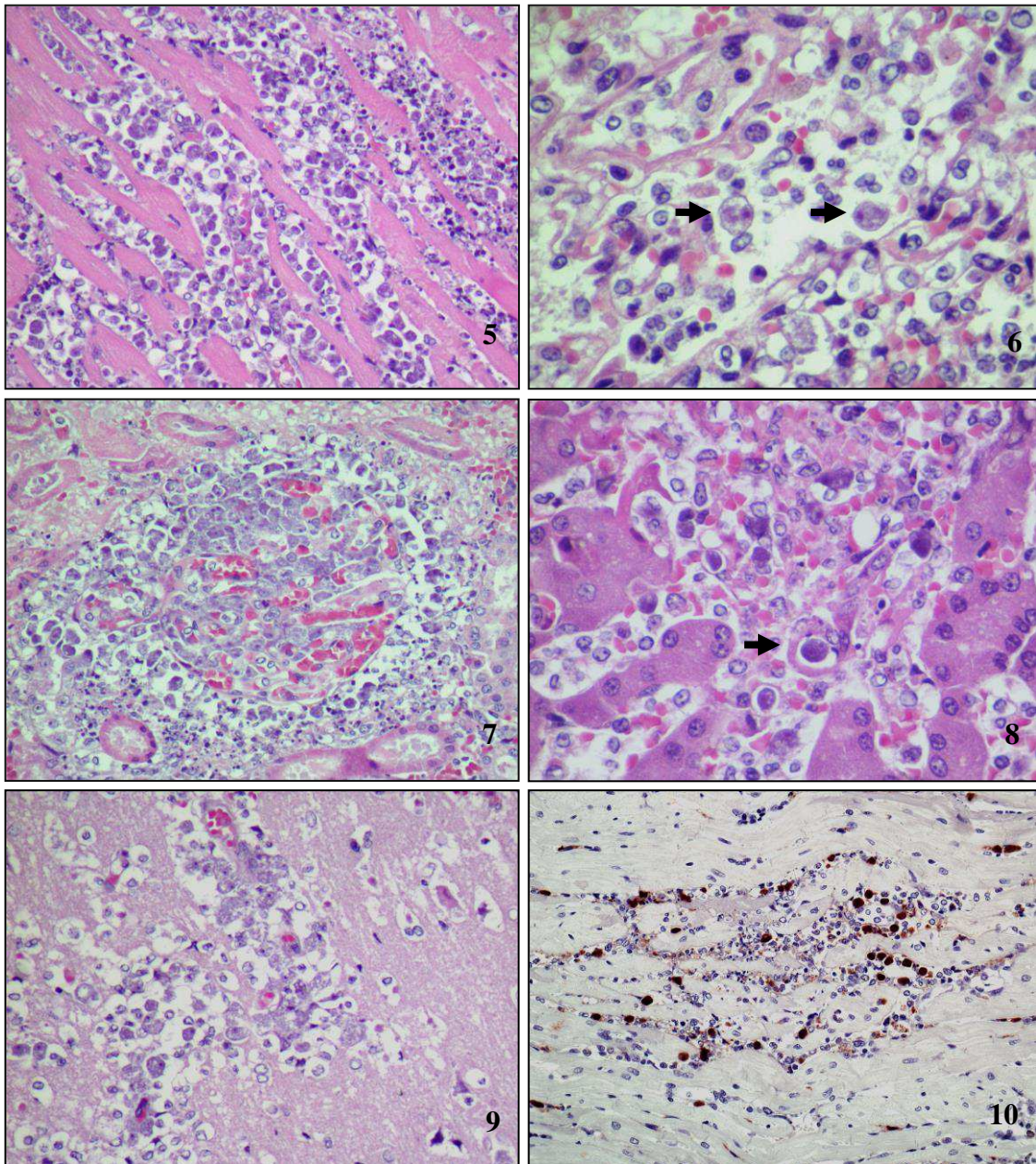


Figura 5. Coração. Inflamação, predominantemente neutrofílica e histiocítica e necrose associada com miríades de amebas intralesionais. HE, obj. 20x. **Figura 6.** Pulmão. Os alvéolos estão preenchidos por células inflamatórias, principalmente neutrófilos e amebas (setas). HE, obj. 40x. **Figura 7.** Rim. Numerosas amebas na região periglomerular e dentro do tufo glomerular. A morfologia do glomérulo é quase completamente obliterada por êmbolos parasitários. HE, obj. 20x. **Figura 8.** Fígado. Área focal de necrose e hemorragia repleta de amebas. Observar o halo claro em torno de um dos trofozoítos, que está dentro do citoplasma de uma célula de Kupffer (seta). HE, obj. 20x. **Figura 9.** Cérebro. Substância cinzenta (córtex parietal direito), malacia focal e manguitos perivasculares constituído de amebas. HE, obj. 20x. **Figura 10.** Coração, intensa marcação visto na forma de estruturas redondas entre células inflamatórias. Estas estruturas correspondem, na histologia, as amebas. Imuno-histoquímica (utilizando o complexo avidina-biotina-peroxidase). Obj. 20x.

As lesões acentuadas observadas nos pulmões dos três casos sugerem que a porta de entrada tenha ocorrido pelas vias aéreas, através da inalação do agente, com envolvimento pulmonar primário e posterior disseminação hematogênica para os demais órgãos afetados, semelhante ao observado por Kent et al. (2011).

A ocorrência recente de infecção por ameba de vida livre em um bovino (Pimentel et al., 2012) e cães da mesma região, demonstra a importância de incluir amebíase no diagnóstico diferencial ao examinar cães que apresentem sinais neurológicos e respiratórios progressivos ou desordens sistêmicas graves. As altas temperaturas observadas durante os meses mais quentes na região semiárida do Nordeste do Brasil podem contribuir para a persistência e a proliferação de amebas de vida livre e, portanto, predispor a infecções nos animais.

REFERÊNCIAS

- Ayers, K.H., Billups, L.H., Gamer, F.M., 1972. Acanthamoebiasis in a dog. *Vet. Pathol.* 9, 221–226.
- Bauer, R.W., Harrison, L.R., Watson, C.W., Styer, E.L., Chapman, Jr. W.L., 1993. Isolation of *Acanthamoeba* sp. from a greyhound with pneumonia and granulomatous amebic encephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 386–391.
- Daft, B.M., Visvesvara, G.S., Read, D.H., Kinde, H., Uzal, F.A., Manzer, M.D. 2005. Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 605–609.
- Dubey, J.P., Benson, J.E., Blakeley, K.T., Booton, G.C., Visvesvara, G.S., 2005. Disseminated *Acanthamoeba* sp. infection in a dog. *Vet. Parasitol.* 128, 183–187.
- Foreman, O., Sykes, J., Ball, L., Yang, N., De Cock, H., 2004. Disseminated infection with *Balamuthia mandrillaris* in a dog. *Vet. Pathol.* 41, 506–510.
- Kent, M., Platt, S.R., Rech, R.R., Eagleson, J.S., Howerth, E.W., Shoff, M., Fuerst, P.A., Booton, G., Visvesvara, G.S., 2011. Multisystemic infection with an *Acanthamoeba* sp in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 238, 1476–1481.
- Kinde, H., Read, D.H., Daft, B.M., Manzer, M., Nordhausen, R.W., Kelly, D.J., Fuerst, P.A., Booton, G., Visvesvara, G.S., 2007. Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 317–322.
- Lozano-Alarcón, F., Bradley, G.A., Houser, B.S., Visvesvara, G.S., 1997. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American Tapir. *Vet. Pathol.* 34, 239–244.
- Martinez, A.J., Visvesvara, G.S., 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7, 583–598.
- Morales, J.A., Chaves, A.J., Visvesvara, G.S., Dubey, J.P., 2006. *Naegleria fowleri* - associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Vet. Parasitol.* 139, 221–223.
- Pearce, J.R., Powell, H.S., Chandler, F.W., Visvesvara, G.S., 1985. Amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187, 951–952.

- Pimentel, L.A., Dantas, A.F.M., Uzal, F., Riet-Correa, F., 2012. Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil. *Res. Vet. Sci.* 93, 811–812.
- Reed, L.T., Miller, M.A., Visvesvara, G.S., Gardiner, C.H., Logan, M.A., Packer, R.A., 2010. Diagnostic exercise: Cerebral mass in puppy with respiratory distress and progressive neurologic signs. *Vet. Pathol.* 47, 1116–1119.
- Van der Lugt, J.J., Van der Merwe, H.E., 1990. Amoebic meningoencephalitis in a sheep. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 61, 33–36
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 1–26.

CAPÍTULO II

Toxoplasma gondii associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da Paraíba, Brasil

Trabalho enviado à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

***Toxoplasma gondii* associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da Paraíba, Brasil**

Maria T. S. Frade, Lisanka A. Maia, Rachel L.F.S. Andrade,
Rinaldo A. Mota, Elise M. Yamasaki e Antônio F. M. Dantas

Autor para correspondência: Antônio Flávio Medeiros Dantas, Hospital Veterinário, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, SN, Bairro Santa Cecília, Patos-PB, 58.708-110. E-mail: dantas.af@uol.com.br

**Toxoplasmose associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da
Paraíba, Brasil²**

Maria T. S. Frade², Lisanka A. Maia², Rachel L. F. S. Andrade², Antônio F. M. Dantas²,
Rinaldo A. Mota³ e Elise M. Yamasaki³

ABSTRACT.- Frade M.T.S., Maia L.A., Andrade R.L.F.S., Dantas A.F.M., Mota R.A. & Yamasaki E.M. 2013. [*Toxoplasmosis associated with canine distemper virus in dogs in the semiarid region of Paraíba, Brazil.*] *Toxoplasma gondii* associado ao vírus da cinomose canina em cães no semiárido da Paraíba, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos da Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, SN, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58.708-110, Brazil. E-mail: dantas.af@uol.com.br

Describes itself five cases of toxoplasmosis in dogs in the semiarid region of Paraíba, four with involvement of the brain and one with lung involvement, associated with infection with canine distemper virus. The clinical alterations were similar in all cases and consisted of signs digestive, respiratory, neurological and ocular lesions suggestive of infection with canine distemper virus. The tissues had been fixed in 10% formalin and processed for histopathology and stained with hematoxylin and eosin (HE). Histologically in the encephalon had multifocal areas of malacia, and these areas were observed near or strongly basophilic round structures measuring about of 5-70 µm contain within numerous basophilic structures corresponding to bradyzoites, delimited by a thin wall, characteristic of cysts of *Toxoplasma gondii*. Encircling these areas had mononuclear inflammatory infiltrate composed mainly of lymphocytes, plasma cells,

²Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, S/N, Bairro Santa Cecília, 58708-110, Patos, PB.

²PPGMV, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos, PB, Brasil.*Autor para correspondência: dantas.af@uol.com.br

³Laboratório de Microbiologia, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

macrophages and rare neutrophils. In the lung had thickening of the alveolar septa by mononuclear inflammatory infiltrate composed of macrophages, lymphocytes and plasma cells, with moderate proliferation of type II pneumocytes. There were multifocal to coalescing areas of necrosis with macrophages associated with *T. gondii*. The histological findings compatible with distemper were characterized mainly by non-suppurative encephalitis, demyelination and perivascular cuffs discrete, associated the corpuscles of eosinophilic intranuclear and/or intracytoplasmic inclusions in astrocytes, neurons and ependymal cells. There were also corpuscles inclusions in extraneural organs, as in the parietal cells and main of the gastric mucosa, urothelium of the bladder and renal pelvis epithelium of bronchi and bronchioles, epithelial duct and pancreatic acinar and mononuclear cells. Was performed immunohistochemistry (IHC) with polyclonal anti-*Toxoplasma gondii* antibodies produced in rabbits, confirming the etiology by positive immunostaining. The diagnosis of toxoplasmosis associated with infection with canine distemper virus in the five cases studied was based on the microscopic findings, and confirmed by immunohistochemistry. Toxoplasmosis shall be included in the differential diagnosis of dogs with severe progressive systemic signs, especially when respiratory and neurologic involvement.

INDEX TERMS: Diseases of dogs, immunosuppression, bradyzoites, toxoplasmosis, immunohistochemistry.

RESUMO.- Descreve-se cinco casos de toxoplasmose em cães no semiárido da Paraíba, sendo quatro com envolvimento do encéfalo e um com envolvimento do pulmão, associados à infecção pelo vírus da cinomose canina. As alterações clínicas foram semelhantes em todos os casos e consistiam de sinais digestivos, respiratórios, neurológicos e lesões oculares, sugestivos de infecção pelo vírus da cinomose canina. Os tecidos haviam sido fixados em formol à 10%, processados para histopatologia e corados pela hematoxilina e eosina (HE). Histologicamente havia no encéfalo áreas multifocais de malacia associadas a estruturas arredondadas fortemente basofílicas medindo aproximadamente de 5 a 70 μm , contendo no seu interior numerosas estruturas basofílicas, correspondentes aos bradizoítos, delimitados por uma fina parede, característicos de cistos de *Toxoplasma gondii*. Circundando essas áreas havia infiltrado inflamatório mononuclear, constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos,

macrófagos e raros neutrófilos. No pulmão havia espessamento dos septos alveolares por infiltrado inflamatório mononuclear, constituído de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, com proliferação moderada de pneumócitos tipo II. Havia ainda áreas multifocais a coalescentes de necrose com macrófagos associadas a *T. gondii*. Os achados histológicos compatíveis com cinomose caracterizavam-se principalmente por encefalite não supurativa, desmielinização e manguitos perivasculares discretos, associada a corpúsculos de inclusões eosinofílicas intranucleares e/ou intracitoplasmáticas em astrócitos, neurônios e em células endoteliais. Havia também corpúsculos de inclusões em órgãos extraneurais, como em células parietais e principais da mucosa gástrica, urotélio da bexiga e pelve renal, epitélio de brônquios e bronquíolos, epitélio de ductos e ácinos pancreáticos e em células mononucleares. Foi realizada a imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii* produzido em coelho, confirmando a etiologia através da imuno-marcação positiva. O diagnóstico de toxoplasmose associado à infecção pelo vírus da cinomose nos cinco casos estudados foi baseado nos achados microscópicos, sendo confirmados através da imuno-histoquímica. A toxoplasmose deve ser incluída no diagnóstico diferencial de cães com sinais sistêmicos progressivos severos, principalmente quando há envolvimento respiratório e neurológico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de cães, imunossupressão, bradizoítos, toxoplasmose, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

Infecções pelo protozoário *Toxoplasma gondii* é amplamente prevalente nos seres humanos e animais em todos os continentes, sendo uma zoonose que acomete diversas espécies de mamíferos e aves (Dubey 2007, Fialho, Teixeira & Araujo 2009).

No Brasil, estudos sorológicos demonstram alta prevalência na população canina nos Estados de Mato Grosso (Santos et al. 2009), Paraná (Giraldi et al. 2002), Pará (Valadas et al. 2010), Paraíba (Azevedo et al. 2005) e São Paulo (Brito et al. 2002, Silva et al. 2010), correspondendo respectivamente a 88,5%, 82,5%, 69,9%, 45,1%, 32,5% e 25,4%.

A imunidade não elimina uma infecção estabelecida por *T. gondii* e cistos teciduais persistem vários anos após a infecção aguda. No entanto, em indivíduos

imunocomprometidos, a infecção pode ser reativada pela disseminação de bradizoítos e conversão para taquizoítos nos tecidos (Dubey 2004), em cães geralmente associada ao vírus da cinomose canina (Aguilar et al. 2012, Moretti et al. 2002, Moretti et al. 2006, Silva et al. 2007).

O presente trabalho tem por objetivo relatar a ocorrência de cinco casos de toxoplasmose associado à cinomose em cães no semiárido da Paraíba, descrevendo as características clínicas, patológicas e imuno-histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram revisadas todas as fichas de necropsias de cães diagnosticados com cinomose no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2012.

Os casos que apresentavam concomitantemente estruturas císticas intralesionais características de protozoários, morfológicamente compatível com *Toxoplasma gondii* foram separados. Posteriormente foram avaliados os sinais clínicos e as alterações macroscópicas e microscópicas descritas nos laudos de necropsias.

Para confirmação do agente foram selecionados blocos de parafina para realização de imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpo anti-*Toxoplasma gondii*. O critério para seleção dos blocos foi à presença de estruturas características de protozoários intralesionais em tecidos corados pela hematoxilina e eosina.

Foram realizados cortes de 3µm a partir do tecido em blocos de parafina e aplicados sobre lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath). Em seguida, os cortes foram desparafinados e reidratados. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada por duas vezes de 10 minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato (pH 6,0) em forno microondas por 10 minutos em potência máxima e logo após as lâminas foram esfriadas por 10 minutos em banho-maria frio. Para a diminuição das ligações inespecíficas (“background”), os cortes foram tratados com leite em pó desnatado (Molico) a 5% diluído em água destilada durante 30 minutos. Os cortes foram incubados em câmara úmida a 37 °C por 60 minutos com o anticorpo primário policlonal anti-*Toxoplasma gondii* produzido em coelho na diluição de 1:100 em diluente de anticorpo (PBS - pH 7.4, EasyPath). O reagente secundário foi biotinilado, seguido por Streptavidina-

peroxidase (LSAB+System-HRP, Dako), incubados à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida e marcados através da adição do cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB; Dako) por 2 minutos, inativados por água. Os cortes foram lavados e levemente contra-corados com hematoxilina de Harris, posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos e desidratados em graduações de álcool, clarificadas em xilol e montadas com lamínulas e Entellan. Como controle negativo, as mesmas secções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por PBST.

RESULTADOS

No período de janeiro de 2003 a dezembro de 2012 foram realizadas 1022 necropsias de cães, sendo diagnosticados 132 (12,9%) casos de cinomose. Desses foram encontrados cinco casos de cinomose associados a cistos parasitários característicos de *Toxoplasma gondii* intralesionais (3,7%), sendo quatro casos no encéfalo e um no pulmão.

Os sinais clínicos foram semelhantes em todos os casos e sugestivos de infecção pelo vírus da cinomose canina, variando de alterações digestivas, respiratórias, neurológicas e lesões oculares (Quadro 1).

Quadro 1. Casos de toxoplasmose associado à cinomose.

Caso	Raça/Sexo/Idade	Sinais clínicos
1	Pastor belga, Fêmea, 5 meses	Secreção ocular, salivação, diarreia, mioclonias.
2	SRD, Macho 7 anos	Anorexia, tosse, andar cambaleante, tenesmo, prostração, estrabismo, mioclonias.
3	SRD, Fêmea 8 anos	Secreção ocular, diarreia, mioclonias.
4	Pinscher, Fêmea 3,7 anos	Febre, secreção ocular e nasal, diarreia, estertores pulmonares, andar em círculos.
5	SRD, Macho 6 meses	Anorexia, secreção ocular e nasal, salivação, vocalização mioclonias.

Não foram descritas lesões macroscópicas significativas características de infecção pelo *T. gondii* no encéfalo e nem nos pulmões. Os cinco cães tiveram

diagnóstico clínico para cinomose que foram confirmados na histopatologia através da presença de corpúsculos de inclusões virais eosinofílicos intranucleares e intracitoplasmáticos em diferentes tecidos. O exame histopatológico revelou ainda a presença dos cistos parasitários característicos de *T. gondii* no encéfalo (Casos 1, 2, 3 e 4) e no pulmão (Caso 5).

Microscopicamente no encéfalo a lesão era caracterizada por áreas multifocais de malacia, associadas a estruturas arredondadas fortemente basofílicas medindo aproximadamente de 5 a 70 μm , contendo no seu interior numerosas estruturas basofílicas, correspondentes aos bradizoítos delimitados por uma fina parede, características de *Toxoplasma gondii* (Figura 1). Circundando essas áreas havia infiltrado inflamatório mononuclear, constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e raros neutrófilos.

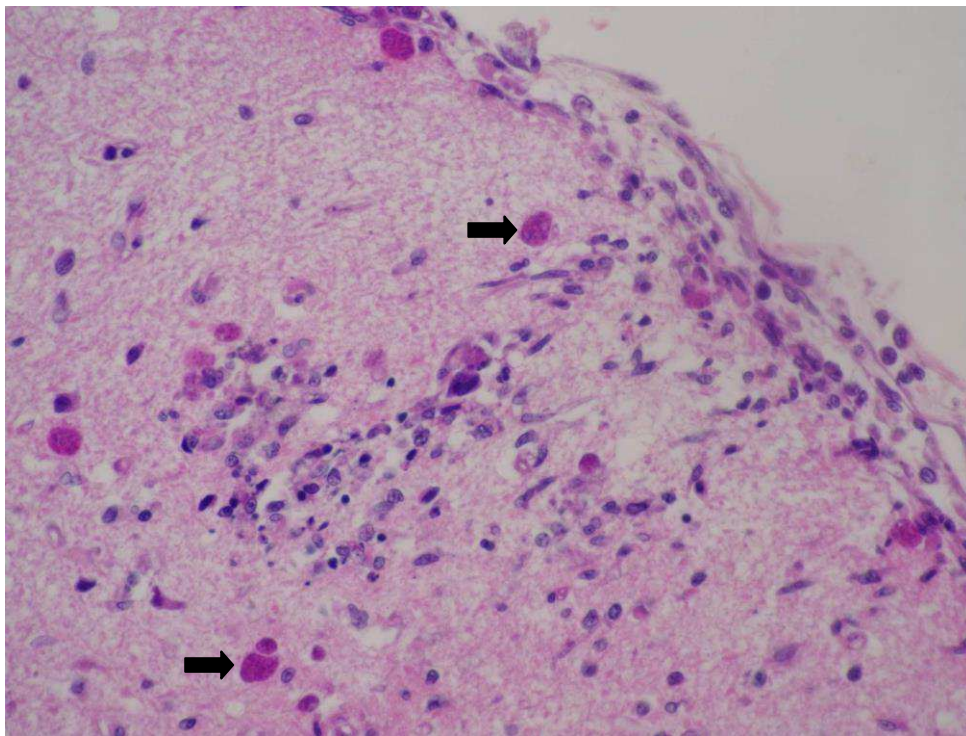


Figura 1. Toxoplasmose, cerebelo (substância cinzenta). Observam-se múltiplas estruturas de *Toxoplasma gondii* (setas), associada a infiltrado inflamatório mononuclear. Obj. 20x.

Em dois casos as lesões foram visualizadas no córtex e cerebelo (Casos 1 e 2). No caso 3, as lesões ficaram restritas ao pedúnculo cerebelar. No caso 4 a lesão estava presente no córtex frontal, em núcleos da base, tálamo, hipocampo, pedúnculo cerebelar e cerebelo, com grande quantidade de células *gitter* e leptomeningite linfohistioplasmocitária.

No caso 5 os cistos parasitários foram observados apenas no pulmão. A lesão era caracterizada por espessamento dos septos alveolares por infiltrado inflamatório mononuclear, constituído de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, com proliferação moderada de pneumócitos tipo II. Por vezes havia áreas multifocais à coalescentes de necrose com macrófagos associadas a *T. gondii*.

Os achados histológicos compatíveis com cinomose caracterizavam-se principalmente por encefalite não supurativa, desmielinização e manguitos perivasculares discretos, associada a corpúsculos de inclusões eosinofílicas intranucleares em astrócitos, intracitoplasmáticos e intranucleares em neurônios e em células ependimárias. Corpúsculos de inclusões também foram observados em órgãos extraneurais, como em células parietais e principais da mucosa gástrica, urotélio da bexiga e pelve renal, epitélio de brônquios e bronquíolos, epitélios de ductos e ácinos pancreáticos e em células mononucleares.

Os cistos parasitários observados nos tecidos lesionados foram positivos pela imuno-histoquímica para *T. gondii* em todos os casos (Figura 2).

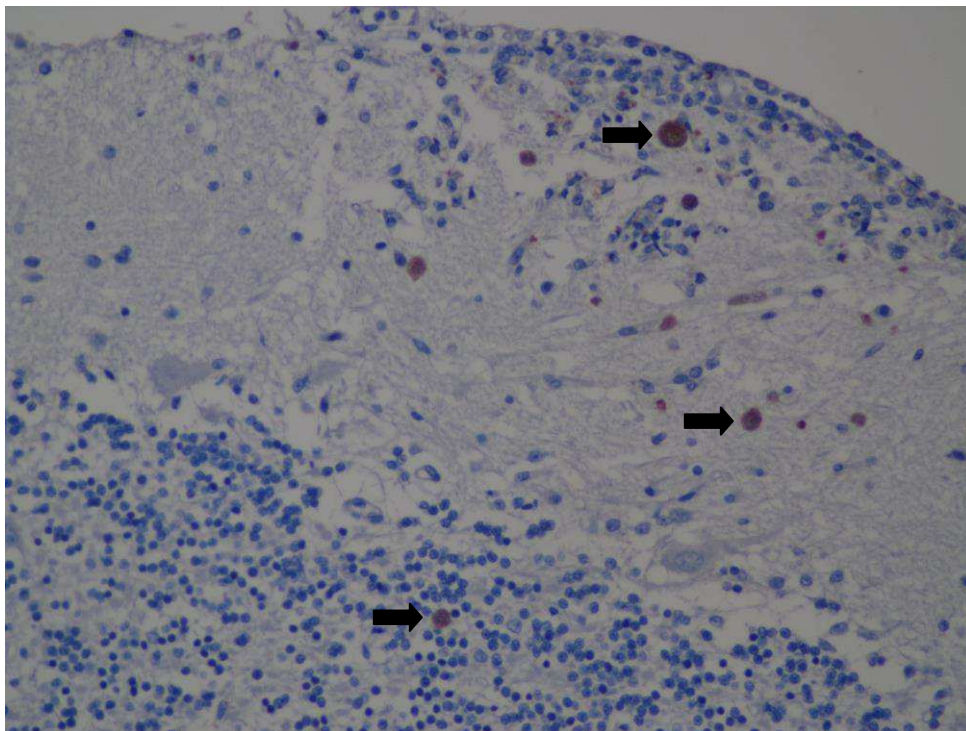


Figura 2. Toxoplasmose, cerebelo. Imunomarcção positiva para *T. gondii*, mostrando múltiplos exemplares do protozoário (setas) nas camadas molecular e granular (substância cinzenta). Imuno-histoquímica, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-corada com hematoxilina de Harris. Obj. 20x.

Também foram observadas estruturas características de taquizoítos no citoplasma de macrófagos e em células endoteliais de vasos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de toxoplasmose associado à infecção pelo vírus da cinomose nos cinco casos estudados foi baseado nos achados microscópicos e confirmados através da imuno-histoquímica.

A realização da imuno-histoquímica é importante para diferenciar *Toxoplasma gondii* de *Neospora caninum*, visto que são protozoários relacionados e estruturalmente semelhantes, apesar de que nos cães *T. gondii* quase sempre está associado com doença concomitante, como a cinomose, enquanto *N. Caninum* parece ser um patógeno primário (Maxie & Youssef 2007, Lappin 2008, Zachary 2013).

A doença clínica causada pelo *T. gondii* é rara. Da mesma forma, é amplamente conhecido que a manifestação clínica mais grave da toxoplasmose ocorre em cães imunossuprimidos (Moretti et al. 2002). Embora sejam relatados casos de cães com distúrbios neurológicos associados à de cistos de *T. gondii*, em que lesões compatíveis com cinomose estiveram ausentes (Giraldi et al. 2002). Nesse estudo os sinais clínicos observados foram atribuídos a infecção pelo vírus da cinomose.

Dos cinco casos de *T. gondii* associados à infecção pelo vírus da cinomose, quatro apresentavam comprometimento do encéfalo. As duas enfermidades podem ocorrer concomitantemente, sendo que a sintomatologia nervosa observada é indistinguível, e há elevada letalidade quando da ocorrência simultânea destes dois agentes em cães (Nelson & Couto 1994, Moretti et al. 2002).

Silva et al. (2007) demonstrou que a toxoplasmose foi a co-infecção mais frequentemente observada em cães com a forma neurológica de cinomose, sendo um caso de *T. gondii* no encéfalo e quatro apresentaram toxoplasmose visceral.

Apesar da falta de dados referentes à anamnese destes animais, sugere-se que a ausência de imunoprofilaxia para cinomose, pode ter levado a ocorrência da mesma, com consequente infecção ou reativação de *T. gondii*, sendo fatal. Os fatores importantes para ocorrência de toxoplasmose em cães são ingestão de carne crua, livre acesso à rua e alimentos ou água contaminadas por fezes e/ou coabitação com felinos (Moretti et al. 2002, Dubey 2004, Azevedo et al. 2005, Silva et al. 2010).

O cão apresenta importância epidemiológica por atuar como sentinela da infecção para o homem (Silva et al. 2010) e como fator de risco para saúde pública por estarem envolvidos na transmissão mecânica e *T. gondii* para os homens (Lindsay 1997).

A toxoplasmose deve ser incluída no diagnóstico diferencial de cães com sinais sistêmicos progressivos severos, principalmente quando há envolvimento respiratório e neurológico, causando agravamento do quadro clínico e menor evolução clínica da doença até a morte.

REFERÊNCIAS

Aguiar D. M., Amude A. M., Santos L.G.F., Ribeiro M.G., Ueno T.E.H., Megid J., Paes A.C., Alfieri A.F., Alfieri A.A. & Gennari, S.M. 2012. Canine distemper virus and *Toxoplasma gondii* co-infection in dogs with neurological signs. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 64:221-224.

Azevedo S.S., Batista C.S., Vasconcellos S. A., Aguiar D. M., Ragozo A. M., Rodrigues A. A., Alves C. J. & Gennari S. M. 2005. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. Research in Veterinary Science 79:51-56.

Brito A.F., Souza L.C., Silva A.V. & Langoni H. 2002. Epidemiological and Serological Aspects in Canine Toxoplasmosis in Animals with Nervous Symptoms. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97:31-35.

Dubey J.P. 2004. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. Veterinary Parasitology 126:57-72.

Dubey J.P. 2007. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. p. 1-17. In: Weiss L.M. & Kim K. (eds.) *Toxoplasma gondii* the model apicomplexan: perspectives and methods. Academic Press, London, United Kingdom.

Fialho C.G., Teixeira M.C. & Araujo F.A.P. 2009. Toxoplasmose animal no Brasil. Acta Scientiae Veterinariae 37:1-23

Giraldi J.H., Bracarense A.P.F.R.L., Vidotto O., Tudury E.A., Navarro I.T. & Batista T.N. 2002. Sorologia e histopatologia de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. Semina: Ciências Agrárias 23:9-14.

Lappin M. R. 2008. Infecções protozoárias e mistas, p. 430-439. In: Ettinger, J. S.; Feldman, E. C (Eds), Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Lindsay D.S., Dubey J.P., Butler J.M. & Blagburn B.L. 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dog. *Veterinary Parasitology* 73:27-33.

Maxie M.G. & Youssef S. 2007. Nervous system, p. 281-457. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.1. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Moretti L.A., Ueno T.E., Ribeiro M.G., Aguiar D. M., Paes A.C., Pezerico S.B. & Silva A.V. 2002. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. *Semina: Ciências Agrárias* 23:85-91.

Moretti L.A., Silva A.V., Ribeiro M.G., Paes A.C. & Langoni H. 2006. *Toxoplasma gondii* GENOTYPING IN A DOG CO-INFECTED WITH DISTEMPOR VIRUS AND EHRLICHIOSIS RICKETTSIA. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 48:359-363.

Nelson R.W. & Couto C.G. 1994. Encefalite/mielite/ meningite, p.566-71. In: Nelson, R.W. & Couto, C.G. (Eds), Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Santos T.R., Costa A.J., Toniollo G.H., Luvizotto M.C.R., Benetti A.H., Santos R.R., Matta D.H., Lopes W.D.Z., Oliveira J.A. & Oliveira G.P. 2009. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 161:324-326.

Silva M.C., Figuera R.A., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2007. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesq. Vet. Bras.* 27:215-220.

Silva R.C., Lima V.Y., Tanaka E.M., Silva A.V., Souza L.C. & Langoni H. 2010. Risk factors and presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs from the coast of São Paulo State, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 30:161-166.

Valadas S., Minervino A.H., Lima V.M., Soares R.M., Ortolani E.L., Gennari S.M. 2010. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum*, anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Leishmania chagasi* in serum of dogs from Pará State, Amazon Brazil. *Parasitol Res.* 107:453-457.

Zachary J.F. 2013 Sistema Nervoso, p. 774-873. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Bases da Patologia em Veterinária*. 5th ed (tradução). Mosby Elsevier, Rio de Janeiro.

CONCLUSÕES

Com a realização destes trabalhos, pode-se concluir que as infecções secundárias oportunistas associadas ao vírus da cinomose ocorrem em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFCG, causando complicações clínicas sistêmicas graves e morte dos animais.

Casos esporádicos de amebíase sistêmica e de toxoplasmose encefálica e pulmonar ocorrem em cães na região semiárida da Paraíba, todos associados à cinomose e que medidas de controle e profilaxia da doença devem ser mais efetivas no intuito de diminuir a sua ocorrência.

Estas doenças devem ser consideradas no diagnóstico diferencial principalmente de cães com suspeita clínica de cinomose, que apresentam sinais pulmonares e neurológicos progressivos.

ANEXOS

1. Guide for authors - Veterinary Parasitology

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System -<http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

A cover letter is required for each new submission. It should address the novelty and significance of the work and how it fits within the defined scope of *Veterinary Parasitology*. Essential information, issues of concern or potential problems, (such as other publications or submissions containing similar information) should be identified in the cover letter. Authors who submit papers based on local data/surveys will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-Non Commercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses,

such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy

www.elsevier.com/openaccesspricing

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following

URL: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:
Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results**Discussion****Conclusion**

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References**Tables****Figure captions**

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however,

should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*
Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. *For books*

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. *For multi-author books*

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are advised to consult the *Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD)* published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299-326).

Submission of sequence data to databases

New nucleotide or amino acid sequence data must be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank™, EMBL or DDJB, and an accession number obtained and submitted to the Publisher (at the latest) together with the final, revised manuscript. The accession number should appear in a separate paragraph in the Materials and Methods section (example: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers: **XXXX**, **XXXX**). In order for automatic links to be made between papers and databases, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. When published they will appear in normal type. Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax

+44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download

Adobe Reader version 7 available free from

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given

at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please

use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage

<http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Veterinary Parasitology* has no page charges**

2. Instruções aos autores – Pesquisa Veterinária Brasileira

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). **Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos**

demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será **incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.