

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

**ACTINOMICETOS DIAGNOSTICADOS EM FELINOS NO SERTÃO DA
PARAÍBA**

MILLENA DE OLIVEIRA FIRMINO

PATOS - PB

2017



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

**ACTINOMICETOS DIAGNOSTICADOS EM FELINOS NO SERTÃO 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: Millena de Oliveira Firmino

Orientador: Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas

PATOS - PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

F525a Firmino, Millena de Oliveira
 Actinomicetos diagnosticados em felinos no sertão da Paraíba / Millena
 de oliveira Firmino. – Patos, 2017.
 53f.; il.;Color

 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal
 de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2017.

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

 Referências.

 1. Doenças de felinos. 2. Granulomas. 3. *Mycobacterium* spp. 4.
 Nocardia spp. 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


**ACTINOMICETOS DIAGNOSTICADOS EM FELINOS NO SERTÃO DA
PARAÍBA**

Dissertação de Mestrado elaborada por


MILLENA DE OLIVEIRA FIRMINO

Aprovada em 22/02/2017.

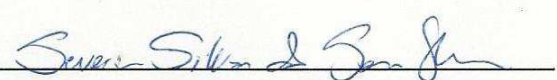
BANCA EXAMINADORA



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. Severino Silvano dos Santos Higino
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB

Patos - PB

2017

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por me dar sabedoria, oportunidade de viver, iluminar e abençoar minha trajetória;

Aos meus pais por terem aberto mão de muitas coisas para proporcionar a educação que tenho hoje, pelo apoio durante esta jornada, por todo amor e preocupação destinado a mim e meus irmãos. São exemplos de honestidade e caráter para a família. Aos meus irmãos Pablo e Palloma pelo amor incondicional;

À minha segunda mãe e madrinha Tia Selma (*in memoriam*) por todo carinho e cuidados despendido a mim;

À Sabrina, Talina, Raul, Cintia, Stephano por toda amizade e apoio nos momentos difíceis, mesmo tendo nos distanciado pelas circunstâncias da vida, sei que sempre posso contar com vocês;

À Jussara Rodrigues, Raquel Fagundes, Kalyne Oliveira, Joyce Vasconcelos, Yanca Goés, Sarah Brasil, José Eliomar, Erika Queiroz e Samara pela amizade, o convívio com vocês facilita o dia-a-dia aqui em Patos longe da família. Agradeço a Deus por ter colocado vocês no meu caminho;

A todos os meus colegas (Rodrigo, Roberio, Aline, Telma, Jackson, Édipo, Platini, Jefferson, Gian e Ismael) do Laboratório de Patologia Animal, por todos os conhecimentos compartilhados, contribuindo assim com minha formação; em especial a Talita Frade e Lisanka Maia pelo apoio e incentivo na época do meu estágio final no setor e ingresso na Pós-Graduação, vocês são meu exemplo de dedicação e profissionalismo frente ao nosso laboratório;

À todos os estagiários do Laboratório de Patologia Animal, em especial a Jussara, Raquel, Luana, Artéfio, Davi, Júnior e Amanda por toda ajuda e apoio diário na condução dos nossos trabalhos;

À todos os profissionais do Hospital Veterinário, principalmente da Clínica de Pequenos Animais que nos auxiliaram na condução destes trabalhos e ao seu Cuité por todo auxílio diário;

À Maria das Neves (Nevinha) pelos conselhos, apoio, carinho e ajuda na confecção das lâminas e nas colorações especiais, que foram essenciais para elaboração destes trabalhos, sendo peça fundamental para nosso laboratório. E aos demais funcionários do LPA, Edinho e Dona Joana, que contribuem diariamente na condução da nossa rotina;

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas, por ter aberto as portas do LPA para que eu pudesse participar da rotina do laboratório e por acreditar no meu trabalho. Sua simplicidade, sabedoria e bom humor são de grande admiração;

Ao Prof. Dr. Glauco José Nogueira de Galiza pelos conhecimentos compartilhados e dicas para a realização das histoquímicas especiais destes trabalhos;

A todos aqueles que conheci nos últimos anos, que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena e que tenham contribuído de alguma forma para o meu crescimento quer seja profissional ou pessoal, direta ou indiretamente;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

RESUMO

Vários actinomicetos são responsáveis por desenvolverem doenças em animais domésticos e no homem, causando diversas manifestações clínicas, que podem evoluir para a morte dos animais afetados. Geralmente as características das lesões causadas por esses microrganismos são semelhantes, cuja função da resposta tecidual do hospedeiro visa circundar o microrganismo em contingente celular delimitado por cápsula fibrosa, com vistas a impedir sua dispersão via sistêmica ou por ação direta do agente na região circunvizinha. No exame histopatológico, é possível identificar uma arquitetura celular típica, formando granulomas e/ou piogranulomas. Esta dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande é composta por dois capítulos constituídos por artigos científicos. O primeiro capítulo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira e o segundo submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. O primeiro artigo dessa dissertação descreve as características clínicas, patológicas, imunohistoquímicas e moleculares de micobactérias em felinos diagnosticados no sertão da Paraíba. O segundo descreve quatro casos de nocardiose em felinos domésticos, abordando as principais características clínicas, anatomopatológicas e morfotintoriais da *Nocardia* spp. São doenças que ocorrem esporadicamente em gatos e que nos últimos anos vem aumentando o diagnóstico no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande. É importante ressaltar o diagnóstico de tuberculose felina por *Mycobacterium bovis* para a saúde pública, por possuir potencial zoonótico e muitos dos animais infectados apresentarem sinais clínicos inespecíficos. E que as infecções por micobactérias e por *Nocardia* spp. devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de felinos com emagrecimento progressivo, linfadenopatia, dispneia, piotórax, peritonite e sinais neurológicos.

Palavras-chave: Doenças de felinos, granulomas, *Mycobacterium* spp. e *Nocardia* spp.

ABSTRACT

Several actinomycetes are responsible for developing diseases in domestic animals and humans. Causing various clinical manifestations, which may evolve to the death of affected animals. Generally the characteristics of the lesions caused by these microorganisms are similar, whose function of the host tissue response is to surround the microorganism in a cellular contingent delimited by a fibrous capsule, in order to prevent its dispersion via systemic or direct action of the agent in the surrounding region. In histopathological examination, it's possible to identify a typical cellular architecture, forming granulomas and/or piogranulomas. This dissertation presented to the Graduate Program in Veterinary Medicine of the Federal University of Campina Grande is composed by two chapters constituted by scientific articles. The first chapter was submitted to the Brazilian Veterinary Research Magazine and the second ~~one~~ submitted to the Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Animal Science. The first article of this dissertation describes the clinical, pathological, Immunohistochemistry and molecular characteristics of mycobacteria in felines diagnosed in the Backland od Paraiba, Brazil. The second article describes four cases of nocardiosis in domestic felines, approaching the main clinical, pathological and morphotintorial features of *Nocardia* spp. These diseases are sporadically diagnosed in cats and in recent years have been increasing their occurrence in the Animal Pathology Laboratory of the Federal University of Campina Grande. It's importante to emphasize the diagnosis of feline tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* for local public health because it has zoonotic potential and many of the infected animals show nonspecific clinical signs. And that infections by mycobacteria and by *Nocardia* spp. should be included in the differential diagnosis of felines with progressive weight loss, lymphadenopathy, dyspnea, piothorax, peritonitis and neurological signs.

Key word: Feline diseases, granulomas, *Mycobacterium* spp. and *Nocardia* spp.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	9
Lista de quadros.....	11
Introdução.....	12
Referências.....	14
Capítulo I - Micobactérias diagnosticadas em felinos no Sertão da Paraíba.....	16
Abstract.....	17
Resumo.....	18
Introdução	19
Material e Métodos	21
Resultados	22
Discussão	27
Conclusão.....	29
Referências	29
Capítulo II - Diagnóstico morfohistoquímico da nocardiose felina.....	32
Abstract.....	33
Resumo.....	34
Introdução	34
Material e Métodos	36
Resultados	36
Discussão	42
Conclusão.....	44
Referências	44
Considerações finais.....	47
Anexos.....	48
1.Instruções aos autores - Pesquisa Veterinária Brasileira	49
2.Instruções aos autores- Arquivo Brasileiro em Medicina Veterinária e Zootecnia.....	51

LISTA DE FIGURA

Capítulo I - Micobactérias diagnosticadas em felinos no Sertão da Paraíba.. 16

Figura 1 - Tuberculose em felino (caso 2). A) Observa-se linfonodo submandibular esquerdo com aumento de volume. B) Linfonodo mesentérico. Observam-se áreas amareladas irregulares friáveis e caseosa na superfície de corte. C) Linfonodo poplíteo. Visualizam-se áreas amarelas friáveis e caseosa associada a áreas multifocais brancacentas e firmes (asterisco). D) Pulmão. Observam-se no lobo pulmonar caudal direito áreas multifocais amareladas discretamente elevadas na superfície pleural (setas)..... 24

Figura 2 - Infecção micobacteriana em felinos. A) Pulmão. Observam-se áreas multifocais a coalescentes de granulomas. HE. Obj. 10x. B) Pulmão. Observa-se granuloma focal. HE. Obj. 20x. C) Linfonodo traqueobrônquico. Observam-se granulomas multifocais a coalescentes. HE. Obj. 20x. D) Fígado. Observa-se granuloma focal. HE. Obj. 40x. E) Linfonodo traqueobrônquico. Observam-se bacilos álcool-ácido-resistentes (setas) livre e no interior de macrófagos. Ziehl-Neelsen. Obj. 40x. F) Linfonodo traqueobrônquico. Observa-se imunomarcção positiva (cabças de setas) para o anticorpo anti-*Mycobacterium* spp. IHQ. Obj. 40x..... 26

Capítulo II - Diagnóstico morfohistoquímico da nocardiose felina..... 32

Figura 1 - Nocardiose felina. A) Face visceral do fígado. Observa-se massa multilobulada, branco-amarelada, adjacente à vesícula biliar, colédoco e linfonodo hepático. B) Face ventral da cabeça. Demonstra aumento de volume do ramo mandibular direito de superfície irregular e amarelada. C) Corte transversal da mandíbula. Verificam-se áreas multifocais amareladas (seta). D) Cavidade torácica. Observa-se acentuado piotórax e áreas multifocais de aderências entre as pleuras parietal e visceral. E) Observa-se massa vermelho-amarelada de superfície irregular com áreas puntiformes amarelo-esverdeada restrita ao omento. F)

Cavidade abdominal. Verifica-se líquido turvo acastanhado e fibrina aderida principalmente na superfície capsular do fígado e serosa intestinal..... 39

Figura 2 - Nocardiose felina. A) Fígado. Observa-se piogranuloma constituído por área central de necrose com neutrófilos íntegros e degenerados circundados por macrófagos epitelióides formando uma pseudoroseta, circunscrito por discreta fibrose. HE. Obj. 40x. B) Omento. Observam-se estruturas filamentosas, ramificadas, formando agregados, impregnadas pela prata. GMS. Obj. 40x. C) Omento. Observam-se estruturas filamentosas semelhantes coradas em azul. Gram tipo Brow-Brenn. Obj. 40x. D) Observam-se estruturas filamentosas semelhantes coradas em vermelho. Ziehl-Neelsen modificado. Obj. 40x. E) Omento. Observam-se discretas estruturas filamentosas, ramificadas, fracamente coradas em rósea. Giemsa. Obj. 40x. F) Citologia de massa abdominal. Observam-se estruturas filamentosas ramificadas em agregado frouxo impregnados pela prata. GMS. Obj. 40x..... 41

LISTA DE QUADROS

Capítulo I - Micobactérias diagnosticadas em felinos no Sertão da Paraíba....	16
Quadro 1 - Características epidemiológicas, clínicas, evolução, órgãos afetados e diagnóstico morfológico das infecções micobacterianas diagnosticados em felinos no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.....	23
Capítulo II - Diagnóstico morfohistoquímico da nocardiose felina.....	32
Quadro 1 - Características clínico-epidemiológicas, órgãos afetados e diagnóstico morfológico da nocardiose felina.....	37

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos fazem parte de um grande e diverso grupo de bactérias Gram-positivas, as quais microscopicamente apresentam-se filamentosas, bacilares ou cocobacilares (MALIK et al., 2006). Esses microrganismos possuem em comum a presença de lipídios e ácido micólico na estrutura da parede celular, que induz a formação de lesões crônicas piogranulomatosas e/ou granulomatosas de difícil resolução tecidual (RIBEIRO et al., 2008; RIBEIRO & CONDAS, 2016) e pouco responsivas à terapia antimicrobiana convencional (RIBEIRO et al., 2008).

Dentre os vários actinomicetos, os principais gêneros de interesse Médico Veterinário para os animais de companhia, destacam-se *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp. e o *Mycobacterium* spp. Caracteristicamente, são microrganismos de baixa patogenicidade e de caráter oportunista que demandam lesão tissular prévia, com exceção de algumas espécies de *Mycobacterium* (COUTO et al., 2000). Comumente essas infecções ocorrem por mordeduras, arranhões ou contaminação por lambedura dos ferimentos expostos (GINN et al., 2007; GROSS et al., 2009) ou em casos em que os animais estejam sob condições imunossupressivas, o que facilita o comportamento oportunista dessas bactérias, como ocorre em cães com cinomose e felinos portadores do vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina (MALIK et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; LADEIRA & GOMES, 2009).

Geralmente as características das lesões causadas por diversos actinomicetos são semelhantes, cuja função da resposta tecidual do hospedeiro visa circundar o microrganismo em contingente celular delimitado por cápsula fibrosa, com vistas a impedir sua dispersão via sistêmica ou por ação direta do agente na região circunvizinha (RIBEIRO & CONDAS, 2016). No exame histopatológico, é possível identificar uma arquitetura celular típica, formando granulomas e/ou piogranulomas com a presença de microrganismos livres ou no interior de macrófagos e/ou de neutrófilos (LADEIRA & GOMES 2009; LACERDA, 2011, RIBEIRO & CONDAS, 2016).

Mesmo se tratando de doenças diagnosticadas esporadicamente em cães e gatos, nos últimos anos, o diagnóstico das infecções por actinomicetos vêm aumentando no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande. Pelo fato de serem doenças raras e algumas apresentarem caráter zoonótico, há necessidade de estudar com detalhes tais doenças na nossa região, pois dados relacionados às descrições de infecções por actinomicetos em animais de companhia são escassos no

Brasil, ficando as pesquisas restritas a relatos de casos nas regiões Sul e Sudeste do País (LARSSON et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2010; LACERDA, 2011; DE FARIAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; BLUME et al., 2015).

Até o momento não existem trabalhos no HV/UFCG que determinem a frequência dos casos de envolvimento por actinomicetos em felinos, caracterizando seus aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos, auxiliando clínicos e patologistas que trabalham com doenças de pequenos animais a estabelecer diagnósticos precisos e diferenciais. Além disso, a caracterização dos vários gêneros e espécies de actinomicetos é importante para o direcionamento nas técnicas de cultura adequadas e para instituir o melhor tratamento para o paciente acometido, já que os diferentes gêneros geralmente apresentam susceptibilidades diferentes aos antimicrobianos. Diante disso, objetivou-se com esta dissertação descrever casos de infecções por *Mycobacterium* spp. e *Nocardia* spp. diagnosticadas em felinos no Sertão da Paraíba, Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

BLUME, G.R.; MARTINS, C.S.; MATTER, L.B. et al. Pyogranulomatous dermatitis and panniculitis due to *Nocardia nova* in a cat. **Ciência Rural**, v. 25, n. 11, p. 2019-2022, 2015.

COUTO, S.S. et al. Pyogranulomatous meningoencephalitis due to *Actinomyces sp.* in a dog. **Veterinary Pathology Online**, v. 37, p. 650-652, 2000.

DE FARIAS, M.R. et al. Uncommon mandibular osteomyelitis in a cat caused by *Nocardia africana*. **BMC Veterinary Research**, v.8, p. 239, 2012.

GINN, P.E.; MANSELL, J.E.K.L.; RAKICH, P.M. Skin and appendages. In: Maxie, M.G. **Jubb, Kennedy and palmer's Pathology of domestic animals**. 5th. vol 1. Philadelphia: Elsevier, p. 553-780, 2007.

GROSS, T.L. et al. Doenças infecciosas, granulomatosas e piogranulomatosas, nodulares e difusas da derme. In:_____. **Doenças de Pele do Cão e do Gato**, 2ed. São Paulo: Roca, 2009, p. 264-267.

LACERDA, A.M. **Relatório de estágio curricular supervisionado na área de patologia animal: relato de caso e revisão de literatura – peritonite por *Nocardia sp.* em um gato doméstico. 2011.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2011.

LADEIRA, S.R.L.; GOMES, F.R. Nocardiose. In: MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Ed. Universitária UFPEL, 2009, p. 293-299.

LARSSON, C.E. et al. Dermatite micobacteriana atípica em gato: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1092-1098, 2006.

MALIK, R. et al. *Nocardia* infections in cats: a retrospective multi-institutional study of 17 cases. **Australian Veterinary Journal**, v.84, n.7, p. 235-245, 2006.

OLIVEIRA, F.G et al. Micobacteriose generalizada em cão: Relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, 2012.

RIBEIRO, M.A.; CONDAS, L.A.Z. Enfermidades pelo gênero *Nocardia*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p.199-211.

RIBEIRO, M.G. et al. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 177-185, 2008.

SILVA, D.A. et al. Micobacteriose cutânea atípica felina autóctone no município do Rio de Janeiro–Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n.3, p.327-331, 2010.

CAPÍTULO I

Micobactérias diagnosticadas em felinos no Sertão da Paraíba

Trabalho submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Micobactérias diagnosticadas em felinos no Sertão da Paraíba¹

Millena de O. Firmino^{2*}; Maria T. S. Frade²; Jefferson da S. Ferreira²; Aline de S. Alves²; Cassia Y. Ikuta³; José S. Ferreira Neto³; Almir P. de Souza⁴; Antônio F. M. Dantas⁴

ABSTRACT- Firmino M.O., Frade M.T.S., Ferreira J.S., Alves A.S., Ikuta C.Y., Ferreira Neto J.S., Souza A.P. & Dantas A.F.M. 2017. [**Mycobacterias diagnosed in felines in the Backland of Paraíba**]. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Hospital Veterinário, Laboratório de Patologia Animal, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: millena_deoliveira@yahoo.com.br

This report describes two cases of felines infected with *Mycobacterium* spp. in the Backland of Paraíba, Northeast Brazil. The animals manifested nonspecific clinical signs, characterized by progressive weight loss, dyspnea, cough and generalized lymphadenomegaly in one cases, and clinical evolution of one and seven months respectively. Macroscopically the lesions were restricted to superficial and/or deep lymph nodes and pulmonary parenchyma, characterized by multifocal or multifocal to coalescent, yellowish and irregular nodules that presented multifocal areas with yellowish, friable and caseous as well as multifocal to coalescent, white and firm areas. Histologically, it was observed in both cases, lymphadenitis and granulomatous pneumonia, varying in intensity of inflammatory response and degree of mineralization. The granulomas were constituted by macrophages and epithelioid cells, some with marked necrosis and central mineralization, surrounded by a large amount of connective tissue. In the first case there were also discrete and random granulomatous hepatitis. In both cases alcohol-acid-resistant bacilli were visualized inside the cytoplasm of macrophages. There was immunostaining for *Mycobacterium* spp. in the cytoplasm of macrophages in both cases. Through PCR was identified only the genus *Mycobacterium*

¹Recebido em:

Aceito em:

Parte da dissertação do primeiro autor. *Autor para correspondência: millena_deoliveira@yahoo.com.br

² Discentes do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB.

³ Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

⁴ Docentes do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB.

in case 1, and *Mycobacterium bovis* in case 2. The diagnosis of *Mycobacterium* spp. in felines was performed based on anatomopathological findings and immunohistochemistry. The PCR was performed the etiological diagnosis of mycobacteriosis in case 1 and tuberculosis by *M. bovis* in case 2. The diagnosis of diseases caused by mycobacteria in felines, especially those in which *M. bovis* is involved, is extremely important for public health highlighting the zoonotic potential of this species, since many infected animals may be asymptomatic or show nonspecific clinical signs. Due to the difficulty of growth and isolation of these microorganisms in conventional means of routine microbiology laboratories, histopathology assists in diagnosis, but immunohistochemistry and molecular tests become highly relevant for the etiological diagnosis.

INDEX TERMS: Cat disease, granulomatous pneumonia, lymphadenopathy, *Mycobacterium bovis*.

RESUMO: Descrevem-se dois casos de felinos infectados por *Mycobacterium* spp. no Sertão da Paraíba, Nordeste do Brasil. Os animais apresentavam sinais clínicos inespecíficos, caracterizados por emagrecimento progressivo, dispneia, tosse e linfadenomegalia generalizada em um dos casos, com evolução clínica de um e sete meses, respectivamente. Macroscopicamente as lesões estavam restritas aos linfonodos superficiais e/ou profundos e parênquima pulmonar, caracterizadas por nódulos multifocais ou multifocais a coalescentes, amarelados, irregulares que ao corte apresentava áreas multifocais a coalescentes amareladas, friáveis e caseosa, além de áreas multifocais brancacentas e firmes. Histologicamente, verificou-se nos dois casos, linfadenite e pneumonia granulomatosa, variando de intensidade de resposta inflamatória e grau de mineralização. Os granulomas eram constituídos por macrófagos e células epitelioides, alguns com acentuada necrose e mineralização central, circundados por grande quantidade de tecido conjuntivo. No primeiro caso havia ainda hepatite granulomatosa discreta e aleatória. Em ambos os casos, foram visualizados bacilos álcool-ácido-resistentes livres e no interior de macrófagos. Houve imunomarcção para o *Mycobacterium* spp. no citoplasma de macrófagos em ambos os casos. Na PCR, identificou-se apenas o gênero *Mycobacterium* no caso 1 e *Mycobacterium bovis* no caso 2. O diagnóstico de infecção por *Mycobacterium* spp. nos felinos foi realizado com base nos achados anatomopatológicos e à imuno-histoquímica.

Pelo PCR foi realizado o diagnóstico etiológico de micobacteriose no caso 1 e tuberculose por *M. bovis* no caso 2. O diagnóstico das doenças causadas por micobactérias em felinos, principalmente aquelas em que *M. bovis* esteja envolvido, é de extrema importância para a saúde pública, destacando o potencial zoonótico desta espécie, pois muitos animais infectados podem ser assintomáticos ou apresentarem sinais clínicos inespecíficos. Diante da dificuldade de crescimento e isolamento destes microrganismos em meios convencionais da rotina dos laboratórios de microbiologia, a histopatologia auxilia no diagnóstico, mas a imuno-histoquímica e os testes moleculares se tornam altamente relevantes para o diagnóstico etiológico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doença de gato, pneumonia granulomatosa, linfadenopatia, *Mycobacterium bovis*.

INTRODUÇÃO

Doenças micobacterianas possuem caráter infectocontagioso, granulomatoso, crônico e progressivo (Quinn et al. 2005, Greene & Gunn-Moore 2015), são causadas por bactérias da ordem Actinomycetale, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (Greene & Gunn-Moore 2015). Possuem a parede rica em lipídeos complexos e ácido micólico (Quinn et al. 2005) o que promovem a característica de álcool-ácido-resistência quando submetidos à coloração de Ziehl-Neelsen (Malik et al. 2002, Quinn et al. 2005, Larsson et al. 2006, Greene & Gunn-Moore 2015), embora consideradas citoquimicamente Gram-positivas, tais características da parede celular impedem a entrada dos corantes utilizados na coloração de Gram (Quinn et al. 2005, Ikuta & Ferreira Neto 2016).

As micobactérias isoladas dos animais domésticos são divididas em dois grandes grupos. Primeiro de acordo com o tempo de crescimento da cultura, classificadas como lento ou rápido, e o outro grupo de acordo com o tipo de infecção desencadeada, seja leprosas, tuberculosa ou não tuberculosa (Greene & Gunn-moore 2015).

Dentre as diversas espécies com características de crescimento lento, destacam-se as bactérias do complexo *M. avium*, no qual promovem a formação de granulomas na pele, no trato digestório e respiratório (Ikuta & Ferreira Neto 2016). O *M. fortuitum* destaca-se do grupo das bactérias de crescimento rápido por causar quadro de micobacteriose cutânea atípica, já diagnosticada no Brasil por Larsson et al. (2006) e Silva et al. (2010). Dentre as infecções lepromatosas, destaca o *M. lepraemurium*

causador da lepra felina, que não possui crescimento em meios de cultura de rotina (Malik et al. 2002). As infecções caracterizadas como não tuberculosas são causadas por patógenos saprófitos ambientais que ocasionalmente causam doenças oportunistas ou atípicas (Hargis & Ginn 2013) em animais de companhia, desencadeando lesões piogranulomatosas cutâneas, subcutâneas, linfáticas e a forma disseminada observadas em animais imunocomprometidos (Greene & Gunn-Moore 2015).

O *M. bovis*, *M. tuberculosis* e o *M. microti* são bactérias que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, são considerados patógenos obrigatórios, sendo as principais espécies de interesse na medicina veterinária por causarem a tuberculose clássica (López 2013, Greene & Gunn-Moore 2015), sendo as duas primeiras as espécies com maior patogenicidade (Une & Mori 2007). Os felinos infectados por tais bactérias podem apresentar um quadro clínico de tuberculose caracterizado por perda de peso, tosse e dispneia, associado ou não a linfadenopatia (Gunn-Moore et al. 2010, Gunn-Moore et al. 2011). A forma cutânea da doença é caracterizada por nódulos multifocais com ou sem ulcerações (Gunn-Moore et al. 2010, Gunn-Moore et al. 2011) e em alguns casos, a linfadenopatia local pode ser o único achado (Gunn-Moore et al. 2011).

Em felinos os aspectos epidemiológicos da tuberculose ainda não estão definidos, pois além do consumo de leite *in natura* ou carne bovina contaminada (López 2013, Gibbens 2014), o hábito de caçar é considerado um fator de risco, pois algumas espécies de ratos podem albergar o *M. bovis* e o *M. microti* (Gunn-Moore et al. 2010, Greene & Gunn-Moore 2015). Além disso, recentemente foi relatado dois casos de tuberculose felina por infecção nosocomial por Murray et al. (2015). Em geral, os bacilos da tuberculose não são potencialmente transmissíveis quando comparadas a outras bactérias patogênicas, visto que há necessidade de grandes inóculos ou exposição frequente e prolongada (Greene & Gunn-Moore 2015).

Ikuta e Ferreira Neto (2016) destacam que embora a imunossupressão possa ser apontada como um fator desencadeante, não há relatos da associação direta entre as infecções pelos Retrovírus felino e as micobacterioses. Devido à escassez de dados sobre as micobacterioses e tuberculose em felinos na literatura nacional e tendo em vista a importância da presença desses patógenos na saúde pública, bem como nos animais de companhia, objetiva-se com este estudo descrever as características clínicas, patológicas, imuno-histoquímicas e moleculares de micobactérias em felinos diagnosticados no sertão da Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram revisadas as fichas de necropsias de felinos domésticos e selecionados os casos sugestivos de infecção por bactérias do gênero *Mycobacterium* diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (LPA/HV/UFCG) *Campus* Patos-PB, durante o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2015. Avaliaram-se os dados epidemiológicos (raça, sexo, idade e procedência do animal) os sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas descritos nos protocolos de necropsias. Para mais detalhamento dos dados epidemiológicos e dos sinais clínicos foram revisadas as fichas clínicas de atendimento referentes a esses animais nos arquivos da Clínica Médica de Pequenos Animais (CMPA).

Os fragmentos provenientes de necropsias haviam sido fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. As secções histológicas coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foram avaliadas visando caracterizar a resposta inflamatória de cada caso. Posteriormente, foi realizada a técnica histoquímica especial de Ziehl-Neelsen para visualização do agente.

Blocos de parafina contendo fragmentos de pulmão e linfonodo traqueobrônquico (Caso 1) e linfonodo poplíteo (Caso 2) foram selecionados e processados para imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Mycobacterium* spp. no LPA/HV/UFCG. Resumidamente, foram realizados cortes em 3µm de espessura e aplicados sob lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath®). Em seguida, os cortes foram desparafinados e reidratados. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação dos tecidos duas vezes, por 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% 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 15 minutos em banho-maria frio. Para a diminuição das ligações inespecíficas (“Background”), os cortes foram tratados em leite em pó desnatado (Molico®) a 5% diluído em água destilada por 60 min. Os cortes foram incubados em câmara úmida 37°C por 60 minutos com o anticorpo primário policlonal anti-*Mycobacterium* spp. na diluição de 1:1000 em diluente de anticorpo (PBS-pH 7.4, EasyPath). O reagente secundário foi o polímero HRP, incubado a temperatura ambiente por 10 min em câmara úmida e marcados através da adição do cromógeno 3,3’ diaminobenzidine (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 graduação de álcool,

clarificadas em xilol e montadas com lâminas e Entellan. Como controle negativo, utilizou-se a mesma secção do tecido analisado na porção inferior da lâmina, com substituição do anticorpo primário por diluente de anticorpo (PBST). Como controle positivo foi utilizado fragmento de intestino sabidamente positivo de Paratuberculose.

Cortes dos blocos de parafina contendo fragmentos de pulmão e linfonodo traqueobrônquico (Caso 1) e linfonodo poplíteo (Caso 2), foram inseridos em microtubos de 2mL e enviados para o Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Anteriormente à extração de DNA, a parafina foi removida através da adição de 1 mL de xilol, com homogeneização por vórtex e centrifugação a 12.800 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente para não tocar o pelete. Em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol 100%, com os mesmos procedimentos de homogeneização, centrifugação e remoção do sobrenadante. Esse processo foi repetido de cinco a dez vezes, até a eliminação de toda parafina. A extração de DNA foi realizada com o auxílio de QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. A identificação do agente foi realizada através de uma série de protocolos de PCR, descritos por Hermans et al. (1990), Cousins et al. (1991), Telenti et al. (1993) e Warren et al. (2006).

RESULTADOS

Durante o período estudado foram realizadas 407 necropsias de felinos domésticos. Destes, dois gatos foram diagnosticados com infecção por *Mycobacterium* spp., representando 0,49% da causa morte e/ou eutanásia. Os dois felinos eram provenientes da zona urbana do município de Patos, localizado na mesorregião do Sertão da Paraíba, de clima semiárido, Nordeste do Brasil. O primeiro caso ocorreu em fevereiro de 2010 e o segundo em março de 2015. A epidemiologia, sinais clínicos, evolução, órgãos afetados e diagnósticos morfológicos encontram-se descritos no Quadro 1.

No Caso 1, o animal apresentava escore corporal ruim, os pulmões não colapsados com áreas nodulares multifocais a coalescentes amareladas, discretamente elevadas na superfície pleural, medindo aproximadamente 2,0 cm de diâmetro, firmes, que ao corte se aprofundavam ao parênquima. Os linfonodos traqueobrônquicos estavam aumentados de volume e apresentavam lesões semelhantes, com áreas caseosas

discretas e áreas multifocais brancacentas firmes. No fígado observou-se discretos granulomas distribuídos de forma aleatória, principalmente nas áreas periportais (FIGURA 2D).

No Caso 2, o animal apresentava escore corporal regular e aumento de volume bilateral dos linfonodos superficiais (FIGURA 1A) (linfonodos submandibular, retrofaríngeo, pré-escapular e poplíteo) e profundos (cervical profundo, mediastínicos, hepatogástrico, pancreático e mesentéricos). Esses linfonodos apresentavam superfície irregular e múltiplos nódulos amarelados. O linfonodo submandibular esquerdo media 4,5 x 3,0 x 1,0 cm e o direito 2,0 x 1,5 x 1,0cm; o linfonodo pré-escapular esquerdo media 1,5 x 1,5 x 0,8 cm e o direito 1,0 x 1,0 x 0,5 cm; o linfonodo poplíteo direito media 1,0 x 1,0 x 0,5cm; o linfonodo mesentérico media 3,5 x 2,0 x 1,5cm; o linfonodo pancreático media 1,6 x 0,8 x 1,0cm de extensão. Ao corte, todos os linfonodos apresentavam áreas multifocais a coalescentes amareladas, friáveis e caseosas (FIGURA 1B), além de áreas multifocais brancacentas e firmes (FIGURA 1C), principalmente na cortical, causando perda da distinção entre as regiões cortical e medular. Nos pulmões haviam áreas amareladas multifocais discretamente elevadas na superfície pleural, variando de 0,1 a 0,2cm de diâmetro, principalmente no lobo caudal direito (FIGURA 1D).

Quadro 1 - Características epidemiológicas, clínicas, evolução, órgãos afetados e diagnóstico morfológico das infecções micobacterianas diagnosticados em felinos no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.

Caso	Raça Sexo Idade	Sinais clínicos	Evolução	Órgãos Afetados	Diagnóstico morfológico
1	SRD ^a Fêmea 24 meses	Apatia, anorexia, dispneia, tosse, emagrecimento	1 mês	Pulmão, linfonodo traqueobrônquico e fígado	Pneumonia, linfadenite e hepatite granulomatosa
2	SRD ^a Macho 13 meses	Anorexia, dispneia, tosse, emagrecimento e linfadenomegalia	7 meses	Pulmão, linfonodos superficiais, mediastínicos e mesentéricos	Pneumonia e linfadenite granulomatosa

^aSem raça definida.

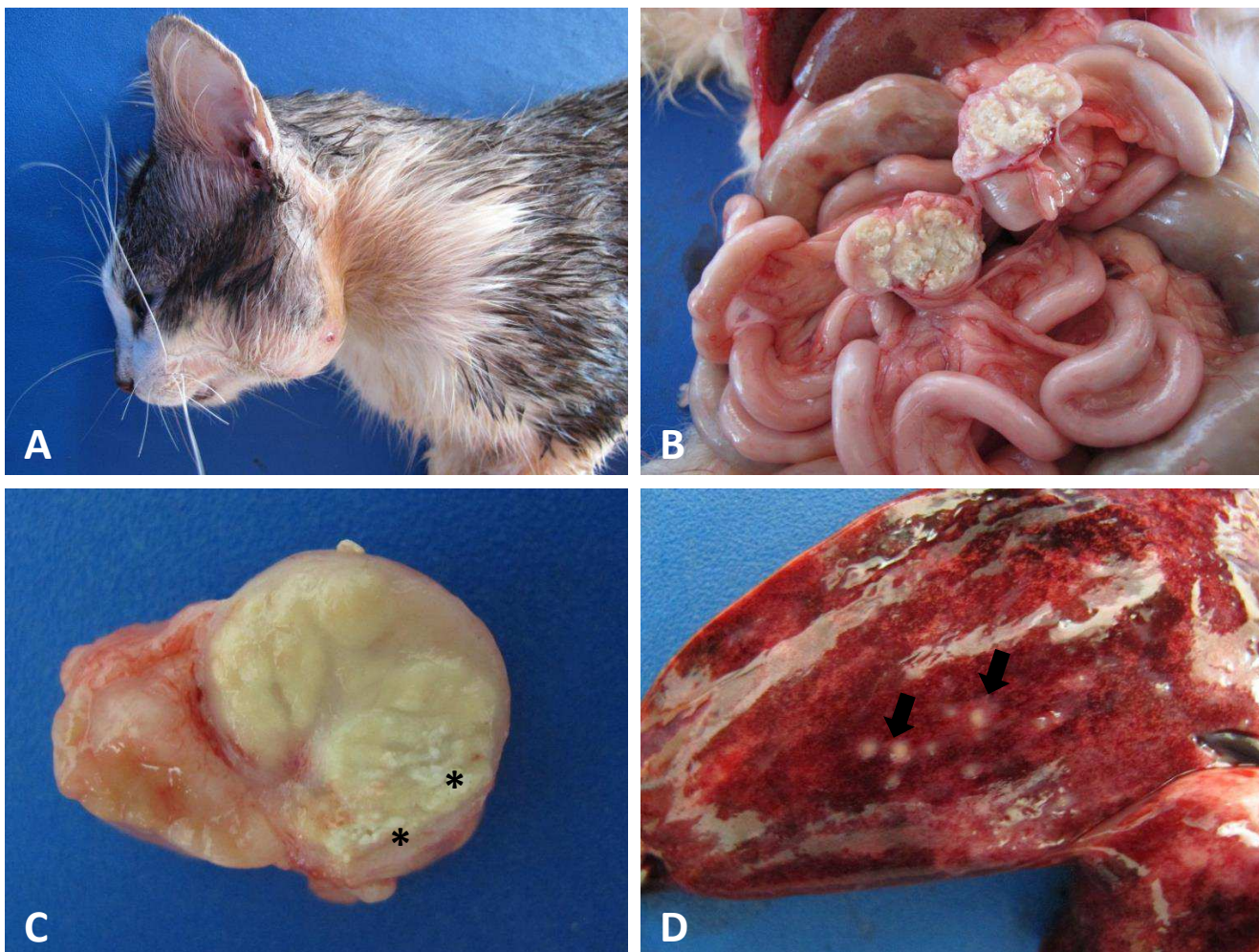


Figura 1 - Tuberculose em felino (caso 2). A) Observa-se linfonodo submandibular esquerdo com aumento de volume. B) Linfonodo mesentérico. Observam-se áreas amareladas irregulares friáveis e caseosa na superfície de corte. C) Linfonodo poplíteo. Visualizam-se áreas amarelas friáveis e caseosa associada a áreas multifocais brancacentas e firmes (asterisco). D) Pulmão. Observam-se no lobo pulmonar caudal direito áreas multifocais amareladas discretamente elevadas na superfície pleural (setas).

Histologicamente verificou-se nos dois casos, linfadenite e pneumonia granulomatosa (FIGURA 2A, 2B e 2C), variando de intensidade de resposta inflamatória e o grau de mineralização. No caso 1, verificou-se granulomas multifocais à coalescentes, constituídos centralmente por macrófagos e células epitelioides e mais perifericamente havia discreto infiltrado inflamatório de neutrófilos, circundados por acentuada proliferação de tecido conjuntivo. Nas áreas adjacentes aos granulomas havia acentuado infiltrado de macrófagos espumosos na luz alveolar. No linfonodo traqueobrônquico, havia áreas semelhantes multifocais de granulomas discretos distribuídos nas regiões cortical e medular, além de granulomas maiores com acentuada necrose e mineralização central, circundados por grande quantidade de tecido conjuntivo.

No caso 2, em todos os linfonodos afetados verificaram-se áreas multifocais a coalescentes de granulomas com intensidade variável de necrose, mineralização e fibrose. Em algumas áreas, havia discreto infiltrado inflamatório mononuclear, constituído por plasmócitos, linfócitos e raros macrófagos e células Mott em meio ao tecido conjuntivo fibroso. No parênquima pulmonar os granulomas eram semelhantes e discretos.

Em ambos os casos, foram observados nos linfonodos e pulmões poucos bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) (FIGURA 2E), no interior de macrófagos e livres entre as células inflamatórias e nas áreas de necrose dos granulomas, característicos de *Mycobacterium* spp.

Nos dois casos, pela imuno-histoquímica observou-se forte imunomarcagem para o anticorpo anti-*Mycobacterium* spp. no citoplasma de macrófagos (FIGURA 2F). Na PCR, identificou-se apenas o gênero *Mycobacterium* no caso 1 e *Mycobacterium bovis* no caso 2.

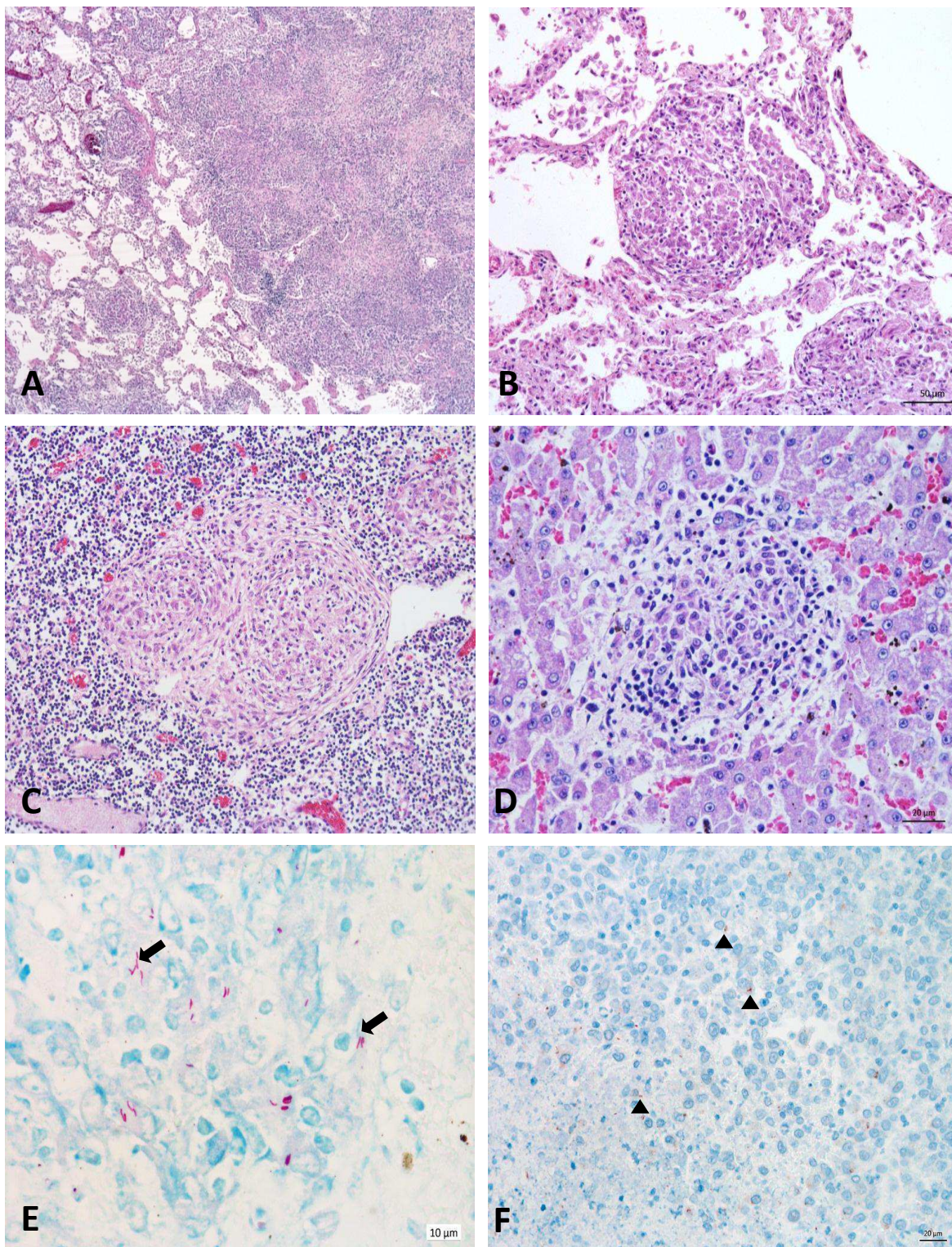


Figura 2 - Infecção micobacteriana em felinos. A) Pulmão. Observam-se áreas multifocais a coalescentes de granulomas. HE. Obj. 10x. B) Pulmão. Observa-se granuloma focal. HE. Obj. 20x. C) Linfonodo traqueobrônquico. Observam-se granulomas multifocais a coalescentes. HE. Obj. 20x. D) Fígado. Observam-se granuloma focal. HE. Obj. 40x. E) Linfonodo traqueobrônquico. Observam-se bacilos álcool-ácido-resistentes (setas) livre e no interior de macrófagos. Ziehl-Neelsen. Obj. 40x. F) Linfonodo traqueobrônquico. Observa-se imunomarcagem positiva (cabeças de setas) para o anticorpo anti-*Mycobacterium* spp. IHQ. Obj. 40x.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de infecção por *Mycobacterium* spp. nos felinos foi realizado com base nos achados anatomopatológicos e associados à imuno-histoquímica. Pelo PCR foi realizado o diagnóstico etiológico de micobacteriose no caso 1 e tuberculose por *M. bovis* no caso 2. Acredita-se que no caso 1 a não determinação da espécie ocorreu possivelmente pelo tempo que o material permaneceu em parafina e formol até a realização da técnica, podendo ter ocorrido à degradação do material genético da bactéria.

Pela distribuição das lesões, acredita-se que no caso 1, a infecção ocorreu por via aerógena. Dentre as infecções causadas pelo gênero *Mycobacterium* que apresentam afinidade pelo tecido pulmonar, destaca-se o *M. tuberculosis* que geralmente ocasiona pneumonia granulomatosa, pois esta espécie necessita de tecidos com grande quantidade de oxigênio (Greene & Gunn-Moore 2015). Além disso, micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido, como as bactérias do complexo *M. chelonae-abscessus* e *M. fortuitum* desencadeiam quadro de pneumonia piogranulomatosa em pequenos animais (Ikuta & Ferreira Neto 2016).

No caso 2, pela distribuição das lesões, a via mais provável de infecção foi a via oral, uma vez que, quando se trata de infecção por *M. bovis*, o trato gastrointestinal (TGI) se torna a porta de entrada mais comum em cães e gatos (Greene & Gunn-Moore 2015), pois a infecção ocorre principalmente através do consumo de carne e leite de bovinos infectados, sem que houvesse processo de pasteurização ou qualquer tipo de tratamento térmico prévio (López 2013), mas também pelo fornecimento de carne e miúdos crus de bovinos infectados ou ainda a ingestão de roedores silvestres que albergam o *M. bovis* (Greene & Gunn-Moore 2015). A alta prevalência da tuberculose bovina (Ramos 2016) e a presença de *M. bovis* no leite de vacas infectadas (Ramos et al. 2016) no Sertão da Paraíba, associados a prática comum de administração de leite cru aos gatos jovens nessa região, pode ser considerado um fator de risco para a infecção nessa espécie animal.

A epidemiologia da doença ainda não é bem definida, mas acredita-se que os cães e gatos em contato direto com o homem, bovinos ou roedores infectados, sirvam de animais sentinelas para a doença principalmente em locais com alta prevalência da infecção por *M. bovis* em zonas rurais e nas áreas suburbanas (Gibbens 2014, Greene & Gunn-Moore 2015). Nestes casos, os cães e gatos são considerados como potenciais disseminadores da doença quando o agente se encontra no TGI e no sistema

respiratório, excretando os microorganismos pelas fezes ou por secreções respiratórias, dependendo da localização da lesão ou forma clínica da doença e raramente são responsáveis pela transmissão da bactéria para humanos (Greene & Gunn-Moore 2015).

O segundo caso pode ser classificado como uma forma disseminada da tuberculose, pois verificou-se linfadenite granulomatosa generalizada com discreto envolvimento pulmonar. Além disso, gatos com infecção generalizada por *Mycobacterium bovis* podem desenvolver lesões oculares (Formston 1994, Ikuta & Ferreira Neto 2016) e também há relato de leão com lesões ósseas e articulares (Kirberger et al. 2006). Greene e Gunn-Moore (2015) destacam que os animais imunossuprimidos tendem a desencadear infecção local ou disseminada, devido à deficiência na imunidade celular, pois os bacilos viáveis ficam no interior de células fagocitárias, multiplicando-se em consequência da ineficiência do hospedeiro em controlar a infecção.

Clinicamente, a tuberculose em cães e gatos é frequentemente considerada como subclínica (Greene & Gunn-Moore 2015), tanto em fazendas com histórico de tuberculose por *M. bovis* (Mota et al. 2001, Wilkins et al. 2008), quanto em ambientes com pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* ou *M. bovis* (Ikuta & Ferreira Neto 2016). No entanto, os animais deste estudo apresentaram os sinais clínicos inespecíficos e variaram de acordo com a localização das lesões, semelhante ao descrito por Greene e Gunn-Moore (2015). O comprometimento pulmonar nas infecções micobacterianas pode desenvolver episódios de febre, perda de peso, anorexia, dispneia e tosse não produtiva (Gunn-Moore et al. 2010, Gunn-Moore et al. 2011, Ikuta & Ferreira Neto 2016), como observado nos animais estudados. A lesão pulmonar do caso 2 era discreta, portanto a presença da dispneia e tosse neste animal pode estar relacionada com o aumento dos linfonodos submandibulares, retrofaríngeos e mediastínicos, o que provavelmente dificultava a passagem do ar.

O diagnóstico diferencial nesses casos que cursam com linfadenite e pneumonia granulomatosa deve ser incluído principalmente as infecções por *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp. *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* spp. (Ikuta & Ferreira Neto 2016). Além dessas infecções bacterianas e fúngicas, devem ser também incluídas as neoplasias (López 2013, Ikuta & Ferreira Neto 2016) que cursam com dispneia e emagrecimento progressivo, associados à linfadenomegalia generalizada e lesões nodulares de aparência sólida e não caseosa nos pulmões (López 2013).

CONCLUSÃO

O diagnóstico das doenças causadas por micobactérias em felinos, principalmente aquelas em que o *M. bovis* esteja envolvido, já que estes animais podem servir como reservatório do agente o que pode promover a manutenção do microrganismo no ambiente e ocasionar a disseminação para o rebanho bovino da região ou a infecção para os humanos. Diante da dificuldade de crescimento e isolamento destes microrganismos em meios convencionais da rotina dos laboratórios de microbiologia, a histopatologia auxilia no diagnóstico, mas a imuno-histoquímica e os testes moleculares se tornam altamente relevantes para o diagnóstico etiológico.

REFERÊNCIAS

- Cousins D.V., Wilton S.D. & Francis B.R. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 27:187-195.
- Formston C. 1994. Retinal detachment and bovine tuberculosis in cats. *J. Small Anim. Pract.* 35:5-8.
- Gibbens N. 2014. *Mycobacterium bovis* infection in cats. *Vet. Rec.* 174:331-332.
- Greene C.E. & Gunn-Moore D.A. 2015. Infecções micobacterianas. p.522-549. In: Greene C.E. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1387.
- Gunn-Moore D.A., Dean R. & Shaw S. 2010. Mycobacterial infections in cats and dogs. *In Practice.* 32:444-452.
- Gunn-Moore D.A., McFarland S., Brewer J., Crawshaw T., Clifton-Hadley R.S., Kovalik M. & Shaw, D.J. 2011. Mycobacterial disease in cats in Great Britain 1: bacterial species, geographical distribution and clinical presentation of 339 cases. *J. Feline Med. Surg.* 13:934-944.
- Hargis A.M. & Ginn P.E. 2013. O tegumento. p. 977-1987. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. Bases da patologia em veterinária. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 1324.
- Hermans P.W.M., Van Soolingen D., Dale J.W., Schuitema A.R.J., McAdam R.A., Catty D. & Van Embden J.D.A. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28:2051-2058.

- Ikuta C.Y. & Ferreira Neto J.S. 2016. Micobacterioses e Tuberculose em cães e gatos. p. 413-422. In: Megid J., Ribeiro M.G., Paes A.C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1ed. Rio de Janeiro: Roca. p. 1272.
- Kirberger R.M., Keet D.F. & Wagner W.M. 2006. Radiologic abnormalities of the appendicular skeleton of the lion (*Panthera leo*): incidental findings and *Mycobacterium bovis*-induced changes. Vet. Radiol. Ultras. 47:145-152.
- Larsson C.E., Delayte E.H., Balda N.S., Michalany N.S., Pinheiro S.R., Otsuka M. & Roxo E. 2006. Dermatite micobacteriana atípica em gato: Relato de Caso. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56(6): 1092-1098.
- López A. 2013. Sistema respiratório, mediastino e pleuras. p. 461-541. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. Bases da Patologia em Veterinária. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1324.
- Malik R., Hughes M.S., James G., Martin P., Wigney D.I., Canfield P.J., Chen S.C.A., Mitchell D.H. & Love D.N. 2002. Feline leprosy: two different clinical syndromes. J. Fel. Med. Sur. 4:43-59.
- Mota P.M.P.C., Lobato F.C.F., Assis R.A., Lage A.P., Parreiras P.M. 2001. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(4): 1-3.
- Murray A., Dineen A., Kelly P., McGoey K., Madigan G., NiGhallchoir E., Gunn-Moore D.A. 2015. Nosocomial spread of *Mycobacterium bovis* in domestic cats. J. Fel. Med. Surg. 17(2): 173-180.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. 2005. Gênero *Mycobacterium*. p. 106-114. In:_____. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed. p. 512.
- Ramos J.M. 2016. Isolamento e identificação de *Mycobacterium* spp. em bovinos positivos no teste de tuberculinização. (Dissertação). Universidade Federal de Campina Grande. Patos-PB.
- Ramos J.M., Heineann M.B., Ferreira-Neto J.S. Souza-Filho A.F., Cárdenas N.C., Alves C.J. & Azevedo S.S. 2016. Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in milk from cows in northeastern Brazil. Cienc. Rural. 46(12): 2166-2169.
- Silva D.A., Gremião I.D.F., Menezes R.C., Pereira S.A., Figueiredo F.B., Ferreira R.M.C. & Pacheco T.M.V. 2010. Micobacteriose cutânea atípica felina autóctone no município do Rio de Janeiro–Brasil. Acta Sci. Vet. 38(3): 327-331.

- Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C. & Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J.Clin. Microbiol.* 31:175-178.
- Ue Y. & Mori T. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 415-425.
- Warren R. M., Gey Van Pittius N. C., Barnard M., Hesselting A., Engelke E., De Kock M., Gutierrez M.C., Chege G.K., Victor T.C., Hoal E.G. & Van Helden P.D. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10:818-822.
- Wilkins M.J., Bartlett P.C., Berry D.E., Perry R.L., Fitzgerald S.D., Bernardo T.M. Thoen C.O. & Kaneene J.B. 2008. Absence of *Mycobacterium bovis* infection in dogs and cats residing on infected cattle farms: Michigan, 2002. *Epidemiol. Infect.* 136: 1617-1623.

CAPITULO II

Diagnóstico morfohistoquímico da nocardiose felina

Trabalho enviado à revista Arquivo Brasileiro em Medicina Veterinária e Zootecnia

Diagnóstico morfohistoquímico da nocardiose felina

[Morphohistochemical diagnosis of feline nocardiosis]

M.O. Firmino^{1*}, M.T.S. Frade¹, E.P.F. Souto¹, J.S. Ferreira¹, C.B. Carvalho¹, A.P. Souza¹, F. Garino Júnior¹, A.F.M. Dantas¹

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande-Patos, PB.

ABSTRACT

This report describes, the main clinical, anatomopathological and morphotinoial features of *Nocardia* spp. in domestic cats in the Laboratory of Animal Pathology of the Federal University of Campina Grande, during the period from January 2003 to December 2016. Of the 750 necropsied cats, four animals were diagnosed with nocardiosis (0.53%). Of the cats involved two were males and two were females, adults, non-neutered, undefined and had access to the street. The felines came from the municipality of Patos, Backland of Paraíba, Northeast Brazil. The main clinical signs were apathy, anorexia, dehydration, phlegm and draining fistulous tracts. Macroscopically the main affected organs were skin, subcutaneous tissue, omentum, liver, spleen, mandibular bone and CNS. Histologically there was a predominance of piogranulomatous inflammation associated with numerous filamentous and branched bacteria visualized in the Gram type Brown-Brenn, Ziehl-Neelsen modified, Metenamine silver nitrate of Grocott and Giemsa. In one case the genus *Nocardia* was identified in microbiological culture. Nocardiosis in felines occurs sporadically in the Backland of Paraíba, mainly in the cutaneous and / or subcutaneous form, with systemic involvement and death of the affected animals. The diagnosis of this disease can be established based on the histopathological findings associated with the special histochemical stains of the Gram type Brown-Brenn, modified Ziehl-Neelsen and GMS, in which it is possible to visualize the bacterium and are therefore important auxiliary tools in the diagnosis of nocardiosis

Key words: Piogranulomatous, actinomycetes, filamentous bacteria, *Nocardia* spp.

RESUMO

Descrevem-se as principais características clínicas, anatomopatológicas e morfotintoriais da infecção por *Nocardia* spp. diagnosticadas em felinos domésticos no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, durante o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2016. Entre os 750 gatos necropsiados, quatro animais foram diagnosticados com nocardiose (0,53%), sendo dois machos e duas fêmeas, adultos, não-castrados, sem raça definida e tinham acesso a rua. Os felinos eram oriundos do município de Patos, Sertão da Paraíba, Nordeste do Brasil. Os principais sinais clínicos foram apatia, anorexia, desidratação, flegmão e tratos fistulosos drenantes. Macroscopicamente os principais órgãos afetados foram pele, tecido subcutâneo, omento, fígado, baço, osso mandibular e SNC. Histologicamente verificou-se predominantemente inflamação piogranulomatosa, associada a numerosas bactérias filamentosas, ramificadas visualizadas no Gram tipo Brown-Brenn, Ziehl-Neelsen modificado, Metenamina nitrato de prata de Grocott e Giemsa. Em um caso foi identificado o gênero *Nocardia* em cultivo microbiológico. A nocardiose em felinos ocorre de forma esporádica no sertão da Paraíba, principalmente na forma cutânea e/ou subcutânea, com envolvimento sistêmico e morte dos animais afetados. O diagnóstico desta doença pode ser estabelecido com base nos achados histopatológicos, associados às colorações histoquímicas especiais de Gram tipo Brow-Brenn, Ziehl-Neelsen modificado e GMS, nas quais é possível a visualização da bactéria, sendo portanto importantes ferramentas auxiliares no diagnóstico da nocardiose.

Palavras-chave: Piogranulomas, actinomicetos, bactéria filamentosa, *Nocardia* spp.

INTRODUÇÃO

A nocardiose é uma doença infecciosa bacteriana que acomete várias espécies de animais domésticos (Quinn *et al.*, 2005; Sykes, 2015; Ribeiro e Condas, 2016) e o homem (Sykes, 2015; Ribeiro e Condas, 2016). É causada por actinomicetos Gram-positivos do gênero *Nocardia* e família Nocardiaceae, apresenta forma filamentosa, ramificada, organizadas individualmente ou em agregados frouxos (Sykes, 2015). São microrganismos ubíquos, saprófitas e encontrados no solo, na grama, no feno, na matéria vegetal em decomposição e na água (Beaman e Beaman, 1994). São aeróbicas, catalase positivas, imóveis, fracamente álcool-ácido-resistentes que assimilam açúcares

por oxidação (Corrêa e Corrêa, 1992, Quinn *et al.*, 2005; Ladeira e Gomes, 2009; Sykes, 2015).

Geralmente a forma de transmissão ocorre por lesões mecânicas na pele ou contaminação de feridas constituindo a principal forma de infecção para a apresentação cutânea/ou subcutânea da doença (Sykes, 2015). Além disso, a inalação de aerossóis e a ingestão de materiais contaminados também participam na patogenia, desencadeando a forma respiratória e digestiva da doença (Quinn *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2006; Ginn *et al.*, 2007). Animais imunossuprimidos, como os cães com cinomose e gatos portadores do vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina, são mais susceptíveis a nocardiose, pois a bactéria apresenta características oportunistas (Malik *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008; Ladeira e Gomes, 2009).

As infecções pelo gênero *Nocardia* em cães e gatos, são comumente manifestadas por lesões cutâneas e/ou subcutâneas (Ginn *et al.*, 2007; Sykes, 2015; Ribeiro e Condas, 2016), caracterizadas por abscessos, nódulos, micetomas e tratos fistulosos com secreção purulenta (Leite *et al.*, 2014; Blume *et al.*, 2015; Ribeiro e Condas, 2016), associados raramente a grânulos esbranquiçados, geralmente caracterizando a síndrome celulite-paniculite em felinos (Condas, 2011).

A disseminação da bactéria por via hematogena pode desencadear a forma sistêmica da doença, com envolvimento de diferentes órgãos como pulmão, fígado, baço, rins, linfonodo e sistema nervoso central (Beaman e Beaman, 1994; Malik *et al.*, 2006). Caracterizados principalmente por abscessos e exsudato granular fibrinoso amarelado aderido às serosas dos órgãos, pleura e omento ou exsudato serofibrinoso turvo acastanhado nas cavidades (Tilgner e Anstey, 1996; Lacerda, 2011).

O diagnóstico da nocardiose pode ser realizado através da associação dos sinais clínicos, exames microbiológicos, anatomopatológicos e moleculares (Ribeiro *et al.*, 2002). Porém, é importante ressaltar que infecções bacterianas podem variar quanto o aspecto macroscópico da lesão, sendo difícil um diagnóstico presuntivo do agente, principalmente quando material para cultivo e isolamento não for coletado. Nesses casos, os exames histopatológicos e o emprego de técnicas histoquímicas especiais são importantes ferramentas para o diagnóstico. Portanto, objetivou-se com este trabalho, descrever quatro casos de nocardiose em felinos domésticos, abordando as principais características clínicas, anatomopatológicas e morfotintoriais da *Nocardia* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram revisadas as fichas de necropsias de felinos domésticos e selecionados os casos sugestivos de nocardiose diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande durante o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2016. Avaliaram-se os dados como raça, sexo, idade, procedência dos animais, sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas descritas nos protocolos de necropsias. Em alguns casos foram revisadas as fichas clínicas de atendimento referentes a esses animais nos arquivos da Clínica Médica de Pequenos Animais (CMPA) para complementação dos dados.

Os fragmentos provenientes de necropsias foram fixados em formol tamponado a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. As secções histológicas coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foram avaliadas visando caracterizar a resposta inflamatória de cada caso. Posteriormente, foram selecionados fragmentos de órgãos afetados para a realização de técnicas de colorações histoquímicas especiais de Metenamina nitrato de prata de Grocott (GMS), Ziehl-Neelsen modificado, coloração de Gram do tipo Brown-Brenn e Giemsa para caracterização do agente.

Em um dos casos, durante a necropsia foram coletados materiais para cultivo e isolamento microbiológico. A amostra foi semeada em Ágar sangue, MacConey Ágar e Sabouraud dextrose Ágar com cloranfenicol, incubadas a 37°C em aerobiose. Também nesse caso foi realizado citologia dos tecidos afetados, utilizando método de imprint e coloração do tipo Romanowsky (Panótico rápido®) e GMS.

RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2003 à dezembro de 2016 foram realizadas 750 necropsias de felinos domésticos. Destes, quatro casos de nocardiose foram diagnosticados, correspondendo a 0,53% da causa morte ou de eutanásia destes animais. Alguns dados clínico-epidemiológicos, localização das lesões e diagnóstico morfológico encontram-se no Quadro 1.

Todos os animais eram provenientes da zona urbana do município de Patos, localizado na mesorregião do Sertão da Paraíba, clima semiárido, Nordeste do Brasil. Dois animais tinham acesso à rua e dois eram animais errantes e não-castrados.

Na necropsia do caso 1, verificou-se escore corporal magro, mucosas oral e oculares pálidas. No fígado havia massa firme de superfície irregular, multilobulada, branco-amarelada, localizado na face visceral adjacente a vesícula biliar, colédoco,

aderido à serosa do duodeno e envolvendo também o linfonodo hepático (Fig. 1A). Ao corte observaram-se áreas multifocais brancacentas com o centro amarelado que infiltrava o parênquima hepático. Além disso, havia *Platynosomum fastosum* na vesícula e vias biliares.

Quadro 1- Características clínica-epidemiológicas, órgãos afetados e diagnóstico morfológico da nocardiose felina.

Caso	Raça Sexo Idade	Sinais clínicos	Órgãos Afetados	Diagnóstico morfológico
1	SRD ^a Fêmea Adulto	Dor abdominal e vômito	Fígado e Linfonodo hepático	Colangiohepatite e linfadenite piogranulomatosa
2	SRD ^a Fêmea 5 anos	Apatia, anorexia, inapetência, caquexia, aumento de volume no ramo da mandíbula direita, dispneia e convulsões	Osso mandibular direito, tecido subcutâneo, musculatura, Pleura e Meninges	Osteomielite, paniculite e miosite, piogranulomatosa Pleurite e meningite necrosupurativa
3	SRD ^a Macho Adulto	Desidratação, decúbito lateral e fistulas na região inguinal drenando pus e miíase	Pele, tecido subcutâneo, musculatura, omento, linfonodos inguinais e testículo esquerdo	Dermatite, paniculite, miosite, peritonite, linfadenite, periorquite e epididimite piogranulomatosa
4	SRD ^a Macho 4 anos	Caquexia, desidratação, apatia, flegmão na região ventral tóraco-abdominal, distensão abdominal, mucosas oral e oculares ictéricas	Pele, tecido subcutâneo, omento, fígado e baço	Dermatite e paniculite necrosupurativa. Peritonite, perihepatite e periesplenite piogranulomatosa

^aSem raça definida.

No animal 2, observou-se aumento de volume no ramo mandibular direito com superfície periosteal irregular, multilobulada e amarelada, ao corte transversal verificou-se áreas multifocais amareladas, irregulares e múltiplas cavitações circundadas por tecido ósseo (Fig. 1B e 1C). Havia discreta secreção purulenta com grumos amarelados nos músculos masseter e temporal direito e que se estendia ao tecido subcutâneo do

pescoço e região torácica lateral direita. Os dentes pré-molares, molares e o canino inferior direito estavam móveis e com exposição da raiz. Na cavidade torácica havia 30mL de conteúdo purulento fétido com grumos amarelados, além de espessamento pleural e áreas multifocais de aderência entre as pleuras parietal e visceral (Fig. 1D). conteúdo purulento semelhante também foi observado no assoalho da caixa craniana que se estendia as meninges da região de córtex temporal.

No caso 3, observou-se animal com escore corporal regular, mucosas oral e oculares pálidas e múltiplos tratos fistulosos drenando conteúdo purulento na região inguinal, verificou-se também discreto aumento de volume do testículo esquerdo. Na cavidade abdominal observou-se massa firme vermelho-amarelada, medindo aproximadamente 10cm x 13cm x 6cm de extensão, superfície irregular com áreas puntiformes amarelo-esverdeada que se aprofundava ao corte, restrito ao omento (Fig. 1E). No assoalho da cavidade abdominal havia ainda um aumento de volume caudal ao rim direito, que ao corte fluía exsudato amarelo-amarronzado envolvendo o linfonodo inguinal.

O caso 4 tratava-se de um animal em condição corporal regular com icterícia e na região ventral tóraco-abdominal havia distensão do subcutâneo por acentuada quantidade de conteúdo purulento amarelado e com grumos. Na cavidade abdominal observou-se líquido turvo acastanhado com grumos amarelados e fibrina aderidos ao peritônio, omento, superfície capsular do fígado e do baço (Fig. 1F).

Microscopicamente em todos os casos, a lesão era caracterizada por inflamação piogranulomatosa afetando diferentes órgãos dependendo do caso (Quadro 1) , embora na pleura visceral e meninges do caso 2 e na pele do caso 4 a inflamação era predominantemente necrosupurativa. Em todos os casos também havia áreas multifocais de piogranulomas de variados tamanhos, constituídos por área central de necrose com neutrófilos íntegros e degenerados circundados por macrófagos epitelióides, formando por vezes os aglomerados de forma radiada semelhante à pseudorosetas (Fig. 2A). Também havia numerosos macrófagos espumosos e histiócitos nas áreas adjacentes, circundados por graus variados de fibrose, sendo esta mais espessa nos casos 1 e 3. Na periferia dos piogranulomas era observado moderado infiltrado linfoplasmocitário.

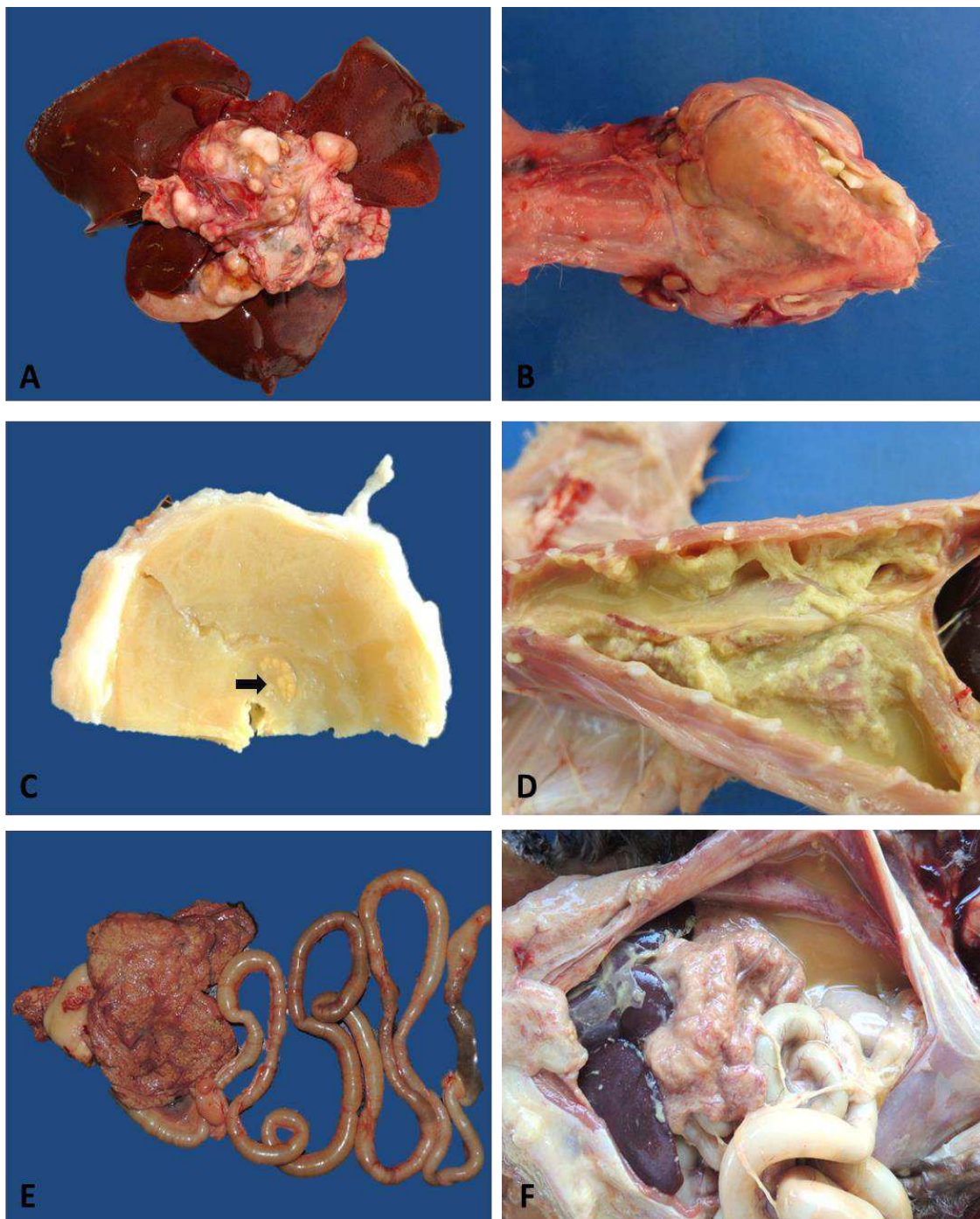


Figura 1 - Nocardiose felina. A) Face visceral do fígado. Observa-se massa multilobulada, branco-amarelada, adjacente à vesícula biliar, colédoco e linfonodo hepático. B) Face ventral da cabeça. Demonstra aumento de volume do ramo mandibular direito de superfície irregular e amarelada. C) Corte transversal da mandíbula. Verificam-se áreas multifocais amareladas (seta). D) Cavidade torácica. Observa-se acentuado piotórax e áreas multifocais de aderências entre as pleuras parietal e visceral. E) Observa-se massa vermelho-amarelada de superfície irregular com áreas puntiformes amarelo-esverdeada restrita ao omento. F) Cavidade abdominal. Verifica-se líquido turvo acastanhado e fibrina aderida principalmente na superfície capsular do fígado e serosa intestinal.

No caso 2, havia área focalmente extensa com espessamento das meninges do córtex temporal por discreto infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos, alguns degenerados e ocasionais macrófagos em meio a áreas de necrose. Lesões microscópicas semelhantes também foram observadas na pleura visceral deste animal, entretanto de forma difusa e acentuada.

Nos casos 1, 3 e 4 observaram-se nas seções coradas em HE, estruturas filamentosas, ramificadas, discretamente basofílicas em agregados frouxos ou de forma individual no interior das pseudorosetas e nas áreas de necrose.

Em todos os casos submetidos a técnicas de histoquímicas especiais, foram observadas estruturas filamentosas, ramificadas, individuais ou em agregados frouxos, impregnadas pela prata (Fig. 2B), em azul na técnica de Gram tipo Brown-Brenn (Fig. 2C), coradas em vermelho no Ziehl-Neelsen modificado (Fig. 2D) e fracamente rósea no Giemsa (Fig. 2E). As bactérias foram observadas principalmente na periferia dos piogranulomas, no centro das pseudorosetas e nas áreas de necrose, sendo compatível com a infecção por *Nocardia* spp.

No caso 3 pela citologia da massa abdominal, observou-se inflamação piogranulomatosa e numerosos agregados bacterianos filamentosos, ramificados basofílicos na coloração do tipo Romanowsky e impregnados pela prata em marron (Fig. 2F). No cultivo microbiológico, verificou-se presença de colônias amarelas esbranquiçadas, circular, seca e convexa, com superfície pulverulenta firmemente aderente à superfície do Ágar sangue, sendo observadas na microscopia a presença de bactérias filamentosas Gram-positivas.

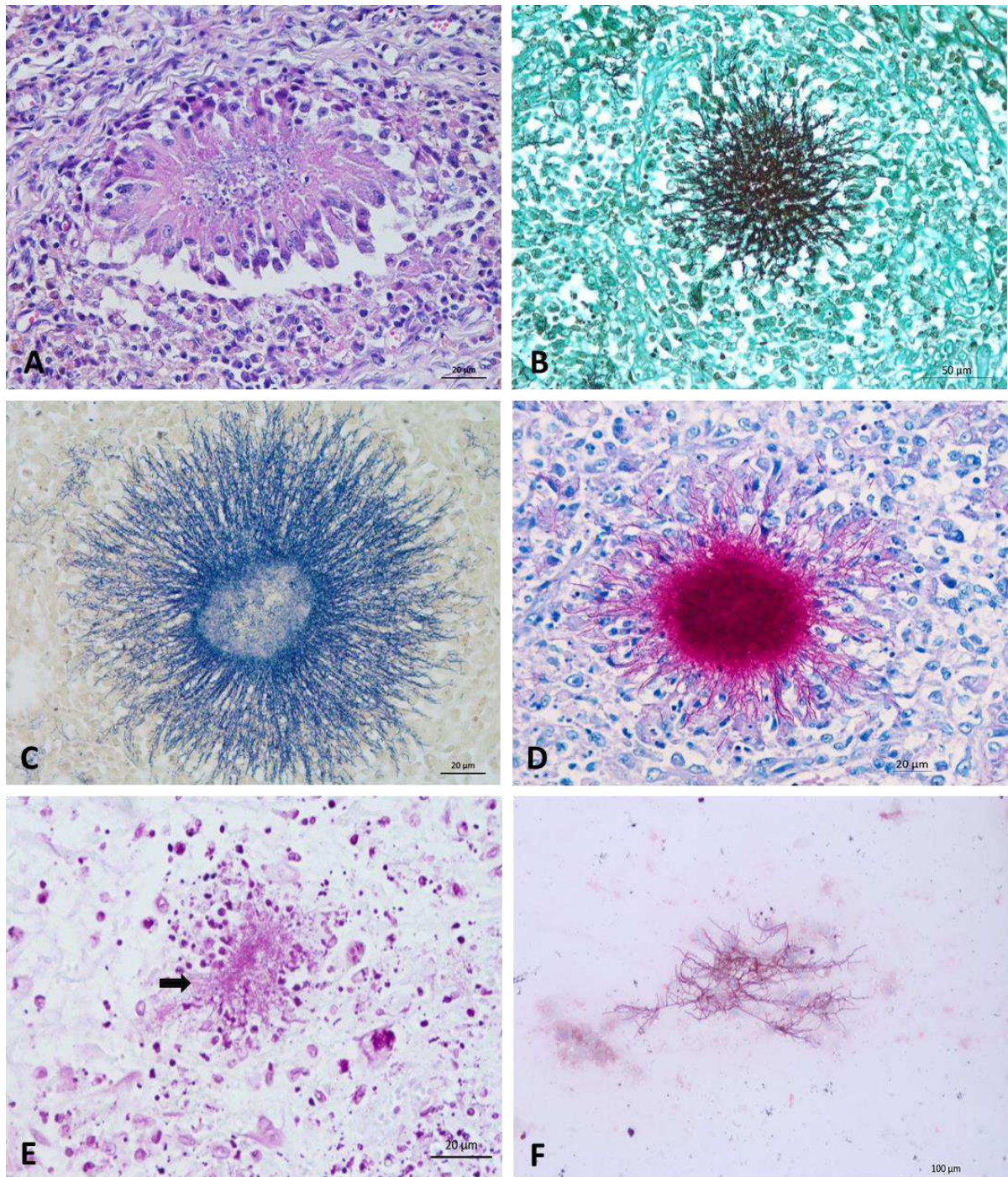


Figura 2 - Nocardiose felina. A) Fígado. Observa-se piogranuloma constituído por área central de necrose com neutrófilos íntegros e degenerados circundados por macrófagos epitelióides formando uma pseudoroseta, circunscrito por discreta fibrose. HE. Obj. 40x. B) Omento. Observam-se estruturas filamentosas, ramificadas, formando agregados, impregnadas pela prata. GMS. Obj. 40x. C) Omento. Observam-se estruturas filamentosas semelhantes coradas em azul. Gram tipo Brow-Brenn. Obj. 40x. D) Observam-se estruturas filamentosas semelhantes coradas em vermelho. Ziehl-Neelsen modificado. Obj. 40x. E) Omento. Observam-se discretas estruturas filamentosas, ramificadas, fracamente coradas em rósea. Giemsa. Obj. 40x. F) Citologia de massa abdominal. Observam-se estruturas filamentosas ramificadas em agregado frouxo impregnados pela prata. GMS. Obj. 40x.

DISCUSSÃO

Nocardiose foi diagnosticada em todos os felinos deste estudo com base nos achados anatomopatológicos associados à visualização do agente e suas características morfológicas pelas colorações histoquímicas especiais utilizadas. Em apenas em um caso, foi possível realizar o cultivo e isolamento microbiológico do gênero *Nocardia*.

O órgão mais acometido foi a pele e o tecido subcutâneo, sendo verificado em três animais lesões cutâneas/subcutâneas, variando entre flegmão e tratos fistulosos drenantes. Tais lesões foram observadas principalmente nas regiões abdominal ventral inguinal e cervical, semelhante ao descrito na literatura para esta espécie (Ginn *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Sykes, 2015; Ribeiro e Condas, 2016). A forma cutânea nos gatos é responsável por mais de 75% dos casos descritos de nocardiose na literatura (Sykes, 2015) geralmente apresenta-se com a formação de abscessos, por vezes ulcerados e com tratos fistulosos que drenam secreção purulenta (Leite *et al.*, 2014; Blume *et al.*, 2015; Ribeiro e Condas, 2016), associado raramente a grânulos amarelados (Condas, 2011), como visto nos casos 2 e 4.

O omento foi o segundo local mais acometido, no qual apresentou variação no tipo de lesão, já que o animal do caso 3 apresentou a formação de massa sólida irregular de caráter mais crônico e o animal do caso 4 apresentou apenas áreas multifocais amareladas estando associado à presença de líquido turvo acastanhado na cavidade abdominal, caracterizando um quadro de peritonite. A peritonite por *Nocardia* spp. é descrita raramente nos gatos (Tilgner e Anstey, 1996; Sykes, 2015), sendo observada nos casos graves em que ocorre a disseminação da bactéria e progressão sistêmica da doença (Malik *et al.*, 2006; Ribeiro e Condas, 2016). Nestes casos o prognóstico dos animais afetados é desfavorável (Tilgner e Anstey, 1996), podendo haver evolução para óbito, assim como observado nos animais deste estudo.

A forma respiratória da nocardiose foi observada em apenas um animal, que apresentava piotórax e pleurite necrosupurativa. Tal apresentação é comumente relatada em humanos e com menor frequência nos gatos (Sykes, 2015). Este mesmo animal apresentava osteomielite mandibular piogranulomatosa, indicando que provavelmente a lesão pulmonar ocorreu em consequência da disseminação da bactéria do foco infeccioso primário no osso mandibular. Além disso, houve disseminação da bactéria por via hematogênica para o sistema nervoso central, afetando apenas as meninges do córtex temporal. Essa é a principal forma de disseminação do agente, já que algumas

espécies de *Nocardia* apresentam a capacidade de invasão dos vasos sanguíneos (Sykes, 2015), podendo desencadear a forma sistêmica da doença.

O envolvimento ósseo primário observado na mandíbula de um felino desse estudo causando osteomielite piogranulomatosa, é considerado uma condição rara nesta espécie animal (Sykes, 2015). No Brasil há descrição de um relato de osteomielite mandibular por *Nocardia africana* em gato, provavelmente secundária a periodontite, associada à ingestão de alimentos contaminados (De Farias *et al.*, 2012), o que pode ter ocorrido também nesse caso descrito.

A lesão histopatológica é característica de infecção por *Nocardia* spp. pois todos os animais exibiram principalmente inflamação piogranulomatosa, caracterizada predominantemente pela presença de macrófagos epitelioides formando as pseudorosetas associado a grande quantidade de neutrófilos e necrose central (Ladeira e Gomes, 2009; Lacerda, 2011; Blume *et al.*, 2015). O tecido fibrótico observado ao redor dos piogranulomas variou de acordo com o grau de cronicidade da lesão. Na maioria das vezes esse padrão de resposta inflamatória piogranulomatosa é característica de infecções por actinomicetos, pois tal resposta celular tem como objetivo circundar as bactérias e impedir a disseminação do agente (Ribeiro e Condas, 2016). Esses microrganismos possuem principalmente ácido micólico, lipídeos e enzimas na sua parede celular conferindo resistência à fagocitose por neutrófilos e macrófagos, dificultando a inativação dessas bactérias, tornando-se difícil a resolução tecidual (Ribeiro e Condas, 2016).

Nos casos em que não é possível a coleta de amostras para o cultivo e isolamento microbiológico e/ou sequenciamento molecular, o exame histopatológico e o emprego de técnicas histoquímicas especiais se torna altamente relevante para o diagnóstico de nocardiose, pois a bactéria por ser Gram-positiva e parcialmente álcool-ácido-resistente (Quinn *et al.*, 2005; Ribeiro e Condas, 2016), é facilmente observada nas colorações de Gram tipo Brown-Brenn, Ziehl-Neelsen modificado e GMS. Essas colorações servem como suporte adequado para a visualização do agente e devem ser incluídas na rotina laboratorial naqueles casos sugestivos de infecção por *Nocardia* spp. No Giemsa a bactéria pode ser visualizada de forma mais sutil, não sendo considerado um método histoquímico adequado para o diagnóstico da doença.

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outros microrganismos do grupo dos actinomicetos, principalmente o *Actinomyces* spp. e o *Mycobacterium* spp., (Ribeiro *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2006; Ginn *et al.*, 2007), que desencadeiam lesões

semelhantes piogranulomatosas e/ou granulomatosas respectivamente. Além desses actinomicetos, deve-se incluir infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Hargis e Ginn, 2013; Blume *et al.* 2015), doenças fúngicas como o micetomas eumicóticos, pseudomicetoma dermatofítico (Hargis e Ginn, 2013) e criptococose (Gross *et al.*, 2009) e as neoplasias (Hargis e Ginn, 2013).

CONCLUSÃO

A nocardiose em felinos ocorre de forma esporádica no Sertão da Paraíba, principalmente na forma cutânea e/ou subcutânea, com envolvimento sistêmico e morte dos animais afetados. Os sinais clínicos variaram de acordo com os tecidos afetados e comumente observou-se inflamação piogranulomatosa. O diagnóstico pode ser estabelecido com base nos achados histopatológicos, associados às colorações histoquímicas especiais de Gram tipo Brow-Brenn, Ziehl-Neelsen modificado e GMS, nas quais é possível a visualização da bactéria, sendo portanto importantes ferramentas auxiliares no diagnóstico da nocardiose.

REFERÊNCIAS

- BEAMAN, B.L.; BEAMAN, L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.7, p. 213-264, 1994.
- BLUME, G.R.; MARTINS, C.S.; MATTER, L.B. et al. Pyogranulomatous dermatitis and panniculitis due to *Nocardia nova* in a cat. *Ciênc. Rural*, v. 25, n. 11, p. 2019-2022, 2015.
- CONDAS, L.A.Z. Caracterização fenotípica, genotípica e termorresistencia à fervura em linhagens de *Nocardia* spp. isoladas de animais domésticos e de humanos. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP, 2011.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Nocardioses. In: _____. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos domésticos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, p.355–360.

DE FARIAS, M.R.; WERNER, J.; RIBEIRO, M.G. et al. Uncommon mandibular osteomyelitis in a cat caused by *Nocardia africana*. *BMC Vet. Res.*, v.8, p. 239, 2012.

GINN, P.E.; MANSELL, J.E.K.L.; RAKICH, P.M. Skin and appendages. In: Maxie, M.G. *Jubb, Kennedy and palmer's Pathology of domestic animals*. 5th. vol 1. Philadelphia: Elsevier, 2007, p. 553-780.

GROSS, T.L. IHKE, J.P.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. Doenças infecciosas, granulomatosas e piogranulomatosas, nodulares e difusas da derme. In: _____. *Doenças de Pele do Cão e do Gato*, 2ed. São Paulo: Roca, 2009, p. 264-267.

HARGIS A.M.; GINN P.E. O tegumento. In: McGavin M.D.; Zachary J.F. *Bases da patologia em veterinária*. 5ed. Rio de janeiro: Elsevier. 2013, p. 977-1987.

LACERDA, A.M. Relatório de estágio curricular supervisionado na área de patologia animal: relato de caso e revisão de literatura – peritonite por *Nocardia sp.* em um gato doméstico. Trabalho de conclusão de curso (monografia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2011.

LADEIRA, S.R.L.; GOMES, F.R. Nocardiose. In: MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. *Micologia Veterinária*. Pelotas: Ed. Universitária UFPEL, 2009, p. 293-299.

LEITE, A.R.A.; PESSOA, D.A.N.; CARNEIRO, R.S. et al. Nocardiose cutânea em felino: relato de caso. *Rev Bras. Ciênc. Vet.*, v.21, n. 4, 2014, p.226-230.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; O`BRIEN, C.R. et al. Nocardia infections in cats: a retrospective multi-institutional study of 17 cases. *Aust. Vet. J.*, v.84, n.7, p. 235-245, 2006.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. et al. Actinomicetos. In _____. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1ed. São Paulo: Artmed Editora, 2005, p. 74-82.

RIBEIRO, M. AGUIAR D.D.; PAES, A. et al. Nocardiose cutânea associada à cinomose em cães. Relato de dez casos. *Rev. Clín. Vet.* v. 39, n. 7 p. 34-42, 2002.

RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; MATTOS-GUARALDI, A.L. et al. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, p. 177-185, 2008.

RIBEIRO, M.A.; CONDAS, L.A.Z. Enfermidades pelo gênero *Nocardia*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. 1ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016, p.199-211.

TILGNER, S.L.; ANSTEY, S.I. *Nocardia* peritonitis in a cat. *Aust. Vet. J.*, v.74, p.430-432, 1996.

SYKES, J.E. Actinomicose e nocardiose. In: GREENE, C.E. *Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 510-521.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Infecções por actinomicetos ocorrem de forma esporádica no Sertão paraibano, apresentando alterações clínicas variadas de acordo com o tecido acometido evoluindo para morte do animal. É importante ressaltar o diagnóstico de tuberculose felina por *Mycobacterium bovis*, já que estes animais podem servir como reservatório do agente, o que pode promover a manutenção do microrganismo no ambiente e ocasionar a disseminação para o rebanho bovino da região ou a infecção para os humanos.

O emprego de técnicas histoquímicas especiais são relevantes e auxiliam no diagnóstico de diversos actinomicetos, pois permitem a visualização e caracterização morfológica de tais bactérias. Para o gênero *Mycobacterium* a coloração utilizada é a técnica de Ziehl-Neelsen e para a *Nocardia* spp. as principais colorações são as técnicas de Gram tipo Brown-Brenn, Ziehl-Neelsen modificado e GMS.

Estas doenças devem ser incluídas no diagnóstico diferencial nos casos em que os felinos com emagrecimento progressivo, linfadenopatia, dispneia, piotórax, peritonite e sinais neurológicos.

ANEXOS

1. 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).

1.1. 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 distinguem 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, exememplo: (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**.

2. Instruções aos autores – Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ. **Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE"**

Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética:

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmittee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos. **Relato de caso:** Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12. Comunicação: É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo". O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12. **Preparação dos textos para publicação:** Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impressoal. **Formatação do texto:** O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas. Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país. **Seções de um artigo.** Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras. Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word. Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa. Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*. **Introdução:** Explanção concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la. **Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética). **Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados. Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos

e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências. **Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes). **Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações. **Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados. **Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, adaptadas para o ABMVZ.

Taxas de submissão e de publicação

Taxa de submissão: A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação: A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

Submission and Publication fee. The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.