

20. DETECÇÃO DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2 E ZEARELENONA EM RAÇÃO DE CÃES PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.

FREHSE, M.S.; SCHNEEBERGER, C.; RIBEIRO, M.R.; SOUZA, L. F. C. B.; CARVALHO, L.R.L.; NETTO, D. P., FREIRE, R.L.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Ocorre em cereais como consequência de manejos de produção, estocagem inadequada e condições climáticas propícias para o desenvolvimento fúngico. Podem ser encontradas em grãos utilizados como matéria prima em ração de animais de companhia. Têm potencial carcinogênico e as aflatoxinas são as que causam maior preocupação, ocasionando grandes danos à saúde humana e elevados prejuízos econômicos quanto aos animais. A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina relacionada a efeitos no sistema reprodutivo em animais domésticos. O objetivo do estudo foi detectar a presença das micotoxinas: aflatoxina B1, B2, G1 e G2 e ZEA em ração de cadelas acometidas ou não por neoplasia mamária. Foram coletadas 140 amostras de ração: 60 amostras serviam de alimento para cadelas com tumor de mama (Grupo Caso) e 80 amostras para cadelas sem tumor (grupo Controle). Utilizou-se a metodologia de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), técnica semiquantitativa descrita por Valente Soares e Rodriguez-Amaya (1989) adaptada pelo Instituto Adolfo Lutz (1996). Das 140 amostras testadas, 21 (15%) apresentaram resultado positivo. Observou-se que das 60 amostras do grupo Caso, 13 (21,6%) foram positivas: cinco para ZEA; uma para aflatoxina B1; três para aflatoxina B2; e quatro para aflatoxina G1. Nas 80 amostras de ração do grupo Controle, oito foram positivas: três para ZEA; uma para aflatoxina B1; duas para aflatoxina G2 e três amostras apresentaram-se positivas tanto para a aflatoxina G1 quanto para aflatoxina B2, G2 e ZEA, respectivamente. De acordo com os resultados apresentados, concluiu-se que o maior número de amostras contaminadas, tanto para as do grupo Caso quanto para as do grupo Controle, foi para ZEA (oito) rações, as aflatoxinas G1 (sete), B2 (quatro), B1 (duas) e G2 (duas). Este estudo foi preliminar para o desenvolvimento de uma correlação entre a neoplasia mamária e a presença de micotoxinas na alimentação.

22. DESCRIÇÃO DA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DO CASCO BOVINO PARA ANÁLISE BACTERIOLÓGICA MOLECULAR DE LESÕES DE DERMATITE DIGITAL BOVINA.

NASCIMENTO, L.V.; SANTOS, C.L; OLLHOFF, R.D

RESUMO

Introdução: A dermatite digital ou doença de Mortellaro é uma inflamação contagiosa da epiderme próxima ao espaço interdigital ou a banda coronária com erosão, muitas vezes extensa e dolorosa. No início os pêlos no local estão eriçados, posteriormente tomando um aspecto granuloso. A lesão interfere no crescimento do talão produzindo um casco de má qualidade com vários sulcos e hipercrecimento do casco. Os fatores predisponentes são má higiene e umidade. Alguns autores encontraram em 2003 uma prevalência de 44% para a dermatite digital, com uma incidência anual de 12% de claudicação. Os principais agentes envolvidos parecem ser *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* e espiroquetas do gênero *Treponema spp.* No ano de 2010 foi descartada a possibilidade do vírus do papiloma bovino (BPV) estar envolvido principalmente quanto ao aspecto proliferativo da dermatite digital. No entanto, a maioria das espécies consistentemente cultivadas, identificadas por imunohistoquímica ou técnicas de biologia molecular de lesões de dermatite digital bovina são espiroquetas do gênero *Treponema spp.* Com tudo a etiologia precisa de microrganismos patogênicos presente no casco, ainda permanece obscura devido à grande variação microbiana existente. Apesar das ferramentas biomoleculares aumentarem em importância no auxílio ao diagnóstico de enfermidades em bovinos, a colheita das amostras de campo é importante para o sucesso das análises realizadas no laboratório. As lesões do casco bovino são especialmente propícias para as ferramentas biomoleculares por conterem inúmeras espécies bacterianas comensais ou contaminantes com bactérias patogênicas. **Objetivos:** Detalhar a metodologia de obtenção de amostras de tecido do casco bovino para melhorar as possibilidades de identificação de bactérias patogênicas específicas, exemplificadas aqui pela família das espiroquetas presentes no casco bovino. **Metodologia:** Foram usados 24 vacas da raça Holandesa com lesões podais. Após contenção do bovino e observado a lesão no casco, deve-se realizar uma higienização superficial com água e sabão para a redução parcial de carga microbiana, visto que o casco está em constante contato tanto com o solo quanto com um ambiente rico em matéria orgânica como o chorume e o esterco com grande quantidade microbiana. Após tal procedimento deve-se realizar a identificação do animal assim como a mensuração da lesão, com o auxílio de uma régua e registro fotográfico. Para a obtenção de fragmentos teciduais, o membro deverá ser anestesiado com lidocaína a 2% utilizando a técnica de Bier. Retiram-se fragmentos, preferencialmente em duplicata e em volume suficiente, para que haja sobras na análise laboratorial, pois os custos para refazer a colheita são elevados e principalmente a oportunidade de voltar à propriedade e encontrar outras lesões é improvável. Os fragmentos retirados devem conter as áreas mais atingidas pela lesão assim como pequena fração de tecido saudável adjacente, garantindo a obtenção de regiões ativas em crescimento bacteriano. As amostras deverão ser acondicionadas em um meio de transporte apropriado que não interfira nas análises propostas em laboratório e, se possível, mantenha ativo a bactéria patogênica procurada. No nosso caso optamos pela preservação em PBS e outra amostra mantido a fresco, somente resfriada a temperatura entre 4 a 8°C, mantidas em caixas de isopor, até o seu processamento no laboratório. No laboratório serão mantidos a -20°C até o processamento. O processamento das amostras consta com fragmentação minuciosa do tecido e subsequente técnicas biomoleculares para a extração do DNA bacteriano. Para a identificação das bactérias em interesse foram utilizados três pares de primers, um para o gene 16s, um para *Treponema spp.* e outro para *Treponema médium/ Treponema vincentii – like*

Resultados: A forma de colheita das amostras, o seu acondicionamento e transporte e o seu registro facilitam o processamento *a posteriori* no laboratório. Observou-se que das 48 amostras colhidas, todas amplificaram para o primer Universal 16S e *Treponema spp.*, 46 amostras amplificaram para o grupo específico *Treponema medium / Treponema vincentii like*. Não houve diferenças entre os meios de colheita e de transporte utilizados, contudo houve diferença na forma de armazenamento, no qual 24 amostras foram acondicionadas a fresco e 24 amostras em PBS. Das 24 amostras acondicionadas em PBS, duas não obtiveram o seu DNA expressado em gel de agarose, sendo que estas mesmas amostras acondicionadas a fresco obtiveram o seu DNA expressado em gel de agarose.

Conclusão: A obtenção criteriosa de amostras a campo aumenta a eficiência das análises em laboratório também nas lesões contaminadas do locomotor distal bovino.

Devido ao pequeno número de lesões analisadas, ainda não é possível informar a melhor maneira de acondicionar e transportar amostras de dermatite digital, porém tanto a manutenção em meio de PBS quanto a fresco permitiram a amplificação do genoma bacteriano até o presente momento.

Palavras chave: Casco bovino, amostras de campo, espiroquetas.

23. TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DE ÚLCERA DE PINÇA EM BOVINOS.

SELLERA, F.P.; GARGANO, R.G.; SOUZA, A.S.L.; AZEDO, M.R.; BENESI, F.J.; POGLIANI, F.C.

INTRODUÇÃO: As enfermidades podais estão entre as afecções que mais causam prejuízo na bovinocultura leiteira. Dentre as lesões, a úlcera de pinça vem se tornando cada vez mais frequente, provavelmente relacionada à ocorrência de laminites inaparentes nos rebanhos do país. A literatura demonstra resultados com tratamento utilizando antibiótico tópico e sistêmico, porém com perdas econômicas por causa do descarte dos produtos de origem animal. A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na associação de luz de comprimento de onda específico, fotossensibilizador (Fs) e oxigênio molecular. Essa interação promove o surgimento de espécies reativas de oxigênio que destroem bactérias e aceleram a reparação tecidual.

RELATO DE CASO: Foram atendidos na Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (FMVZ-USP), dois bovinos, fêmeas, adultas, SRD, apresentando úlcera de pinça, aumento de temperatura local, sensibilidade à palpação e claudicação em membros pélvicos. Após o diagnóstico, foi instituído o tratamento com TFD aplicando-se sobre as lesões o Fs azul de metileno (concentração de 300µM), seguido por irradiação com laser de diodo de 660nm (DMC, Ltda, São Carlos/SP), com energia igual a 8 J/ponto irradiado. Após a aplicação de TFD as lesões eram cobertas com bandagens protetoras, sem antibiótico local e sistêmico associados.

RESULTADOS: O tempo médio de resolução da enfermidade foi de um mês (oito aplicações) com frequência de duas aplicações/semana.

DISCUSSÃO: A associação de lasers de baixa intensidade e o Fs determina a destruição seletiva de microrganismos, promove aceleração da reparação tecidual, migração de fibroblastos e angiogênese, acelerando o processo cicatricial e sem efeito residual.

A revisão de literatura realizada confirma que a úlcera de pinça é uma doença podal de alta incidência na clínica médica de bovinos e reforça a importância do estudo de novas técnicas para seu tratamento.

CONCLUSÃO: A TFD se mostrou um tratamento eficiente e de baixo custo para úlcera de pinça em bovinos. Não existem trabalhos na literatura correlacionando a TFD e esta enfermidade, tornando esse relato pioneiro. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvendo a TFD e a úlcera de pinça em bovinos.

24. PRODUÇÃO DE IFN- (INTERFERON GAMA) PELAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE DE BEZERROS RECÉM-NASCIDOS ESTIMULADOS COM O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (VDVB).

BACCILI, C. C.; SILVA, C. P. C.; BALDACIM, V.A.P.; NOVO, S. M. F.; VASCONCELLOS, G. S. F. M.; POZZI, C.R.; PITUCO, M.; GOMES, V.

O desenvolvimento dos órgãos linfóides primários e secundários de fetos da espécie bovina se completa com 175 dias de gestação, no entanto, seu crescimento ocorre em ambiente uterino estéril e impermeável, que dificulta o amadurecimento da sua resposta imune específica, que é dependente da exposição aos patógenos. Acredita-se que os altos níveis de progesterona, prostaglandina E₂, IL-4 e IL-10 produzidas pela placenta bovina promovem resposta imune no bezerro pré-termo predominantemente do tipo TH₂, envolvidas com a ativação de linhagens de células B e produção de anticorpos, direcionadas à defesa contra microorganismos extracelulares. Desta forma, a resposta celular do tipo TH₁, responsável pela imunidade específica para agentes virais estaria suprimida. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a resposta imune TH₁ pela mensuração de IFN- γ interferon gama produzidos pelas células mononucleares do sangue de bezerros recém-nascidos estimulados com o VDVB estirpe NADL. Foram selecionados 03 bezerros recém-nascidos, que receberam 6L de colostro, provenientes de mães vacinadas com vacina comercial contendo as estirpes 5960 e 53637 do VDVB. Foram colhidas amostras de sangue dos bezerros (40mL) em tubos contendo heparina, nos seguintes momentos: 15 dias (T₀) e 40 dias (T₁) após o nascimento. Realizou-se a separação das células mononucleares por gradiente de densidade usando Ficoll-paque 1.077 (GE). As células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada (PBS) por meio de centrifugação refrigerada. Em seguida, o "pellet" celular foi ressuspensão em 1mL de meio de cultivo celular RPMI suplementado. A concentração celular foi obtida pelo teste de exclusão do azul de Trypan e ajustada para 5x10⁶/mL. Foram distribuídos 200 microlitros da suspensão celular (1x10⁶ células) em placas de cultivo celular na ausência e presença do vírus, usando as seguintes doses virais: TCID₅₀ 10⁻⁵/mL; TCID₅₀ 10⁻⁶/mL, TCID₅₀ 10⁻⁷/mL, TCID₅₀ 10⁻⁸/mL. As placas foram cultivadas por quatro dias a 37°C em estufa de CO₂. Após a incubação, o conteúdo das placas foi aspirado para a determinação da produção de IFN- γ por meio de imunoenzimático qualitativo (Bovine IFN- γ EASIA, Invitrogen®). Foi possível verificar a produção de IFN- γ na ausência e presença do estímulo viral em 2/3 bezerros, usando as doses TCID₅₀ 10⁻⁵/mL; TCID₅₀ 10⁻⁶/mL, TCID₅₀ 10⁻⁸/mL. No entanto, apenas 1/3 dos animais responderam a dose TCID₅₀ 10⁻⁷/mL. Desta forma pode-se concluir que os leucócitos mononucleares ao sangue de bezerros recém-nascidos são capazes de produzir citocina IFN- γ , mesmo na ausência da estimulação viral.