

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária**

Eric Santos Oliveira

**DOENÇA DE TYZZER EM DOIS FELINOS: PRIMEIRO RELATO DA  
MANIFESTAÇÃO NEUROLÓGICA NA ESPÉCIE**

Belo Horizonte  
2021

Eric Santos Oliveira

**DOENÇA DE TYZZER EM DOIS FELINOS: PRIMEIRO RELATO DA  
MANIFESTAÇÃO NEUROLÓGICA NA ESPÉCIE**

Monografia apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do título Especialista - Residência em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe Pierezan

Belo Horizonte  
2021

O48d

Oliveira, Eric Santos, 1996-

Doença de Tyzzer em dois felinos: primeiro relato da manifestação neurológica na espécie/  
Eric Santos Oliveira. – 2021.

35 f.:il

Orientador: Felipe Pierezan

Trabalho de conclusão de residência apresentada à Escola de Veterinária da Universidade  
Federal de Minas Gerais para obtenção do título em Residência em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Patologia Animal.

Bibliografias: f. 32 a 35.

1. Felinos – Doenças - Teses - 2. Patologia veterinária - Teses – 3. Hepatite– Teses –  
I. Pierezan, Eric Santos – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária -  
III. Título.

**CDD – 636. 089**

ATA DE DEFESA DE TCR DE Eric Santos Oliveira (nome residente)

Às 9:00 horas do dia 23 / 11 / 21, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso, para julgar em exame final, a defesa do TCR intitulado:

Doença de Tyzzer em dois felinos: primeiro relato da manifestação neurológica na espécie

\_\_\_\_\_, como requisito final para a obtenção do Título de Especialista em Patologia Veterinária.

Abrindo a sessão, o Presidente da Banca, Felipe Pierezan, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa do TCR, passou a palavra ao candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Banca se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da TCR, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof. <u>Felipe Pierezan</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. <u>Paula Roberta Giarretta</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. <u>Rodrigo Otávio Silva</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):  Aprovado

Reprovado

Nota: <sup>95</sup> \_\_\_\_\_

Para concluir o Programa, o(a) candidato(a) deverá entregar 3 volumes encadernados da versão final do TCR, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca, Para tanto terá o prazo máximo de 30 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Banca. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Banca Examinadora.

Belo Horizonte, de \_\_\_\_\_ de 2021.

Assinatura dos membros da Banca:

\_\_\_\_\_  
*Felipe Pierezan*  
 \_\_\_\_\_  
*Paula R Giarretta*  
 \_\_\_\_\_  
*Rodrigo Otávio Silva*  
 \_\_\_\_\_

**(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador e não poderá conter rasuras)**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus e ao universo por ter me dado à oportunidade de existir e vivenciar este período de grande aprendizado que foi a residência.

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho a minha família, meus pais Maria José e José Dias, minha irmã Nayara e ao mais novo membro da família, meu sobrinho Miguel. Obrigado por sempre me apoiarem nas minhas escolhas e por toda ajuda ao longo destes anos, se cheguei até aqui é tudo graças aos esforços de vocês.

Gostaria de agradecer ao Programa de Residência Multiprofissional da UFMG que foi de extrema importância para meu aprimoramento profissional. Agradeço também a todos os professores que compõem o setor de Patologia Animal da UFMG (Felipe Pierezan, Paula Roberta Giaretta, Roselene Ecco, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Renato de Lima Santos, Rogéria Serakides e Natalia de Melo Ocarino) que me ensinaram muito ao longo desses dois anos. Em especial, agradeço ao meu Tutor professor Felipe Pierezan, obrigado por toda a paciência, prontidão para sempre ensinar, convivência e troca de experiências ao longo destes dois anos.

Agradeço também a professora Paula Roberta Giaretta, responsável pelos casos e que desde o início não mediu esforços para fechar o diagnóstico e sempre esteve disposta a ajudar. E também a residente Larissa Giannini que disponibilizou um dos casos para que pudesse ser utilizado neste trabalho. Agradeço também os colaboradores do trabalho, o professor Rodrigo Otávio Silveira Silva e todos que compõem o laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária – LAEV, o professor Renato de Lima Santos, o doutorando Daniel Oliveira dos Santos e a mestrandia Cíntia Regina Rêgo Queiroz.

Entrar na residência num contexto de pandemia não é nada fácil, vários obstáculos, dificuldades e adaptações ocorreram ao longo destes dois anos, mas quando temos pessoas boas ao nosso redor tudo fica mais fácil. Por isso, gostaria de agradecer a minha Rparça Nayara Ferreira de Paula por sempre estar comigo, partilhando dos momentos bons e ruins, ouvindo e ajudando sempre que necessário. E também aos meus R2 maravilhosos Carlos Eduardo e Lucas, obrigado por todos os ensinamentos e momentos de descontrações e alegrias. E também as minhas R1 Daniele e Larissa, vocês são incríveis e tornaram o ambiente mais leve e divertido.

Sou grato também aos técnicos Leimar, Valéria e Luis que contribuem muito para o trabalho na patologia e sempre estão dispostos a ajudar. Agradeço também a todos os colaboradores do hospital, pois sem vocês nada funcionaria.

Agradeço também em especial as minhas amigas Izabela e Gabriela que conheci na UFMG e todos os pós-graduandos que compõem o setor da Patologia Animal. E também aos meus amigos de Sergipe de longos anos, Marcos, Alessandra, Iolanda, Valter, Jenifer, Allef, Flávia, Amanda e Franciele. Agradeço também e dedico este trabalho a Alexander que pude conviver por muitos anos, sempre me ajudou e pude partilhar de experiências incríveis na minha vida.

Por fim, um agradecimento especial e dedicação deste trabalho a professora Lorena Gabriela Rocha Ribeiro que sempre me incentivou, aconselhou e despertou em mim a paixão pela patologia. Muito do que sou e se cheguei até aqui foi graças a você. Obrigado!

## RESUMO

Descreve-se a ocorrência da doença de Tyzzer em dois felinos; um deles o primeiro relato na literatura da forma neurológica da doença nessa espécie. Ambos os animais eram filhotes. O primeiro desenvolveu sinais clínicos de paralisia dos membros pélvicos, diarreia, tremores e opistótono e morreu após três dias do início dos sinais clínicos; o segundo foi encontrado morto e não possuía histórico clínico prévio. No exame histopatológico do felino 1 observou-se enterite, hepatite, miocardite, mielite e encefalite necrotizante associada a bacilos filamentosos intracelulares no intestino, fígado e encéfalo, compatíveis com *Clostridium piliforme*, com confirmação por teste molecular de PCR. Além disso, havia uma lesão cutânea ulcerativa, que na microscopia foi associada a bacilos filamentosos intracelulares e confirmada por PCR para o agente, sendo esta forma a primeira vez descrita em animais. No felino 2 havia uma enterite superficial discreta que, na coloração especial de *Warthin-Starry*, apresentou o agente no interior de enterócitos, o que foi considerado sugestivo da doença, apesar do teste molecular (PCR) do bloco parafinizado ter sido negativo.

**Palavras-chaves:** encefalite, felinos, *Clostridium piliforme*, miocardite, hepatite, lesão cutânea.

## ABSTRACT

The occurrence of Tyzzer's disease is described in two felines; one of them being the first report in the literature of the neurological form of the disease in this species. Both animals were kittens. The first one developed clinical signs of paralysis of the hind limbs, diarrhea, tremors, and opisthotonos and died three days after the onset of clinical signs; the second was found dead and had no prior clinical history. Histopathological examination of feline 1 revealed enteritis, hepatitis, myocarditis, myelitis, and necrotizing encephalitis associated with intracellular filamentous bacilli in the intestine, liver, and brain, consistent with *Clostridium piliforme*, confirmed by molecular PCR testing. Additionally, there was an ulcerative skin lesion, which on microscopy was associated with intracellular filamentous bacilli and confirmed by PCR for the agent, marking the first time this form was described in animals. In feline 2, there was mild superficial enteritis that, in Warthin-Starry special staining, showed the agent inside enterocytes, which was considered suggestive of the disease, despite the negative molecular test (PCR) on the paraffin-embedded block.

Keywords: encephalitis, felines, *Clostridium piliforme*, myocarditis, hepatitis, skin lesion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Felino 1. Pobre condição corporal (emaciação moderada).....	21
Figura 2	Felino 1. Superfície corporal. Quantidade intensa de fezes líquidas marrom-esverdeadas aderidas ao pelame.....	21
Figura 3	Felino 1. Coração, corte transversal do tecido fixado em formol 10%. Áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas no miocárdio.....	21
Figura 4	Felino 1. Telencéfalo parietal, corte transversal do tecido fixado em formol 10%. Área focalmente extensa amarelada e finamente granular (seta) no parênquima entre a substância branca e cinzenta.....	21
Figura 5	Felino 1. Intestino. Mucosa com necrose intensa, restos celulares e neutrófilos degenerados em região das criptas, HE, 200X.....	22
Figura 6	Felino 1. Intestino. Camada muscular com área focalmente extensa de infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos degenerados e alguns macrófagos e linfócitos, HE, 200X.....	22
Figura 7	Felino 2. Intestino. Lâmina própria e interior das criptas com infiltrado inflamatório neutrofílico moderado, HE, 200X.....	22
Figura 8	Felino 2. Intestino. Bacilos filamentosos (setas) no citoplasma de enterócitos superficiais, <i>Warthin-Starry</i> , 400X.....	22
Figura 9	Felino 1. Fígado. Parênquima com áreas multifocais de necrose e perda de hepatócitos associada a infiltrado inflamatório composto por neutrófilos degenerados e alguns linfócitos, HE, 100X.....	23
Figura 10	Felino 1. Fígado. Imagem aproximada evidenciando as áreas de necrose e o infiltrado inflamatório, HE, 200X.....	23
Figura 11	Felino 1. Fígado. Bacilos filamentosos (setas) e em feixes no citoplasma de hepatócitos, <i>Warthin-Starry</i> , 400X.....	23
Figura 12	Felino 1. Fígado. Bacilos filamentosos Gram-positivos (setas) no citoplasma de hepatócitos, Gram, 400X.....	23
Figura 13	Felino 1. Coração. Endocárdio e miocárdio com área focalmente extensa de infiltrado inflamatório intenso, HE, 10X.....	24
Figura 14	Felino 1. Coração. Miocárdio com área focalmente extensa de necrose, margeada por infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos e alguns linfócitos, HE, 200X.....	24

Figura 15	Felino 1. Medula espinhal. Substância cinzenta com área focalmente extensa de perda do neuroparênquima, HE, 40X.....	24
Figura 16	Felino 1. Medula espinhal. Infiltrado inflamatório neutrofílico intenso associado às áreas de necrose e alguns vasos com manguitos perivasculares, HE, 100X.....	24
Figura 17	Felino 1. Telencéfalo. Área focalmente extensa de necrose com perda do neuroparênquima e quantidade intensa de células Gitter, HE, 100X.....	25
Figura 18	Felino 1. Telencéfalo. Imagem aproximada evidenciando as células Gitter e perda do neuroparênquima, HE, 200X.....	25
Figura 19	Felino 1. Telencéfalo. Espaço perivascular com infiltrado inflamatório composto por neutrófilos degenerados, linfócitos e plasmócitos, HE,200X..	25
Figura 20	Felino 1. Telencéfalo. Bacilos filamentosos (setas) dispostos em feixes e sobrepostos nas áreas de necrose, <i>Warthin-Starry</i> , 400X.....	25
Figura 21	Felino 1. Pele pilosa. Epiderme com área focalmente extensa de ulceração e formação de crosta, HE, 40X.....	26
Figura 22	Felino 1. Pele pilosa. Epiderme com pústulas intraepiteliais, hiperqueratose compacta moderada e infiltrado inflamatório neutrofílico na derme superficial e folículos pilosos, HE, 100X.....	26
Figura 23	Felino 1. Pele pilosa. Imagem aproximada evidenciando a pústula e o infiltrado inflamatório na derme superficial e parede dos folículos pilosos, HE, 200X.....	26
Figura 24	Felino 1. Pele pilosa. Bacilos filamentosos (setas) dispostos em feixes e sobrepostos no citoplasma de queratinócitos da epiderme adjacente a uma área de ulceração, <i>Warthin-Starry</i> , 400X.....	26



## LISTA DE ABREVIATURAS

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

IHQ- Imuno-histoquímica

DT- Doença de Tyzzer

HE – Hematoxilina e Eosina

PAS- *Ácido Periódico de Schiff*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
2.1 Etiologia.....	11
2.2 Epidemiologia.....	12
2.3 Patogenia e sinais clínicos .....	13
2.4 Achados macroscópicos e microscópicos .....	13
2.5 Diagnóstico .....	15
2.6 Tratamento e prevenção .....	16
<b>3. RELATO DOS CASOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Histórico clínico.....	16
3.2 Materiais e métodos .....	18
3.2.1 Macroscopia e histopatologia.....	18
3.2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento .....	18
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Tyzzer é uma doença infecciosa causada pelo *Clostridium piliforme*, conhecido previamente como *Bacillus piliforme*. O primeiro relato da doença foi feito no Japão, em 1917, onde camundongos de um centro de pesquisa foram acometidos pela enfermidade (TYZZER, 1917).

A doença é mais comum em animais de laboratório, embora haja relatos esporádicos em várias espécies de animais domésticos e até em espécies exóticas (NAVARRO e UZAL, 2020). Dentre animais de laboratório, há relatos em camundongos, gerbilos, ratos, hamsters, cobaios e coelhos (PERCY e BARTHOLD, 2007). Dentre os domésticos, há relatos principalmente em potros (BORCHERS *et al.*, 2006; GARCÍA *et al.*, 2021; SWERCZEK, 2013) e, menos comumente, em bovinos (IKEGAMI, SHIROTA, UNE, *et al.*, 1999), cães (HEADLEY *et al.*, 2009) e felinos (BENNETT, HUXTABLE e LOVE, 1977; IKEGAMI *et al.*, 1999; NETO *et al.*, 2015). Em espécies exóticas, há relatos em primatas (YOSHIDA *et al.*, 2013), passeriformes (METE *et al.*, 2011; METE, ROGERS e WOODS, 2017), cervídeos (BROOKS *et al.*, 2006), felinos silvestres (POONACHA, 1997), lontras (SIMPSON *et al.*, 2008) e roedores silvestres (GREAR *et al.*, 2019). Embora não seja uma zoonose, há um relato da doença em um paciente humano imunossuprimido portador do HIV (SMITH *et al.*, 1996).

A doença afeta principalmente animais jovens e imunossuprimidos (PERCY e BARTHOLD, 2007). A transmissão é por via fecal-oral e a patogenia é pouco conhecida. Após a infecção, a bactéria coloniza a mucosa intestinal do íleo, ceco e cólon e causa quadros de enterite. Frequentemente, a bactéria alcança a circulação portal e se dissemina para o fígado, coração e outros órgãos. Encefalite é pouco relatada na maioria das espécies (NAVARRO e UZAL, 2020). Este achado é mais comum em gerbilos, espécie mais susceptível a doença (PERCY e BARTHOLD, 2007). Além disso, há alguns relatos de encefalite em aves silvestres (METE *et al.*, 2011; METE, ROGERS e WOODS, 2017) e em um primata (YOSHIDA *et al.*, 2013).

Os sinais clínicos são inespecíficos; diarreia, inapetência, aumento de volume abdominal, perda de peso e anorexia são frequentemente observados em coelhos (ARTUKOVIĆ *et al.*, 2010). Em casos graves, pode haver também morte súbita em coelhos e camundongos (NAVARRO e UZAL, 2020).

O diagnóstico é estabelecido com base nas lesões macroscópicas e microscópicas

hepáticas, intestinais e/ou cardíacas, associadas à presença da bactéria no interior das células afetadas (NAVARRO e UZAL, 2020). Exames complementares como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e imuno-histoquímica (IHQ) também são realizados para estabelecer o diagnóstico definitivo (IKEGAMI *et al.*, 1999). Na literatura há poucos casos de sucesso no tratamento da doença. Em potros, há um caso de cura em tratamento com ampicilina e gentamicina combinado a nutrição parenteral (BORCHERS *et al.*, 2006).

Este trabalho tem o objetivo de descrever o primeiro relato da doença de Tyzzer em animais no Brasil, acometendo dois felinos, um deles sendo o primeiro caso com forma neurológica da doença e a primeira descrição de afecção cutânea em animais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Etiologia

O *Clostridium piliforme* é o agente causador da doença de Tyzzer (DT). Esta bactéria é anaeróbica, filamentosa, pleomórfica, produz esporos e é um agente intracelular obrigatório (NAVARRO e UZAL, 2020). A forma vegetativa da bactéria mede de 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com espessura da parede de aproximadamente 25 nm; já os esporos medem de 0,6 a 1,4  $\mu\text{m}$  de diâmetro e a espessura da parede varia de 90 a 250 nm (NETO *et al.*, 2015).

Embora *C. piliforme* seja comumente Gram-negativo nas secções histológicas, a bactéria pode ser Gram-variável ou Gram-positiva (DUNCAN *et al.*, 1993; NAVARRO e UZAL, 2020). No entanto, a bactéria é melhor visualizada por técnicas de impregnação pela prata, como a coloração de *Warthin-Starry* (NAVARRO e UZAL, 2020). Na coloração de *Giemsa* a bactéria também pode ser vista, principalmente em tecidos frescos (CULLEN e STALKER, 2016).

Os fatores de virulência da bactéria não são bem caracterizados (NAVARRO e UZAL, 2020). Contudo, diferenças antigênicas do agente isolado em diferentes espécies indicam que a bactéria apresenta diferentes graus de citotoxicidade, resultando em diferentes formas clínicas da doença (NETO *et al.*, 2015; PERCY e BARTHOLD, 2007).

A bactéria é intracelular obrigatória e só se propaga *in vitro* com o uso de ovos embrionados de galinhas ou em algumas linhagens celulares específicas, como células embrionárias primárias de camundongos e células primárias de fígado de camundongos ou galinhas (PERCY e BARTHOLD, 2007). Por ser difícil a cultura deste agente, conhecimentos sobre a patogenia da doença são extremamente limitados (NAVARRO e UZAL, 2020).

## 2.2 Epidemiologia

A DT é comumente relatada em animais jovens e imunossuprimidos (NAVARRO e UZAL, 2020). Imunossupressão pode ocorrer por aumento de corticosteroides ou em algumas infecções virais (IKEGAMI *et al.*, 1999). Em felinos, infecções primárias pelos vírus da panleucopenia felina e leucemia felina (FeLV) causam depleção linfóide, que resulta em imunossupressão e frequentemente estão associados a casos de DT na espécie (BENNETT, HUXTABLE e LOVE, 1977; IKEGAMI *et al.*, 1999). Já em cães e guaxinis, a DT é frequentemente associada a infecção pelo vírus da cinomose (HEADLEY *et al.*, 2009).

Além disso, outros fatores predisponentes para a doença incluem superpopulação, má higiene do ambiente, mudanças da dieta e administração de glicocorticoides (NAVARRO e UZAL, 2020; PERCY e BARTHOLD, 2007). Em potros, coprofagia e dietas ricas em concentrado são os principais fatores predisponentes para ocorrência da DT (SWERCZEK, 2013) e os animais são mais afetados entre uma e quatro semanas de idade (CULLEN e STALKER, 2016). Já em camundongos, superpopulação é a causa mais comum para surtos da doença (RIGHTS, JACKSON e SMADEL, 1946). Há, também em camundongos, linhagens mais susceptíveis e resistentes, como as linhagens DBA/2 e C57BL/6, respectivamente. Este fator está relacionado com a resposta imunológica das células natural killer e neutrófilos nestes animais (ANDEL *et al.*, 1997).

A bactéria é eliminada no ambiente pelas fezes de animais infectados. Na forma esporulada o organismo pode sobreviver por pelo menos um ano em cama contaminada e no ambiente natural por até cinco anos (PERCY e BARTHOLD, 2007). Os esporos são resistentes a maioria dos desinfetantes comuns, sendo apenas o hipoclorito de sódio considerado eficaz (STANNARD, TULK e OLD, 2017).

Em muitos animais de laboratório, infecções por *C. piliforme* são subclínicas e hospedeiros imunocompetentes se curam após soroconversão (PRITT, HENDERSON e SHEK, 2010). Em condições naturais não há transmissão vertical da doença, no entanto, há transmissão intrauterina em casos experimentais de inoculação intravenosa do agente em camundongos (PERCY e BARTHOLD, 2007). Os surtos da DT geralmente apresentam características de baixa morbidade e alta letalidade (NAVARRO e UZAL, 2020; PERCY e BARTHOLD, 2007). E nos animais silvestres de vida livre, os roedores silvestres tem um papel fundamental na manutenção da doença na natureza (Simpson *et al.*, 2008), pois estes animais funcionam como carreadores ou reservatórios da bactéria (STANNARD, TULK e OLD, 2017).

### 2.3 Patogenia e sinais clínicos

A via de infecção da bactéria é oral, pela ingestão de material contaminado com os esporos (NAVARRO e UZAL, 2020). Após a ingestão, a bactéria coloniza o intestino e provoca enterite (GARCÍA *et al.*, 2021). Em todas espécies com relatos da doença, os segmentos do íleo, ceco e cólon são os mais afetados (PERCY e BARTHOLD, 2007). Além disso, animais com DT frequentemente apresentam lesões no fígado e coração, devido à translocação bacteriana do intestino que atinge a circulação portal (NAVARRO e UZAL, 2020). O processo de bacteremia aparenta ter contribuição de macrófagos residentes da mucosa intestinal, que fagocitam os bacilos e posteriormente migram para outros órgãos (YOSHIDA *et al.*, 2013).

Em potros, lesões no fígado são mais frequentes, enquanto que lesões no intestino e coração são menos comuns (GARCÍA *et al.*, 2021). Casos espontâneos de encefalite pelo *C. piliforme* são raros (NAVARRO e UZAL, 2020). No entanto, experimentalmente, as lesões são reproduzidas por meio da inoculação intracraniana de suspensões infectadas pelo agente em camundongos, ratos, coelhos e hamsters. Os animais entre o terceiro e oitavo dia após a inoculação apresentam sinais de doença neurológica (RIGHTS, JACKSON e SMADEL, 1946).

Os sinais clínicos podem aparecer pouco antes da morte dos animais, geralmente são inespecíficos e variam entre indivíduos e espécies (STANNARD, TULK e OLD, 2017). Muitos animais podem apresentar anorexia, depressão, pirexia, icterícia, diarreia, decúbito, perda do reflexo de sucção, desidratação, convulsões e morte (BARNES, PIRIPI e LÖHR, 2013). Em potros, os sinais mais frequentes são fraqueza, letargia, anorexia, desidratação, pirexia, taquicardia, diarreia semilíquida, convulsões, coma e morte (SWERCZEK, 2013).

Em animais silvestres, os sinais podem ser ausentes ou incluir diarreia, anorexia e desidratação (STANNARD, TULK e OLD, 2017). Sinais de tremores, opistótono, ataxia, inclinação da cabeça e incapacidade de empoleirar-se são observados em pássaros com apresentação de encefalite (METE *et al.*, 2011; METE, ROGERS e WOODS, 2017).

### 2.4 Achados macroscópicos e microscópicos

Embora a doença inicie no intestino, geralmente as lesões macroscópicas são menos frequentes ou pouco específicas (CULLEN e STALKER, 2016). Neste órgão, as alterações iniciais caracterizam-se por áreas multifocais vermelho-escuras na mucosa, principalmente do íleo e ceco (PERCY e BARTHOLD, 2007). Em casos mais graves, há espessamento intenso da parede do íleo, ceco e cólon por edema, com conteúdo variando de líquido a gelatinoso e áreas

de petéquias e equimoses na serosa (NAVARRO e UZAL, 2020).

As alterações macroscópicas mais evidentes normalmente são encontradas no fígado, que em muitos casos está aumentado de tamanho, com padrão lobular evidente e múltiplos pontos marrom-avermelhados ou esbranquiçados distribuídos aleatoriamente por todo o parênquima (GARCÍA *et al.*, 2021). No coração, pode haver no miocárdio focos únicos ou múltiplos esbranquiçados, que variam de arredondados a lineares (NAVARRO e UZAL, 2020). Alguns animais também apresentam icterícia (GARCÍA *et al.*, 2021). Nos casos com apresentação de encefalite, geralmente, lesões macroscópicas não são evidentes (RIGHTS, JACKSON e SMADEL, 1946).

Microscopicamente, as lesões no intestino são caracterizadas por infiltrado inflamatório no íleo, ceco e cólon, variando de discreto a intenso (ALLEN *et al.*, 1965). Na mucosa e lâmina própria há infiltrado inflamatório composto por numerosos linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, associados à dilatação de criptas com restos celulares, edema e hemorragia de submucosa e necrose transmural (NAVARRO e UZAL, 2020). Associado as lesões, há agregados dos bacilos no interior dos enterócitos e fibras musculares (PERCY e BARTHOLD, 2007).

No fígado, hepatite e áreas multifocais de necrose de hepatócitos são os achados mais frequentes, e, por vezes, as áreas de necrose coalescem (SWERCZEK, 2013). Os focos de necrose são caracterizados por necrose de coagulação, misturado com fibrina e infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos (GARCÍA *et al.*, 2021). Margeando as áreas de necrose há, no citoplasma de hepatócitos, numerosos bacilos filamentosos, dispostos em feixes ou intercruzados (NAVARRO e UZAL, 2020).

Já as lesões cardíacas, quando presentes, são caracterizadas por áreas multifocais de necrose de cardiomiócitos, com infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos e a bactéria no interior do sarcoplasma (NAVARRO e UZAL, 2020). As alterações no sistema nervoso central envolvem principalmente a região do córtex cerebral (METE, ROGERS e WOODS, 2017). As lesões histopatológicas são compostas por áreas extensas de necrose do neuroparênquima, com gliose, formação de microabscessos e infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos e alguns macrófagos (METE *et al.*, 2011; RIGHTS, JACKSON e SMADEL, 1946; YOSHIDA *et al.*, 2013). A bactéria é encontrada no citoplasma de neurônios associado as áreas de necrose (METE *et al.*, 2011; YOSHIDA *et al.*, 2013).

## 2.5 Diagnóstico

O diagnóstico *antemortem* da doença é difícil e, normalmente, só é estabelecido após análise *post mortem* (BORCHERS *et al.*, 2006). A presença de lesões no coração, fígado e intestino constituem as lesões clássicas da DT, embora sua distribuição seja variável entre as espécies (NAVARRO e UZAL, 2020). O diagnóstico definitivo é estabelecido pelas alterações macroscópicas e histopatológicas associadas à presença da bactéria nos tecidos afetados (PERCY e BARTHOLD, 2007). Na coloração de hematoxilina e eosina, a bactéria é pouco visível (NAVARRO e UZAL, 2020); normalmente ela é visualizada em técnicas de impregnação pela prata como o *Warthin-Starry* ou na coloração de *Giemsa* (CULLEN e STALKER, 2016).

Outros exames complementares, como a microscopia eletrônica de transmissão, podem ser utilizados para visualizar as formas vegetativas e os esporos da bactéria no citoplasma das células afetadas (IKEGAMI *et al.*, 1999; NETO *et al.*, 2015). Imuno-histoquímica com anticorpos de camundongos anti- *C. piliforme* também é uma ferramenta útil para estabelecer o diagnóstico definitivo da doença (IKEGAMI *et al.*, 1999).

Outro método diagnóstico importante é a PCR, que consiste na amplificação de fragmentos de DNA do *C. piliforme* (NAVARRO e UZAL, 2020). O método pode ser utilizado em amostras de tecidos frescos, fezes e tecidos parafinizados, entretanto, os resultados devem ser interpretados com cuidado e sempre devem ser associados a lesões macroscópicas e histológicas da DT, uma vez que o agente tem proximidade filogenética com *Clostridium colinum* e outros *Clostridium* spp. não patogênicos (FELDMAN *et al.*, 2006).

Em animais de laboratório, testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta, são muito úteis para vigilância da doença nas colônias, por serem baratos e rápidos, no entanto, devido a resultados falso-positivos o diagnóstico definitivo só é estabelecido com base em lesões histológicas e PCR (PRITT, HENDERSON e SHEK, 2010). Por ser um organismo intracelular obrigatório e com crescimento limitado a poucas linhagens celulares a cultura do agente é muito difícil (NAVARRO e UZAL, 2020).

O hemograma e exames bioquímicos de animais domésticos e de laboratório com DT normalmente demonstram anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, acidose metabólica, hipocalcemia, hipoglicemia, hiperbilirrubinemia e aumento das enzimas hepáticas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e sorbitol



desidrogenase) (ARTUKOVIĆ *et al.*, 2010; NAVARRO e UZAL, 2020).

## **2.6 Tratamento e prevenção**

Devido ao curso agudo da doença, com sinais clínicos ausentes ou inespecíficos o que torna difícil sua detecção, o tratamento é limitado (STANNARD, TULK e OLD, 2017). Em potros, há na literatura um caso de cura atribuído à identificação precoce da doença associada ao tratamento agressivo instituído com ampicilina e gentamicina e nutrição parenteral (ARTUKOVIĆ *et al.*, 2010). Há também casos em camundongos que relatam sucesso na erradicação da doença com o estabelecimento do tratamento com tetraciclina (HUNTER, 1971).

A prevenção envolve higiene do ambiente, controle de carreadores da doença como os roedores silvestres, atenção com eventos imunossupressores nos animais, e em potros, adequada transferência de imunidade passiva logo após o nascimento. Não há vacinas comercialmente disponíveis para a DT (NAVARRO e UZAL, 2020).

## **3. RELATO DOS CASOS**

### **3.1 Histórico clínico**

Felino 1, fêmea, de uma ninhada de quatro filhotes e aproximadamente 45 dias de idade, apresentou repentinamente perda dos movimentos dos membros pélvicos no dia 19/02/2021. No mesmo dia, o animal foi levado ao veterinário e, na avaliação física, havia dor abdominal intensa na palpação e perda dos movimentos pélvicos com propriocepção diminuída. Devido ao quadro clínico, o animal foi internado. Esse animal era proveniente de uma colônia de felinos semi-domiciliados, no bairro Buritis, em Belo Horizonte-MG.

No primeiro dia do internamento, a gata comia e bebia normalmente, urinava, e apresentou fezes pastosas com odor forte, tremores por todo o corpo e febre. No segundo dia, começou a apresentar um quadro de diarreia e perda completa da propriocepção dos membros pélvicos. No terceiro dia houve piora significativa do quadro clínico, o animal parou de se alimentar, não urinava, estava prostrado, com secreção catarral nas narinas e cavidade oral, edema nos membros e apresentou episódios de opistótono. Realizou-se alimentação forçada e compressão vesical, para esvaziar a bexiga. Durante a noite o felino morreu. Durante o internamento, o animal foi tratado com tramadol, dexametasona e sulfametoxazol + trimetoprima. Realizou-se exames radiográficos de tórax e coluna, mas não foram observadas alterações. Não foram realizados exames hematológicos. A mãe e um dos filhotes da ninhada apresentaram, posteriormente, alterações respiratórias sugestivas de rinotraqueíte. Ambos

foram tratados com doxiciclina e apresentaram melhora do quadro clínico.

No lar temporário que o animal ficou logo após nascer, semanas antes, outro felino filhote morreu com sinais clínicos parecidos, que incluíam claudicação dos membros pélvicos, tremores, secreção catarral intensa nas narinas e edema por todo o corpo. O animal foi internado, recebeu antibioticoterapia, mas morreu no quinto dia de internamento e a necropsia não foi realizada.

Além disso, posteriormente, uma ninhada de uma colônia de outro bairro ficou por um tempo neste mesmo lar temporário. Logo em seguida, já em outra residência, três dos quatro filhotes apresentaram sinais clínicos de claudicação nos membros pélvicos, tremores, dor abdominal intensa, febre e fezes pastosas. Dois deles apresentaram também perda de peso progressiva e lesões ulcerativas cutâneas. Os animais foram tratados com anti-inflamatório, doxiciclina, metronidazol, penicilina e tetraciclina, por aproximadamente 30 dias, mas não responderam ao tratamento com nenhum dos antibióticos. Realizou-se PCR das fezes para *Clostridium* spp. e todos foram positivos, inclusive a mãe e um dos filhotes que não apresentavam sinais clínicos. Devido ao quadro clínico desfavorável, todos os filhotes foram submetidos à eutanásia, porém, não foi realizada a necropsia desses animais.

Outros 15 felinos adultos domiciliados tiveram contato indireto com esta ninhada, pois conviveram na mesma residência, embora ficassem em ambientes separados. Após três dias da eutanásia dos filhotes, dois deles apresentaram fezes pastosas, realizou-se PCR das fezes para *Clostridium* spp. e todos foram positivos. No entanto, estes resultados e dos filhotes não possuem valor diagnóstico já que os primers utilizados não eram específicos para *C. piliforme* e o resultado pode ser atribuído a clostrídios pertencentes a microbiota. Nenhum deles apresentou outros sinais clínicos, todos foram tratados com metronidazol por sete dias e ficaram bem. Realizou-se cultura e antibiograma das fezes, posteriormente ao tratamento, e só houve crescimento de *Escherichia coli*.

O felino 2 deste relato era um animal do campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O animal foi o segundo de uma ninhada de três a ser encontrado morto no campus da UFMG e encaminhado para necropsia, sendo que o primeiro foi diagnosticado com uma hérnia diafragmática peritônio-pericárdica congênita. Não havia histórico clínico.

## 3.2 Materiais e métodos

Considerando a data de cada morte, os cadáveres foram individualmente encaminhados para necropsia no Hospital Veterinário da UFMG. Durante a necropsia, amostras de órgãos do felino 1 foram coletadas e congeladas, e posteriormente, amostras de DNA extraído foram enviadas ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária (LAEV), da mesma instituição. Metodologia da extração de DNA será descrita posteriormente.

### 3.2.1 Macroscopia e histopatologia

O felino 1 foi congelado logo após a morte e encaminhado para a necropsia dois dias depois. Realizou-se o descongelamento lento e a necropsia no dia seguinte. O felino 2 foi refrigerado imediatamente após ser encontrado morto nas dependências do campus e a necropsia foi realizada em até oito horas, período em que o cadáver foi mantido sob refrigeração. Amostras da maioria dos órgãos dos dois animais, com lesões e sem lesões macroscópicas, foram coletadas e fixadas em formalina tamponada neutra a 10%. Após 48h, as amostras foram clivadas e processadas rotineiramente para histopatologia. Posteriormente, os tecidos incluídos em parafina foram seccionados a 5 µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina (HE) e examinados no microscópio óptico convencional (LUNA, 1968). No felino 1, nas secções do encéfalo, fígado, coração e intestino realizou-se colorações especiais de Giemsa, *Warthin-Starry*, *Ácido Periódico de Schiff* (PAS) e Gram; e na medula espinhal, *Warthin-Starry* e Gram. No felino 2, foi realizada a coloração especial de *Warthin-Starry* nas secções do intestino, fígado e coração.

### 3.2.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

As amostras congeladas do intestino, fígado e coração e o bloco parafinado do encéfalo, pele e medula espinhal foram submetidos ao diagnóstico molecular pela técnica de PCR. Para extração do DNA os tecidos foram descongelados e macerados com uma lâmina de bisturi estéril numa placa de petri. Em seguida, colocou-se o tecido macerado em tubos e foi adicionado, lentamente, 500 µL do reagente GES para lisar as células, por 10 minutos no gelo. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de acetato de amônio gelado a -20°C, com ação por 10 minutos. Adicionou-se também 500 µL de solução clorofórmio 2- pentanol, misturando bem as fases de forma vigorosa até a solução ficar esbranquiçada. Depois, o material foi centrifugado a 15.150 xg por 10 minutos, e 750 µL do sobrenadante foi transferido e adicionado a 405 µL de isopropanol gelado (-20°C). As amostras foram acondicionadas por 24 horas a -20°C. No dia seguinte, os tubos foram homogeneizados por um minuto, e centrifugados a 15.150 xg por

cinco minutos para a precipitação do DNA. Descartou-se o sobrenadante. Os pellets foram lavados em etanol 70%, por duas vezes, na temperatura ambiente com 500  $\mu\text{L}$ . Depois, as amostras de DNA foram centrifugadas a 14.070 xg por 5 minutos, os tubos foram secos, e o pellet ressuspendido e diluído em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

Já a extração no bloco parafinado foi realizada utilizando o Kit Promega Reliaprep FFPE gDNA Miniprep System. Inicialmente, cortou-se 10 fitas do tecido parafinado a 10  $\mu\text{m}$  de espessura, com uma navalha estéril, colocadas em um microtubo de 2 mL. Imediatamente após este procedimento, realizou-se as demais etapas da extração. Adicionou-se ao microtubo 300  $\mu\text{L}$  de óleo mineral e esse foi incubado a 80°C, por um minuto, para desparafinização. A amostra foi homogenizada no vórtex, seguida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise e centrifugação a 10000 xg, por 15 segundos, em temperatura ambiente, para a formação da fase aquosa e oleosa. À fase aquosa, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K, que foi homogenizada com a pipeta. A amostra foi incubada a 56°C por uma hora e depois a 80°C por quatro horas. Após este processo, foi centrifugada rapidamente e 10  $\mu\text{L}$  de RNase direto foram adicionados a fase aquosa, seguida pela homogeneização com pipeta e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 220  $\mu\text{L}$  de BL Buffer e 240  $\mu\text{L}$  de etanol 100% a solução, que foi novamente homogeneizada no vórtex, e centrifugada a 10000 xg por 15 segundos. A fase aquosa foi transferida para o tubo com a coluna de extração. Centrifugou-se o tubo com a coluna de extração a 10.000 xg por 30 segundos, descartando-se o líquido, que passou para o tubo e foi adicionado a 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem na coluna. Repetiu-se o mesmo processo de centrifugação, descartando-se o líquido do tubo. Posteriormente, abriu-se a tampa da coluna e foi realizada uma nova centrifugação a 16000 xg por 3 minutos, seguida pela transferência da coluna para um tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição à coluna, seguida por centrifugação a 16000 xg por um minuto e descarte da coluna. O DNA obtido foi armazenado a -10°C.

Os reagentes utilizados para a PCR, os primers e as condições da reação foram realizadas como descritas anteriormente por Brooks *et al.* (2006). A detecção de PCR de *C. piliforme* foi realizada em uma mistura de reação com 25  $\mu\text{L}$  que continha 200 nM de cada amostra de DNA, 500 nM cada de primer direto e reverso e um grânulo de PCR PuReTaq Ready-To-GO (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose 2,5% e foram visualizados por coloração com brometo de etídio. Os produtos de PCR do tamanho esperado (270 bp) foram extraído do

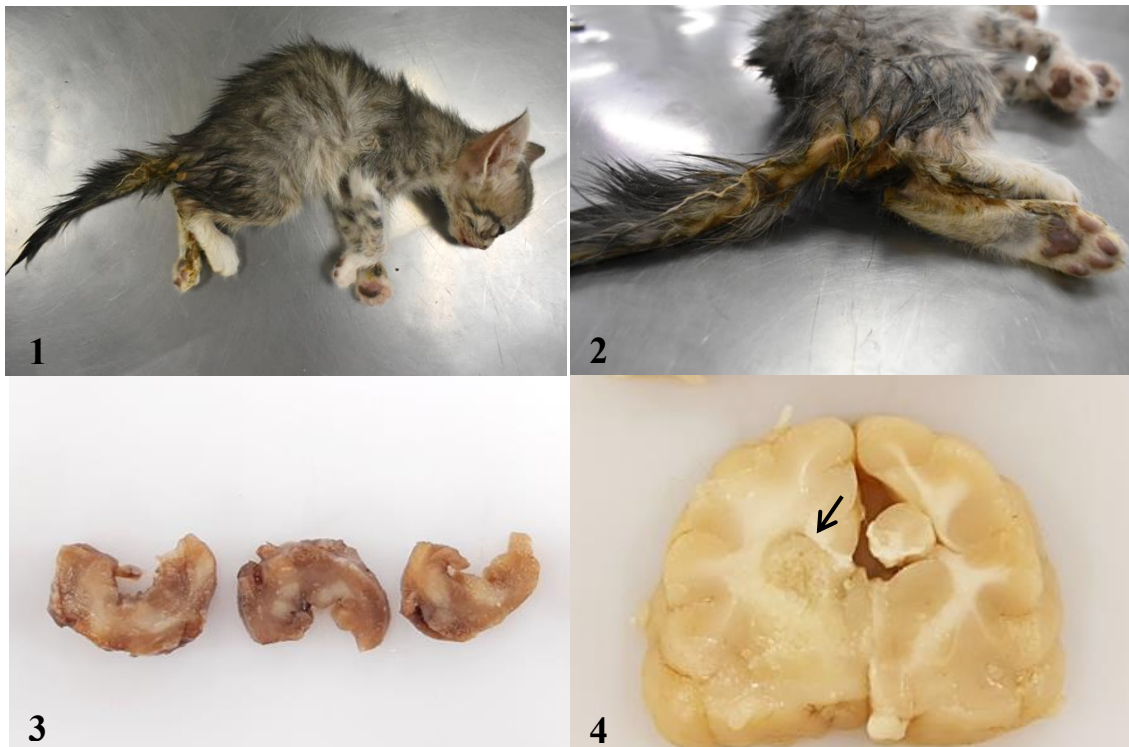
gel de agarose usando o QIAquick Gel Kit de extração de acordo com as instruções do fornecedor (Qiagen, Valencia, Califórnia).

O sequenciamento do amplicon da PCR para o gene 16S rRNA foi realizado de acordo com Lima *et al.*, (2016). Os produtos da PCR foram purificados usando um sistema de purificação de DNA Wizard PCR Preps (Promega) e o sequenciamento usando primer senso e antisenso. As reações de sequenciamento foram realizadas usando um kit de sequenciamento de ciclo BigDyeTerminator v3.1 (ThermoFisher) e executado em um analisador genético ABI 3730XL (ThermoFisher). As sequências do gene 16S rRNA foram comparadas com as cepas de referência no banco de dados GenBank do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) usando a ferramenta computacional BLASTN e a igualdade na sequência de nucleotídeos  $\geq 98\%$  foi usada como o critério para identificação de espécies.

#### **4. RESULTADOS**

No exame macroscópico, o felino 1 estava moderadamente emaciado, com mucosas oral e ocular moderadamente pálidas (Figura 1). Na região periocular, no plano nasal e adjacente a cavidade oral havia quantidade moderada de material mucoso amarronzado aderido ao pelame. No pelame da região perianal havia quantidade intensa de fezes líquidas marrom-esverdeadas (Figura 2). Na pele do membro pélvico direito, na região intertársica havia uma área de ulceração, focal, de 0,5 cm de diâmetro.

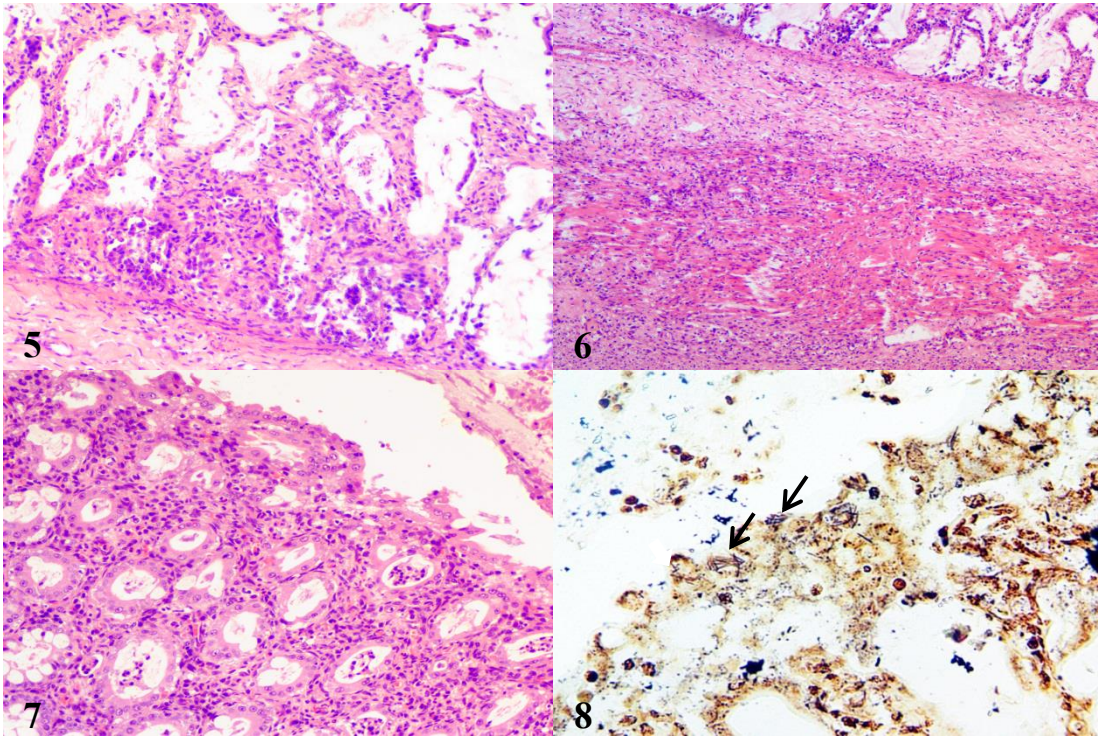
No coração, na região de ventrículo esquerdo e no ápice, havia nódulos branco-amarelados multifocais a coalescentes, discretamente elevados na superfície, que mediam entre 0,2 e 0,7 cm de diâmetro. Ao corte, aprofundavam no miocárdio (Figura 3). Por todo o trato gastrointestinal, o conteúdo estava líquido e amarronzado. No telencéfalo, na região de transição entre a substância cinzenta e substância branca do lobo frontal, havia uma área focalmente extensa amarelada, irregular, finamente vacuolizada, de aproximadamente 3,0 x 2,0 cm, que estendia até a região dos ventrículos laterais (Figura 4). Na substância cinzenta do lobo occipital direito havia uma área focal discretamente amarelada, de aproximadamente 2,0 x 1,0 cm.



**Figura 1.** Felino 1. Pobre condição corporal (emaciação moderada). **Figura 2.** Felino 1. Superfície corporal. Quantidade intensa de fezes líquidas marrom-esverdeadas aderidas ao pelame. **Figura 3.** Felino 1. Coração, corte transversal do tecido fixado em formol 10%. Áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas no miocárdio. **Figura 4.** Felino 1. Telencéfalo parietal, corte transversal do tecido fixado em formol 10%. Área focalmente extensa amarelada e finamente granular (seta) no parênquima entre a substância branca e cinzenta.

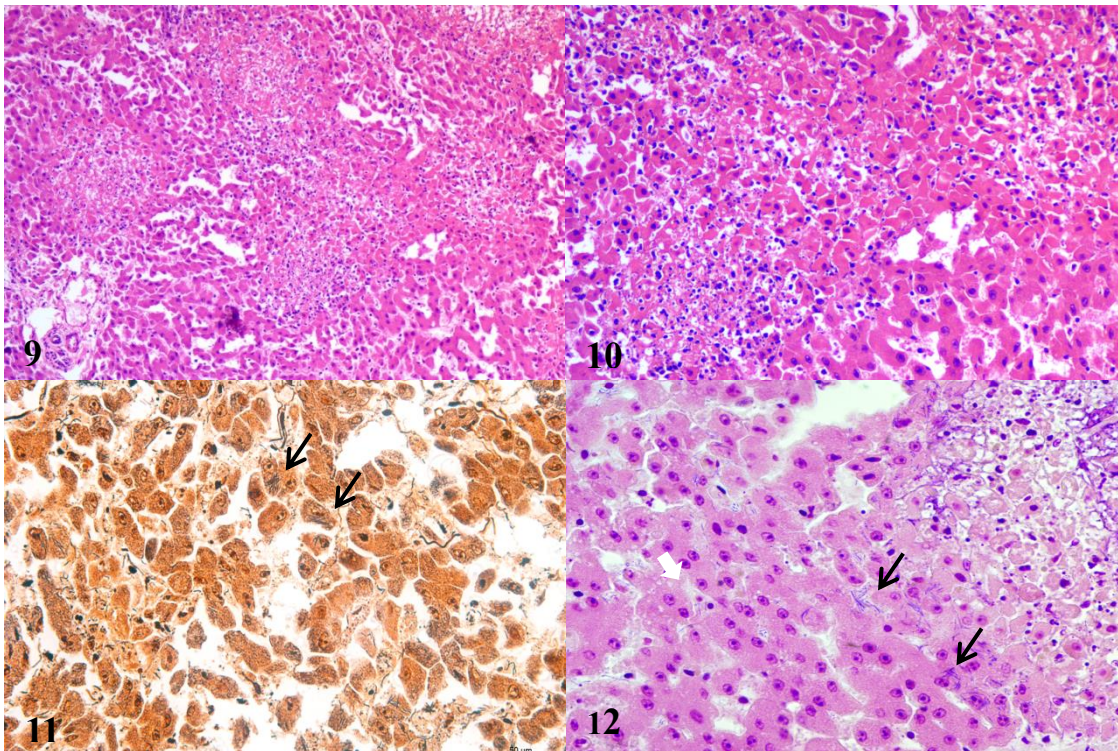
O felino 2 apresentava emaciação e sarcopenia acentuadas. As mucosas visíveis estavam moderadamente pálidas. Os linfonodos mesentéricos estavam discretamente aumentados de volume e pálidos. Os ventrículos laterais do cérebro estavam discretamente dilatados, com acúmulo moderado de líquido translúcido em seu interior e diminuição moderada da substância branca adjacente (hidrocefalia discreta).

O exame histopatológico do felino 1 revelou, na mucosa do ceco e cólon áreas focalmente extensas de perda do epitélio, com deposição intensa de material necrótico, associada a restos celulares, neutrófilos degenerados (Figura 5) e agregados de bacilos filamentosos intralesionais extra e intracelulares nos enterócitos, evidenciados pela marcação positiva em preto na coloração de *Warthin-Starry*. Na submucosa, camada muscular e serosa havia extensão do infiltrado inflamatório da mucosa, com neutrófilos degenerados, alguns linfócitos, plasmócitos e macrófagos, associado à perda e fragmentação de algumas fibras musculares e colágenas (necrose) (Figura 6). Na coloração de PAS e Giemsa não houve marcação para agentes infecciosos.



**Figura 5.** Felino 1. Intestino. Mucosa com necrose intensa, restos celulares e neutrófilos degenerados em região das criptas, HE, 200X. **Figura 6.** Felino 1. Intestino. Camada muscular com área focalmente extensa de infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos degenerados e alguns macrófagos e linfócitos, HE, 200X. **Figura 7.** Felino 2. Intestino. Lâmina própria e interior das criptas com infiltrado inflamatório neutrofílico moderado, HE, 200X. **Figura 8.** Felino 2. Intestino. Bacilos filamentosos (setas) no citoplasma de enterócitos superficiais, *Warthin-Starry*, 400X.

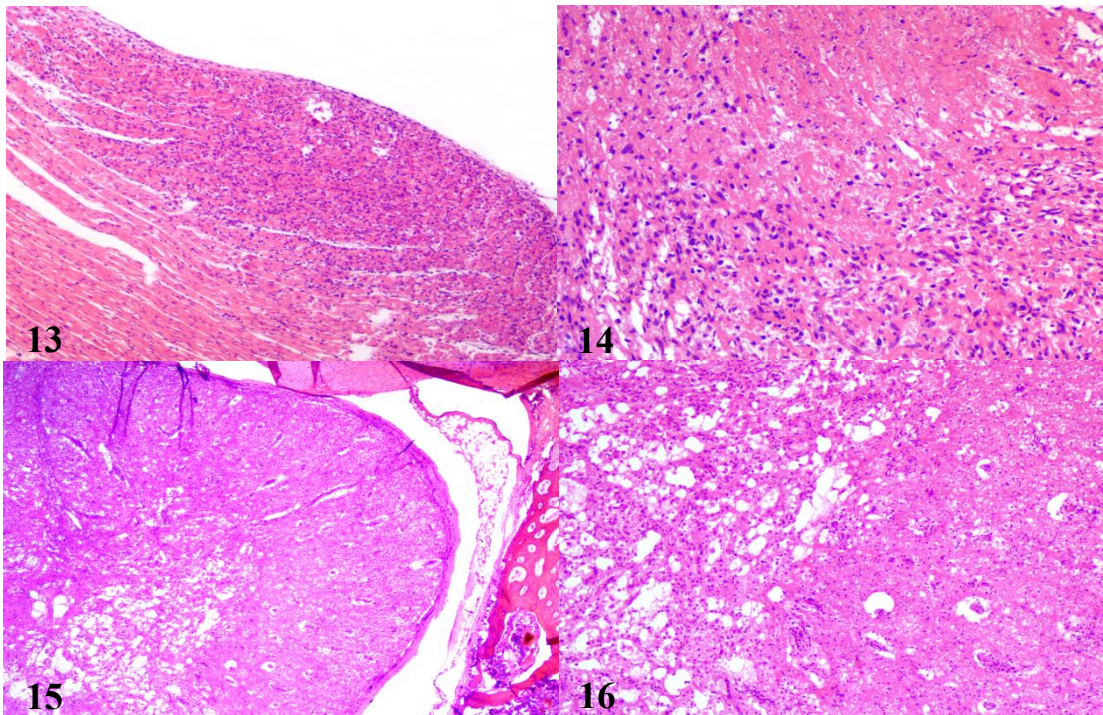
No fígado havia áreas aleatórias com perda e necrose de hepatócitos, caracterizadas por acúmulo de restos celulares e infiltrado inflamatório moderado, composto por neutrófilos degenerados e alguns linfócitos (Figuras 9 e 10). Os hepatócitos adjacentes estavam tumefeitos, com citoplasma hipereosinofílico e núcleos picnóticos (necrose). Na coloração de *Warthin-Starry* visualizou-se agregados de bacilos grandes e filamentosos, entremeados nas áreas de necrose e no citoplasma de alguns hepatócitos adjacentes, por vezes arranjados em feixes ou sobrepostos (Figura 11). Na coloração de Gram, os bacilos foram Gram-positivos (Figura 12). Na coloração de PAS e Giemsa não houve marcação.



**Figura 9.** Felino 1. Fígado. Parênquima com áreas multifocais de necrose e perda de hepatócitos associada a infiltrado inflamatório composto por neutrófilos degenerados e alguns linfócitos, HE, 100X. **Figura 10.** Felino 1. Fígado. Imagem aproximada evidenciando as áreas de necrose e o infiltrado inflamatório, HE, 200X. **Figura 11.** Felino 1. Fígado. Bacilos filamentosos (setas) e em feixes no citoplasma de hepatócitos, *Warthin-Starry*, 400X. **Figura 12.** Felino 1. Fígado. Bacilos filamentosos Gram-positivos (setas) no citoplasma de hepatócitos, Gram, 400X.

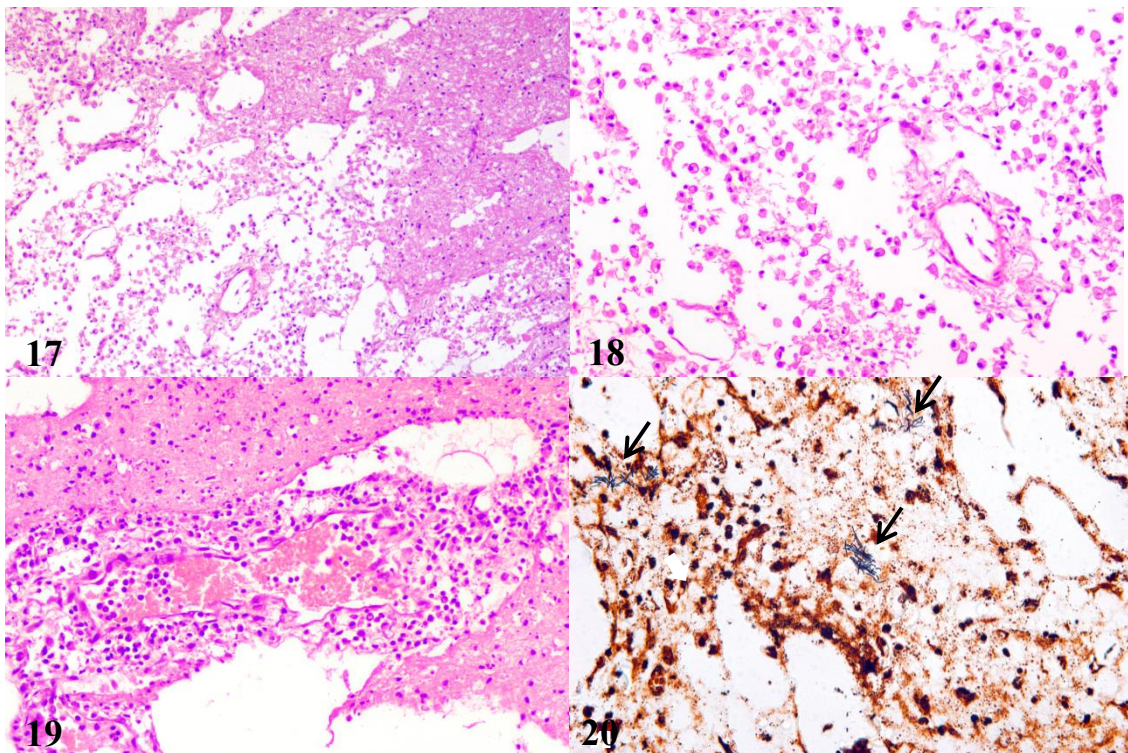
O miocárdio apresentava áreas focalmente extensas de perda de cardiomiócitos, com fragmentação do sarcoplasma, hipereosinofilia citoplasmática e picnose nuclear (necrose), associadas à deposição intensa de material necrótico e fibrina, com infiltrado inflamatório intenso, composto predominantemente por agregados de neutrófilos degenerados, alguns linfócitos e macrófagos (Figuras 13 e 14). Havia, também, áreas multifocais com algumas fibras musculares cariomegálicas (tentativa de regeneração), entremeadas por fibroplasia discreta. Nas colorações de Gram, PAS, Giemsa e *Warthin-Starry* não foram visualizados agentes infecciosos.





**Figura 13.** Felino 1. Coração. Endocárdio e miocárdio com área focalmente extensa de infiltrado inflamatório intenso, HE, 10X. **Figura 14.** Felino 1. Coração. Miocárdio com área focalmente extensa de necrose, margeada por infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, macrófagos e alguns linfócitos, HE, 200X. **Figura 15.** Felino 1. Medula espinhal. Substância cinzenta com área focalmente extensa de perda do neuroparênquima, HE, 40X. **Figura 16.** Felino 1. Medula espinhal. Infiltrado inflamatório neutrofílico intenso associado às áreas de necrose e alguns vasos com manguitos perivasculares, HE, 100X.

No encéfalo, áreas focalmente extensas de perda do neuroparênquima, com necrose neuronal foram observadas na substância cinzenta e branca do telencéfalo frontal, parietal e occipital (Figuras 17). Havia também áreas multifocais de necrose com formações cavitárias no telencéfalo frontal. Associado ao processo, havia quantidade intensa de células Gitter (Figura 18) e alguns gemistócitos, entremeados por infiltrado inflamatório intenso composto predominantemente por neutrófilos degenerados, alguns linfócitos e plasmócitos. Nos espaços perivasculares de vasos nas áreas de necrose havia infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, alguns macrófagos e neutrófilos (manguitos perivasculares) (Figura 19). Havia extensão do processo inflamatório para as leptomeninges, composto predominantemente por neutrófilos degenerados, alguns linfócitos e plasmócitos. Na substância branca adjacente havia áreas multifocais de vacuolização moderada dos processos axonais. Na coloração de *Warthin-Starry* visualizou-se alguns agregados de bacilos grandes, entremeados nas áreas de necrose, por vezes arranjados em feixes ou sobrepostos (Figura 20). Nas colorações de PAS, Gram e Giemsa não houve marcação.

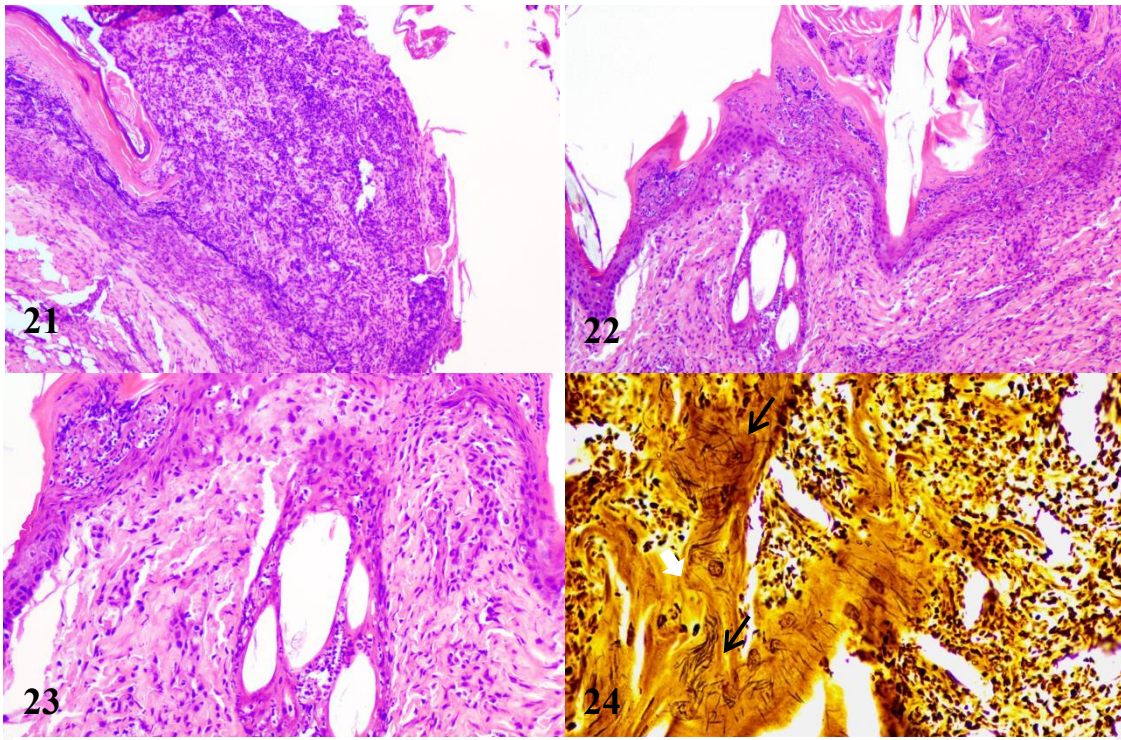


**Figura 17.** Felino 1. Telencéfalo. Área focalmente extensa de necrose com perda do neuroparênquima e quantidade intensa de células Gitter, HE, 100X. **Figura 18.** Felino 1. Telencéfalo. Imagem aproximada evidenciando as células Gitter e perda do neuroparênquima, HE, 200X. **Figura 19.** Felino 1. Telencéfalo. Espaço perivascular com infiltrado inflamatório composto por neutrófilos degenerados, linfócitos e plasmócitos, HE, 200X. **Figura 20.** Felino 1. Telencéfalo. Bacilos filamentosos (setas) dispostos em feixes e sobrepostos nas áreas de necrose, *Warthin-Starry*, 400X.

Na substância cinzenta da medula espinhal da região lombar havia áreas multifocais a coalescentes de perda do neuroparênquima (Figura 15), com necrose neuronal, alguns gemistócitos e infiltrado inflamatório intenso composto por neutrófilos degenerados, alguns linfócitos, plasmócitos e macrófagos que se estendem para áreas multifocais da substância branca adjacente (Figura 16). Havia, também na substância branca, áreas multifocais com formação de alguns esferoides axonais (degeneração axonal) e câmaras de digestão. Nas colorações especiais de Gram e *Warthin-Starry* não houve marcação.

Na pele do membro pélvico havia dermatite ulcerativa e neutrofílica superficial, focalmente extensa moderada, associada à deposição intensa de material necrótico, restos celulares e neutrófilos degenerados (crostas) (Figura 21) que se estendem até a derme superficial e parede dos folículos pilosos (foliculite mural discreta). Na epiderme adjacente havia áreas multifocais com agregados de neutrófilos degenerados intraepiteliais (pústulas) (Figura 23) e, na camada córnea, hiperqueratose orqueratótica de lamelar a compacta moderada (Figura 22). A coloração de *Warthin-Starry* evidenciou, no citoplasma de queratinócitos da epiderme, na camada córnea e no epitélio de folículos pilosos, bacilos grandes e filamentosos

em cor preta (Figura 24). Na coloração de Gram havia nas áreas de ulceração agregados de cocos Gram-positivos superficiais.



**Figura 21.** Felino 1. Pele pilosa. Epiderme com área focalmente extensa de ulceração e formação de crosta, HE, 40X. **Figura 22.** Felino 1. Pele pilosa. Epiderme com pústulas intraepiteliais, hiperqueratose compacta moderada e infiltrado inflamatório neutrofilico na derme superficial e folículos pilosos, HE, 100X. **Figura 23.** Felino 1. Pele pilosa. Imagem aproximada evidenciando a pústula e o infiltrado inflamatório na derme superficial e parede dos folículos pilosos, HE, 200X. **Figura 24.** Felino 1. Pele pilosa. Bacilos filamentosos (setas) dispostos em feixes e sobrepostos no citoplasma de queratinócitos da epiderme adjacente a uma área de ulceração, *Warthin-Starry*, 400X.

No baço havia depleção linfoide difusa e intensa. No linfonodo mesentérico havia depleção linfoide moderada e histiocitose moderada. Nos pulmões havia áreas multifocais de atelectasia, edema discreto e hematopoese extramedular.

No felino 2 evidenciou-se no intestino grosso, entremeado nas criptas, na lâmina própria e também no lúmen intestinal e de criptas, infiltrado inflamatório difuso contendo neutrófilos em quantidade moderada (Figura 7). No citoplasma de células epiteliais superficiais na lâmina própria havia áreas multifocais com estruturas bacterianas bacilares grandes, por vezes sobrepostas e fracamente coradas. Na coloração de *Warthin-Starry* visualizou-se melhor as bactérias em cor preta (Figura 8). No fígado e coração não foram visualizados agentes.

No miocárdio havia uma área focal de miocardite neutrofílica discreta. No linfonodo mesentérico havia plasmocitose e histiocitose moderadas. No intestino delgado evidenciou-se

áreas multifocais com achatamento discreto das extremidades de vilosidades. O pulmão e os rins estavam moderadamente congestionados.

No felino 1, as amostras congeladas de intestino grosso, coração e fígado foram positivas para *C. piliforme* pela técnica de PCR. O DNA extraído do bloco parafinizado do encéfalo e pele também foram positivos para *C. piliforme* pela mesma técnica. Já a amostra da medula espinhal foi negativa para o agente. No felino 2, o DNA extraído do bloco parafinizado do intestino grosso foi negativo para *C. piliforme*. Realizou-se o sequenciamento dos produtos amplificados pela PCR do felino 1 e confirmou-se a amplificação do segmento do gene 16S rRNA, com o BLAST do sequenciamento da amostra do encéfalo com identidade de 100% para o *C. piliforme*.

## 5. DISCUSSÃO

No felino 1, os achados macroscópicos e microscópicos associados à presença do agente visualizado nas colorações especiais de Gram e *Warthin-Starry* e a positividade na PCR dos tecidos afetados confirmam o diagnóstico de DT, sendo este o primeiro relato da doença com apresentação de encefalite em felinos e de dermatite em qualquer espécie animal. No felino 2, embora houvesse lesões entéricas com visualização do agente na coloração de *Warthin-Starry*, a PCR foi negativa para *C. piliforme*. É provável que o DNA do agente tenha sido degradado com a fixação em formol e o processamento histológico (GARCÍA *et al.*, 2021).

A DT tem duas apresentações clínicas clássicas, bem reconhecidas na literatura: a forma aguda que afeta animais recém-desmamados ou com a imunidade comprometida e a forma subclínica, que acomete principalmente animais adultos e pode evoluir para a forma aguda em circunstâncias ambientais adversas (RILEY *et al.*, 1992). A forma clínica da doença é confirmada em ambos os casos, pois os animais envolvidos eram filhotes e apresentavam algumas alterações histológicas que indicavam imunossupressão, como a depleção linfoide.

A depleção linfoide em animais acometidos com a DT sugere infecções virais como causas mais prováveis de imunossupressão e conseqüentemente, infecção secundária pelo *C. piliforme* (BENNETT, HUXTABLE e LOVE, 1977; GARCÍA *et al.*, 2021). No felino 1, a depleção linfoide intensa no baço e linfonodo mesentérico pode ser atribuída a infecção viral. No entanto, não foram encontradas outras lesões histológicas que sugerissem um agente específico. Apesar do herpesvírus felino tipo 1 não causar imunossupressão, a infecção pelo agente atua como um fator de estresse e deixa os animais infectados susceptíveis a outros patógenos, entre eles, *C. piliforme* (NETO *et al.*, 2015). Pelo histórico clínico do felino 1, os sinais clínicos de secreção nasal e oral associada à mesma apresentação clínica em outro filhote da ninhada e na mãe, com resposta clínica positiva ao tratamento instituído para rinotraqueíte, sugerem infecção por este agente, mesmo que, no filhote necropsiado, não houvessem lesões histológicas na cavidade nasal, traqueia ou pulmões que confirmassem esta suspeita.

A origem da fonte de infecção nestes felinos não pôde ser determinada. É provável que os esporos da bactéria tenham sido introduzidos no ambiente por contaminação de materiais com fezes de roedores ou por eliminação de outros felinos com infecções entéricas subclínicas (BENNETT, HUXTABLE e LOVE, 1977). A apresentação clínica semelhante da doença em outros felinos que conviviam no mesmo ambiente do felino 1 sugerem o papel de animais doentes na patogênese de transmissão da enfermidade.

No entanto, o diagnóstico definitivo nos outros animais não pode ser realizado, uma vez que mesmo com a PCR positiva das fezes, este resultado pode ser um falso-positivo ou ser atribuído a outros clostrídios, além de ser necessária a associação com lesões histológicas pelo agente nos tecidos (FELDMAN *et al.*, 2006).

No felino 1, as lesões histológicas intestinais eram severas e se estendiam até a camada muscular, além de envolver outros órgãos como coração, medula espinhal, fígado e encéfalo, enquanto que no felino 2 eram discretas e restritas a mucosa e não havia acometimento de outros órgãos. Esta diferença na intensidade de lesões pode estar relacionada a diferentes graus de virulência do agente (RILEY *et al.*, 1992).

Embora muitos sinais clínicos da doença sejam inespecíficos, alguns animais apresentam sinais neurológicos associados a quadros de encefalopatia hepática (GARCÍA *et al.*, 2021). Em outros casos, na ausência de lesões hepáticas, especula-se que os sinais neurológicos são causados por absorção de toxinas da bactéria ou absorção excessiva de amônia no cólon (WILKIE e BARKER, 1985). Os sinais clínicos de tremores e opistótono no felino 1 são relacionados ao quadro de encefalite e, embora as lesões hepáticas fossem intensas, não havia alterações de encefalopatia hepática no sistema nervoso central.

No experimento realizado por Rights, Jackson e Smadel (1946) houve reprodução da forma neurológica da doença em camundongos por meio da inoculação intracraniana do agente. Esses animais desenvolveram, em poucas horas, sinais de irritação, paralisia de um ou mais membros, convulsões e morte. Na necropsia não havia alterações macroscópicas no encéfalo desses animais. No felino com encefalite, o quadro de paralisia dos membros pélvicos foi atribuído à mielite na região lombar devido à infecção pelo *C. piliforme*, e as alterações macroscópicas encontradas no encéfalo, embora discretas, foram, pela primeira vez, observadas em animais domésticos ou silvestres.

A infecção espontânea do sistema nervoso central na DT é rara, e pode acontecer em formas incomuns ou hiperagudas da doença, uma vez que os animais morrem pela gravidade das lesões hepáticas ou cardíacas, antes de desenvolver lesões encefálicas (YOSHIDA *et al.*, 2013). No presente relato, embora os sinais neurológicos precedessem os sinais clínicos entéricos e o tempo de evolução clínico até o óbito foi extremamente rápido, havia também lesões hepáticas e cardíacas graves o que sugere uma forma incomum da doença que poderia justificar a apresentação de encefalite neste caso.

Em animais, não há relatos de *C. piliforme* causando lesões cutâneas. Entretanto, em humanos há um relato da doença apenas com a apresentação cutânea, sem envolvimento entérico. As lesões histológicas eram caracterizadas por dermatite ulcerativa, com hiperqueratose, crostas e pústulas intraepiteliais, com visualização da bactéria no interior de queratinócitos da epiderme (SMITH *et al.*, 1996). No felino 1, a lesão ulcerativa no membro, histologicamente, era muito semelhante ao relato no humano e foi associada a presença do agente no interior dos queratinócitos da epiderme, na superfície da camada córnea e no epitélio dos folículos pilosos.

Estes achados histológicos associados à presença da bactéria intracelular nas áreas de lesão e confirmação pela PCR indicam a capacidade da bactéria em infectar a pele de felinos. No entanto, não foi possível determinar a patogenia da lesão, se havia alguma perda da integridade da epiderme que predispôs a entrada do agente, considerando o fato que o animal estava com paralisia nos membros pélvicos e lesões por abrasão na tentativa de locomoção podem ocorrer, ou a bactéria conseguiu escapar dos mecanismos de defesa e da resposta imunológica tegumentar na pele íntegra. No relato de Smith *et al.* (1996) atribuiu-se como provável fonte de infecção da doença o contato numa casa infestada por roedores. Provavelmente, no felino 1, assim como no relato em humano a via de infecção ambiental esteja envolvida na forma cutânea da doença. Outro fator importante é a mesma apresentação de lesões cutâneas ulcerativas nos demais felinos que poderia sugerir envolvimento do agente, cuja confirmação seria necessária por avaliação histopatológica, colorações histoquímicas e teste molecular de PCR.

Com relação aos diagnósticos diferenciais de colite e diarreia em felinos, além do *C. piliforme* diversos outros agentes como vírus, bactérias, fungos e protozoários são incluídos. Dentre eles: vírus da panleucopenia felina, vírus da peritonite infecciosa felina, *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *Anaerobiosporillum* sp., *Aspergillus* spp., *Giardia* spp. *Entamoeba histolytica* e *Tritrichomonas foetus* (UZAL, PLATTNER e HOSTETTER, 2016).

Na panleucopenia felina as lesões histológicas são caracterizadas por necrose intensa de enterócitos na região das criptas do intestino delgado, com atenuação ou perda do epitélio da mucosa e visualização de corpúsculo de inclusão intranuclear em alguns casos, adjacente às áreas de necrose pode haver hiperplasia do epitélio com tentativas de regeneração de criptas em casos mais brandos (KRUININGEN, RYAN e SHINDEL, 1983). Além disso, depleção linfóide nas placas de Peyer e em órgãos linfóides como medula óssea e baço são frequentes, devido a

isto, infecções secundárias por agentes fúngicos como *Aspergillus* spp. e *Candida* spp, ou agentes bacterianos são comuns em felinos (UZAL, PLATTNER e HOSTETTER, 2016).

Já a salmonelose, como doença primária em pequenos animais, é menos comum. A *Salmonella* Typhimurium é mais comumente associada a surtos de doenças em felinos, as lesões histológicas são caracterizadas por colite transmural fibrino-hemorrágica e ulcerativa, com trombose (UZAL, PLATTNER e HOSTETTER, 2016). Outro agente bacteriano causador de ileíte e colite em felinos é o *Anaerobiospirillum* sp., esta bactéria é gram-negativa, espiralada e móvel. As lesões histológicas são caracterizadas por dilatação de criptas, com esfoliação de células epiteliais para o lúmen e infiltrado inflamatório neutrofílico, associado à presença da bactéria no interior das criptas ou de células caliciformes, este agente é melhor visualizado em colorações por impregnação pela prata ou Giemsa (COCK *et al.*, 2004).

No grupo dos protozoários, *Cystoisospora* spp. é frequentemente associado a quadros de diarreias e enterite em felinos, no entanto raramente fatal, os merozoítos e gametócitos desenvolvem-se no epitélio do intestino delgado, os oocistos são grandes e medem aproximadamente 40 µm de diâmetro, ocasionalmente há envolvimento do intestino grosso (UZAL, PLATTNER e HOSTETTER, 2016). Infecções por *Giardia* spp. geralmente envolvem animais jovens e imunossuprimidos e se caracterizam por quadros de diarreias crônicas e intermitentes que podem durar meses (GUEDES *et al.*, 2016) que difere das infecções por *C. piliforme* que possuem quadros agudos de diarreia.

Outro agente infeccioso causador de diarreias crônicas em felinos jovens é o *Tritrichomonas foetus*, as lesões histológicas são caracterizadas por colite linfoplasmocitária de leve a moderada, com hiperplasia e hipertrofia de criptas, diminuição de células caliciformes, associada à presença dos trofozoítos na superfície do epitélio e nas criptas do ceco e cólon (YAO e KÖSTER, 2015).

Já infecções por *Entamoeba histolytica* são caracterizadas por colite ulcerativa e necrotizante intensa, com infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos e linfócitos, visualização de trofozoítos intralesionais que medem entre 16 a 20 x 40 µm de diâmetro e possuem marcação citoplasmática positiva na coloração de PAS (SHIMADA *et al.*, 1992).



## 6. CONCLUSÃO

No felino 1 confirmou-se o diagnóstico definitivo da doença de Tyzzer com a apresentação clássica de lesões no intestino, fígado e coração, bem como a forma atípica com envolvimento do sistema nervoso central, sendo esta a primeira vez relatada na espécie. Além disso, a lesão cutânea indica a capacidade do *C. piliforme* em infectar a pele de felinos. Embora até o momento não haja outros relatos, deve-se incluir o agente nos diagnósticos diferenciais de lesões cutâneas ulcerativas, sobretudo, em animais já confirmados com a forma clássica da doença. Maiores estudos são necessários para estabelecer a patogenia e fatores predisponentes para esta apresentação.

No felino 2, mesmo que não houvesse a confirmação do diagnóstico definitivo pela PCR, as lesões entéricas associadas a presença da bactéria são fortemente sugestivas da doença. Com isso, destaca-se a importância de incluir a doença de Tyzzer nos diagnósticos diferenciais de enterite em felinos. Além disso, neste relato são necessários mais estudos com outros exames complementares para estabelecer ou excluir a possibilidade de coinfeção viral nestes felinos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A. M.; GANAWAY, J. R.; MOORE, T. D.; KINARD, R. F. Tyzzer's Disease Syndrome in laboratory rabbits. **The American journal of pathology**, v. 46, n. 5, p. 859, 1965.
- ANDEL, R. A. V.; HOOK, R. R.; FRANKLIN, C. L.; BESCH-WILLIFORD, C. L.; ROOIJEN, N. VAN; RILEY, L. K. Effects of neutrophil, natural killer cell, and macrophage depletion on murine *Clostridium piliforme* infection. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2725–2731, 1997.
- ARTUKOVIĆ, B.; GRABAREVIĆ, Ž.; KURILJ, A. G.; BECK, A.; SHIROTA, K.; SAKURADA, Y.; KAWAMURA, S.; BŽAJA, P. Clinical and pathological findings of an outbreak of Tyzzer's disease in a rabbit colony in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 6, p. 761–770, 2010.
- BARNES, K. H.; PIRIPI, S. A.; LÖHR, C. V. Pathology in practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 6, p. 765–767, 2013.
- BENNETT, A. M.; HUXTABLE, C. R.; LOVE, D. N. Tyzzer's disease in cats experimentally infected with feline leukaemia virus. **Veterinary Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 49–56, 1977.
- BORCHERS, A.; MAGDESIAN, K. G.; HALLAND, S.; PUSTERLA, N.; WILSON, W. D. Successful treatment and polymerase chain reaction (PCR) confirmation of Tyzzer's disease in a foal and clinical and pathologic characteristics of 6 additional foals (1986-2005). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 5, p. 1212–1218, 2006.
- BROOKS, J. W.; WHARY, M. T.; HATTEL, A. L.; SHAW, D. P.; GE, Z.; FOX, J. G.; POPPENG, R. H. *Clostridium piliforme* infection in two farm-raised white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*) and association with copper toxicosis. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 5, p. 765–768, 2006.
- COCK, H. E. V.; MARKS, S. L.; STACY, B. A.; ZABKA, T. S.; BURKITT, J.; LU, G.; STEFFEN, D. J.; DUHAMEL, G. E. Ileocolitis associated with *Anaerobiospirillum* in cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2752–2758, 2004.
- CULLEN, J. M.; STALKER, M. J. Liver and Biliary System. In: JUBB; KENNEDY; PALMER'S. **Pathology of Domestic Animals**. St. Louis: Elsevier, 6 ed. v. 2, cap. 2, p. 317. 2016.
- DUNCAN, A. J.; CARMAN, R. J.; OLSEN, G. J.; WILSON, K. H. Assignment of the agent of Tyzzer's disease to *Clostridium piliforme* comb. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 2, p. 314–318, 1993.
- FELDMAN, S. H.; KIAVAND, A.; SEIDELIN, M.; REISKE, H. R. Ribosomal RNA sequences of *Clostridium piliforme* isolated from rodent and rabbit: Re-examining the phylogeny of the Tyzzer's disease agent and development of a diagnostic polymerase chain reaction assay. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 65–73, 2006.
- GARCÍA, J. A.; NAVARRO, M. A.; FRESNEDA, K.; UZAL, F. A. *Clostridium piliforme* infection (Tyzzer disease) in horses: retrospective study of 25 cases and literature review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2021.

GREAR, D. A.; LANKTON, J. S.; ZALESKI, S.; WITT, M.; LORCH, J. M. Mortality due to tyzzer's disease of muskrats (*Ondatra zibethicus*) in northern Ohio, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 55, n. 4, p. 982–985, 2019.

GUEDES, R. M. C.; BROWN, C. C.; SEQUEIRA, J. L.; REIS, J. L. J. Sistema Digestório. In: LIMA, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Roca, 2 ed., cap. 3, p. 287, 2016.

HEADLEY, S. A.; SHIROTA, K.; BABA, T.; IKEDA, T.; SUKURA, A. Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 1, p. 151–154, 2009.

HUNTER, B. Eradication of Tyzzer's disease in a colony of barrier-maintained mice. **Laboratory animals**, v. 5, n. 2, p. 271–276, 1971.

IKEGAMI, T.; SHIROTA, K.; GOTO, K.; TAKAKURA, A.; ITOH, T.; KAWAMURA, S.; UNE, Y.; NOMURA, Y.; FUJIWARA, K. Enterocolitis associated with dual infection by *Clostridium piliforme* and feline panleukopenia virus in three kittens. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 6, p. 613–615, 1999.

IKEGAMI, T.; SHIROTA, K.; UNE, Y.; NOMURA, Y.; WADA, Y.; GOTO, K.; TAKAKURA, A.; ITOH, T.; FUJIWARA, K. Naturally Occurring Tyzzer's Disease in a Calf. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 3, p. 253–255, 1999.

KRUININGEN, H. J. V.; RYAN, M. J.; SHINDEL, N. M. The classification of feline colitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 93, n. 2, p. 275–294, 1983.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw Hill; 1968.

LIMA, C. O. G. X.; ROCHA, V. M. DA; FERREIRA, E. DE O.; FILHO, J. S.; SERRADAS, L. R.; SILVA, R. O. S.; LOBATO, F. C. F.; DOMINGUES, R. M. C. P. *Clostridium baratii*: a rare case of pneumonia associated with an Alzheimer patient in Rio de Janeiro, Brazil. **JMM Case Reports**, v. 3, n. 4, p. 1–4, 2016.

METE, A.; EIGENHEER, A.; GOODNIGHT, A.; WOODS, L. *Clostridium piliforme* encephalitis in a weaver bird (*ploceus castaneiceps*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1240–1242, 2011.

METE, A.; ROGERS, K. H.; WOODS, L. Tyzzer's disease in free-ranging passerine birds in California, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 4, p. 938–941, 2017.

NAVARRO, M. A.; UZAL, F. A. Pathobiology and diagnosis of clostridial hepatitis in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 2, p. 192–202, 2020.

NETO, R. T.; UZAL, F. A.; HODZIC, E.; PERSIANI, M.; JOLISSAINT, S.; ALCARAZ, A.; CARVALLO, F. R. Coinfection with *Clostridium piliforme* and Felid herpesvirus 1 in a kitten. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 4, p. 547–551, 2015.

PERCY, D. H.; BARTHOLD, S. W. **Pathology of laboratory rodents and rabbits**. Iowa: Blackwell, 3 ed., p. 3-215. 2007.

POONACHA, K. B. Naturally occurring Tyzzer's disease in a serval (*Felis capensis*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 1, p. 82–84, 1997.

- PRITT, S.; HENDERSON, K. S.; SHEK, W. R. Evaluation of available diagnostic methods for *Clostridium piliforme* in laboratory rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Laboratory Animals**, v. 44, n. 1, p. 14–19, 2010.
- RIGHTS, F. L.; JACKSON, E. B.; SMADEL, J. E. Observations on Tyzzer's disease of mice. **Federation proceedings**, v. 5, n. 1, p. 226, 1946.
- RILEY, L. K.; CAFFREY, C. J.; MUSILLE, V. S.; MEYER, J. K. Cytotoxicity of *Bacillus piliformis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 77–80, 1992.
- SHIMADA, A.; MURAKI, Y.; AWAKURA, T.; UMEMURA, T.; SANEKATA, T.; KUROKI, T.; ISHIHARA, M. Necrotic colitis associated with *Entamoeba histolytica* infection in a cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, n. 2, p. 195–199, 1992.
- SIMPSON, V. R.; HARGREAVES, J.; BIRTLES, R. J.; MARSDEN, H.; WILLIAMS, D. L. Tyzzer's disease in a Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Scotland. **Veterinary Record**, v. 163, n. 18, p. 539–543, 2008.
- SMITH, K. J.; SKELTON, H. G.; HILYARD, E. J.; HADFIELD, T.; MOELLER, R. S.; TUUR, S.; DECKER, C.; WAGNER, K. F.; ANGRITT, P. *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: Confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 343–348, 1996.
- STANNARD, H. J.; TULK, M. L.; OLD, J. M. Dead mouse hopping: Tyzzer's disease in spinifex hopping-mice (*Notomys alexis*). **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 201–207, 2017.
- SWERCZEK, T. W. Tyzzer's disease in foals: Retrospective studies from 1969 to 2010. **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, n. 9, p. 876–880, 2013.
- TYZZER, E. E. A fatal disease of the Japanese waltzing mouse caused by a spore-bearing bacillus (*Bacillus piliformis*, N. SP.). **The Journal of medical research**, v. 37, n. 2, p. 307, 1917.
- UZAL, F. A.; PLATTNER, B. L.; HOSTETTER, J. M. Alimentary System. In: JUBB; KENNEDY; PALMER'S. *Pathology of Domestic Animals*. St. Louis: Elsevier, 6 ed. v. 2, cap. 1, p. 98-243. 2016.
- WILKIE, J. S. N.; BARKER, I. K. Colitis due to *Bacillus piliformis* in two kittens. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 6, p. 649–652, 1985.
- YAO, C.; KÖSTER, L. S. *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 1–16, 2015.
- YOSHIDA, K.; NIBE, K.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, T.; KOMATSU, M.; OGAWA, H.; SHIROTA, K.; CHAMBERS, J. K.; NAKAYAMA, H.; UCHIDA, K. Spontaneous tyzzer's disease with the central nerve involvement in a newborn common marmoset. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 8, p. 1119–1121, 2013.