

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA ANIMAL

TAYSE DOMINGUES DE SOUZA

Mortalidade fetal e neonatal canina

Tese apresentada como requisito para conclusão
do curso de Doutorado em Ciência Animal, área
de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiane Alves da
Paixão
Co-orientadora: Dra. Juliana Pinto da Silva Mol

BELO HORIZONTE

2017

S729m Souza, Tayse Domingues de, 1972-
Mortalidade fetal e neonatal canina / Tayse Domingues de Souza. – 2017.
140 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Co-orientadoras: Tatiane Alves da Paixão, Juliana Pinto da Silva Mol

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Cão – Mortalidade – Teses. 2. Morte fetal – Teses. 3. Morte neonatal – Teses.
4. Patologia veterinária – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Paixão, Tatiane Alves da.
III. Mol, Juliana Pinto da Silva. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. V. Título.

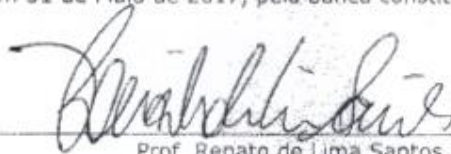
CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

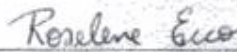
TAYSE DOMINGUES DE SOUZA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovada em 31 de Maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:



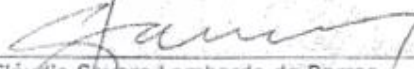
Prof. Renato de Lima Santos
Presidente - Orientador



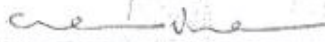
Profª. Roselene Ecco
Escola de Veterinária - UFMG



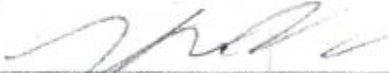
Prof. Marcelo Rezende Luz
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Cláudio Severo Lombardo de Barros
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS



Profª. Camilla Infantsi Vannucchi
Universidade de São Paulo - USP



Prof. Guilherme Ribeiro Valle
Pontifícia Universidade Católica - PUC MINAS

Aos cãezinhos que morreram no período perinatal e nunca tiveram a chance de abanar suas caudas e brincar, eu dedico esta Tese.

Agradecimentos

A Deus, por me proporcionar caminhos tão floridos e tão íngrimes, para que eu possa subir apreciando a paisagem!

À minha mãe, Vera Lúcia, a infinita fonte de luz em minha vida!

À minha família pela imensa compreensão, paciência, cooperação, e por, de certa forma, terem doado 4 anos de nossas vidas a esta empreitada! Ao meu filho, Ian, que tinha apenas 11 anos quando tudo isso começou, e hoje, já um rapaz, não vê a hora de ter a mãe dele de volta! Em especial ao meu marido, Markus, por ser o maior e melhor companheiro de todos os tempos!

À Mayra, anja, com sua infinita paciência e cooperação, tolerando minhas ausências, e que, brilhantemente, foi fundamental para o desenvolvimento da imuno-histoquímica para detecção do *Toxocara canis*.

Ao meu orientador, Professor Dr. Renato de Lima Santos, por me receber em seu grupo e no Laboratório de Patologia Molecular da UFMG, pelo aprendizado transformador, por sua paciência e compreensão desmedidas, por me ajudar a realizar o sonho de desvendar as doenças dos filhotes de cães, e por me ensinar, de forma lúdica, como é importante ter foco!

À minha co-orientadora, Professora Dra. Tatiane Alves da Paixão, que me acolheu com tanto carinho e atenção na UFMG, que me ajudou tanto nos momentos mais difíceis, e foi absolutamente fundamental para que tudo se realizasse.

À querida co-orientadora, Dra. Juliana Pinto da Silva Mol, que tanto me ensinou nesses anos todos, também com paciência e compreensão infinitas, e que foi essencial para a execução deste trabalho.

À querida Tatiane Furtado de Carvalho, por sua confiança, por sua amizade, por me ajudar sempre no que precisei, por me ensinar tanto, e por sua arte com a imuno-histoquímica para detecção de *Brucella* sp.

Ao Professor e amigo Dr. Marcelo Rezende Luz, sempre um grande incentivador de meu trabalho com neonatos caninos.

Ao Professor e amigo Dr. Fernando Luiz Tobias, que me apoiou desde o início e foi essencial para a realização das análises microbiológicas.

À querida Médica Veterinária Jeanne Saraiva da Paz, fundamental na supervisão direta das análises bacteriológicas, gratidão eterna por nos acolher e orientar nas análises microbiológicas.

À Vanda, nossa artista, técnica do Laboratório de Patologia Animal da UVV, sempre pronta a fazer mais uma lâmina perfeita! Obrigada pelos mais de 2.000 cortes e colorações! Gratidão!

Aos ICs, gratidão eterna a todos vocês que dedicaram um pouco do seu tempo para contribuir para a realização deste trabalho, mas, especialmente àqueles que dedicaram parte de suas vidas a esta pesquisa: João Vítor Menezes Lopes, Lucas dos Reis de Souza, Monique Ferreira, Luiza Raasch Manske, Andressa Borges, Larissa Diefenthaler de Souza, Kessler Was, Ygor Machado, Ana Carolina Tachetto Pinto, Carolina Melo, Jéssica Chaar, e Amanda Borlot, e que foram fundamentais para a realização deste estudo! Obrigada pela ajuda! Espero que o projeto tenha plantado a semente da ciência em seus corações.

A Mariah Fernanda Darós Malaquias, Maylla Gava, Isabela Hardt, Ayisa Rodrigues de Oliveira, Brunno Sossai, Christopher Loureiro, Juliana Stelzer Zardo e Mariana Anechini, que participaram comigo desta jornada da neonatologia ao longo de tantos anos! Foi uma honra te-los ao meu lado nesta caminhada.

Ao amigo e mentor Alexandre Cavalcante de Carvalho, meu mestre querido na arte de criar cães.

À amiga que ganhei nessa passagem por BH, Michelle Gabardo, que me acolheu em sua casa e em seu coração.

Aos colegas de pós, Amanda Sena Reis, Cíntia, Sato, Amanda Gabrielle, Talita, aos colegas do Laboratório de Patologia Molecular, e tantos outros que encontrei nesta jornada.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que doaram seus conhecimentos para meu crescimento profissional e pessoal. Em especial à Professora Roselene Ecco, pelo carinho e pelos ensinamentos preciosos em Patologia Veterinária.

Aos colegas e alunos da UVV, pela compreensão e suporte em todos os momentos.

À Universidade Vila Velha, por possibilitar a realização das necropsias, exames histopatológicos e microbiológicos em suas instalações, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da imunohistoquímica para *Toxocara*, pelo suporte financeiro aos bolsistas de iniciação científica, e pelo apoio e compreensão com minhas ausências.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por me acolher, por me proporcionar esta transformadora experiência e por concretizar este belíssimo trabalho.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES, pelo financiamento dos custos deste projeto.

Aos criadores de cães, que doaram seus filhotes para o estudo, sempre em momentos de tanta angústia.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que esta pesquisa se concretizasse.

Minha gratidão eterna!

Foco, força e fé.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. Aspectos fisiopatológicos da imaturidade de fetos e neonatos caninos	25
2.2. Causas não-infecciosas de mortalidade fetal e neonatal canina	27
2.2.1. Hipóxia fetal e neonatal.....	28
2.2.2. Trauma	29
2.2.3. Transtornos do aleitamento	30
2.2.4. Ambiente inadequado.....	30
2.2.5. Desordens nutricionais durante a gestação.....	31
2.2.6. Intoxicações e teratogênese	31
2.2.7. Distúrbios genéticos	31
2.2.8. Distúrbios hormonais	33
2.3. Causas infecciosas de mortalidade fetal e neonatal canina	33
2.3.1. Agentes bacterianos.....	35
2.3.1.1. <i>Brucella canis</i>	35
2.3.1.2. <i>Streptococcus</i> spp.....	39
2.3.1.3. <i>Staphylococcus</i> spp.	40
2.3.1.4. Enterobacteriaceae e outras bactérias Gram-negativas	40
2.3.2. Agentes virais	42
2.3.2.1. Herpesvírus canino.....	42
2.3.2.2. Vírus Diminuto Canino (Parvovírus canino tipo-1)	45
2.3.2.3. Parvovírus canino	47
2.3.2.4. Vírus da Cinomose Canina.....	49
2.3.2.5. Adenovírus canino.....	49

2.3.3. Agentes protozoários.....	50
2.3.3.1. <i>Neospora caninum</i>	50
2.3.3.2. <i>Leishmania infantum</i>	52
2.3.3.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	53
2.3.3.4. <i>Cystoisospora canis</i>	53
2.3.4. Helmintos	54
2.3.5. Importância zoonótica de agentes relacionados a morte fetal e neonatal canina	54
3. OBJETIVOS	57
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1. População estudada	57
4.2. Anatomopatologia	59
4.2.1. Técnica de necropsia e coleta de amostras	59
4.2.2. Histopatologia	62
4.2.3. Microscopia eletrônica	62
4.3. Análises moleculares.....	63
4.3.1. Extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR).....	63
4.3.2. Sequenciamento dos produtos da reação de <i>Brucella</i> spp.....	65
4.3.3. PCR-RFLP para identificação de Piroplasmata.....	65
4.4. Imuno-histoquímica	66
4.4.1. Detecção de antígenos de <i>Brucella</i> spp.....	66
4.4.2. Detecção de antígenos de <i>Toxocara canis</i>	66
4.5. Isolamento e identificação bacteriana	67
5. RESULTADOS.....	69
5.1. Anatomopatologia	69
5.1.1. Sistema respiratório.....	70
5.1.2. Sistema cardiovascular	72
5.1.3. Sistema digestório	74
5.1.4. Sistema tegumentar	77
5.1.5. Sistema linfo-hematopoético.....	78

5.1.6. Sistema urinário.....	80
5.1.7. Sistema reprodutor	85
5.1.8. Sistema nervoso.....	86
5.1.9. Sistema músculo-esquelético	86
5.2. Isolamento e identificação bacteriana	89
5.3. Análises moleculares.....	91
5.3.1. Controle interno – Actina-β.....	91
5.3.2. <i>Brucella</i>	91
5.3.3. Herpesvírus canino	93
5.3.4. Parvovírus canino	93
5.3.5. <i>Bocaparvovirus</i>	93
5.3.6. <i>Leishmania infantum</i>	93
5.3.7. PCR-RFLP e sequenciamento para identificação de Piroplasmas	93
5.4. Imuno-histoquímica	95
5.4.1. Detecção de <i>Brucella</i> spp.	95
5.4.2. Detecção de <i>Toxocara canis</i>	96
5.5. Doenças relacionadas a mortalidade fetal e neonatal canina.....	99
5.5.1. Infecção bacteriana fetal e neonatal canina	99
5.5.2. Brucelose fetal e neonatal canina	100
5.5.3. Herpesvirose fetal e neonatal	102
5.5.4. Glossite-gastroenterite e dermatite sugestivas de infecção viral	104
5.5.5. Babesiose neonatal	106
5.5.6. Leishmaniose neonatal	108
5.5.7. Toxocaríase (larva migrans visceral)	108
5.5.8. Hipóxia.....	108
6. DISCUSSÃO.....	109
7. CONCLUSÕES.....	119
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9. ANEXO.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos filhotes e de ninhadas por porte e raça, e o número de canis representados em cada raça.	59
Tabela 2	Canis cadastrados, número de cães no plantel e de filhotes encaminhados. ...	60
Tabela 3	Lista de primers, tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento e referências utilizadas para as PCR realizadas neste trabalho. ...	64
Tabela 4	Malformações observadas em natimortos e neonatos caninos necropsiados. .	70
Tabela 5	Bactérias isoladas e identificadas em amostras de fetos e neonatos caninos. .	89
Tabela 6	Número de filhotes e ninhadas positivos para <i>Brucella</i> spp. pela PCR, e separados em seus respectivos canis, em ordem decrescente de número de filhotes testados.	92
Tabela 7	Positividade pela imuno-histoquímica para <i>Brucella</i> spp. em tecidos de filhotes de diferentes idades.	95
Tabela 8	Lesões presentes ao exame microscópico de fetos e neonatos caninos positivos para <i>Brucella</i> spp. em PCR (n = 35).	100
Tabela 9	Lesões relacionadas a glossite-gastroenterite-dermatite e ocorrência de corpúsculos de inclusão intranucleares e citoplasmáticos sugestivos de infecção viral.	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição dos filhotes examinados nos diferentes portes raciais.	58
Figura 2	Necropsia de fetos e neonatos caninos. A. Incisão de pele e subcutâneo, contornando o cordão umbilical. B. Secção do úraco, que foi mantido junto à parede abdominal. C. Fragmento contendo umbigo, pele adjacente, parede abdominal e úraco. D. Após a fixação, o umbigo e os tecidos adjacentes foram seccionados longitudinalmente na linha média para inclusão em parafina. E. Coleta de amostra de rim para extração de DNA e isolamento bacteriano. F. Coleta de sangue cardíaco através de secção do ventrículo direito, para isolamento bacteriano.	61

Figura 3	Fluxograma representativo das provas empregadas e respectivos resultados para classificação dos isolados de bactérias Gram-positivas obtidas neste trabalho.	68
Figura 4	Número e frequência de fetos, natimortos e neonatos examinados nas diferentes faixas de idade, totalizando 203 indivíduos.	69
Figura 5	Pneumonias. A. Neonato com dois dias de idade: pneumonia intersticial necro-hemorrágica. Pulmão armado, vermelho intenso e brilhante. B. Neonato com cinco dias de idade: pneumonia broncointersticial e necrosante. C. Neonato com 21 dias de idade: broncopneumonia, mais intensa na região crânio-ventral. D. Neonato com quatro dias de idade: pneumonia broncointersticial com infarto do lobo diafragmático esquerdo. E. Neonato com quatro dias de idade: broncopneumonia aspirativa. O pulmão apresentava-se armado, com aumento da consistência e com leite nos espaços aéreos (setas). F. Microscopia do pulmão visto em E, evidenciando glóbulos eosinofílicos de leite (*) associados a infiltrado leucocitário e bactérias (seta). H&E (400X).	71
Figura 6	Lesões cardiocirculatórias. A. Spitz Alemão, natimorto: coração globoso, hipoplasia pulmonar e anasarca, caracterizada por hidrotórax e edema subcutâneo intenso. B. Spitz Alemão, natimorto, ilustrado na figura A. Coração, ventrículo direito: defeito no septo interventricular adjacente à válvula átrio-ventricular direita, possibilitando uma comunicação interventricular (seta). Na parede atrial nota-se o forame oval já ocluído. C. Buldogue Inglês, natimorto. Coração: orifício de 0,4 cm de diâmetro na parede atrial diagnosticado como comunicação interatrial associada a insuficiência cardíaca congestiva com edema generalizado. D. Spitz Alemão, 13 dias de idade: marcante hiperemia do epicárdio, com dilatação intensa do ventrículo direito e aurículas. Microscopicamente, havia epicardite e miocardite multifocal leve. Este neonato foi positivo na PCR para <i>Brucella</i> spp.	73
Figura 7	Sistema digestório. A. Neonato com nove dias de idade: borda da língua hemorrágica (seta). B. Neonato com 10 dias de idade, língua, histopatologia: glossite com necrose, hiperqueratose e corpúsculo de inclusão pseudocitoplasmático (seta). H&E (400X). C. Ultraestrutura do epitélio da língua de neonato canino com 10 dias de idade: célula epitelial contendo corpúsculo de inclusão pseudocitoplasmático (setas) adjacente ao núcleo (N). D. Corpúsculo de inclusão contendo numerosas partículas virais, delimitado por membrana dupla (setas), o que evidencia sua origem nuclear. E. Gastrite com necrose e hemorragia multifocal. F. Neonato com nove dias de idade: fezes amolecidas na região perianal, indicativo de diarreia.	75
Figura 8	Fígado. A. Neonato, dois dias de idade: hematopoese extramedular: megacariócitos distribuídos pelo parênquima hepático (setas). H&E (400X).	

B. Hematopoese extramedular: metarrubricitos (setas) e promielócitos (cabeças de seta), localizados nos espaços de Disse. H&E (1000X). C. Neonato, quatro dias de idade, fígado: lesões esbranquiçadas multifocais a coalescentes subcapsulares nas bordas de lobos hepáticos (setas). D. Mesmo animal de C, áreas de necrose e mineralização que correspondem às lesões esbranquiçadas vistas em C. H&E (200X). E. Neonato com dois dias de idade: hepatite portal leve com necrose e hiperplasia do epitélio biliar (setas), associada a infiltrado linfocítico e eosinofílico, com raros macrófagos e hemorragia multifocal discreta. H&E (400X). F. Natimorto: hepatomegalia e leve palidez difusa do fígado, que, na microscopia, correspondeu a degeneração vacuolar associada a hiperemia.

79

Figura 9 Sistema tegumentar. A. Neonato com três dias de idade: onfalite, com eritema ao redor do coto umbilical, e postite ulcerativa. *K. pneumoniae* foi isolada em cultura pura de sangue, pulmão, fígado, baço e rim. B. Neonato com três dias de idade, infarto cutâneo em dígito (seta). *E. coli* foi isolada em cultura pura de sangue, pulmão, fígado, baço e rim. C. Neonato com nove dias de idade: pododermatite ulcerativa (seta), associada a corpúsculos de inclusão sugestivos de infecção viral ao exame microscópico. D. Neonato com seis dias de idade: pústula na pele da região abdominal (seta). E. Neonato ilustrado em C. Pele, aspecto microscópico da lesão observada em C: Inclusões sugestivas de infecção viral em queratinócitos de folículos pilosos adjacentes às áreas de ulceração (setas) H&E (400X). F. Neonato ilustrado em C: dermatite com erosão epitelial no focinho, associada a corpúsculos de inclusão sugestivos de infecção viral na microscopia.

81

Figura 10 Sistema linfo-hematopoético (timo e baço). A. Neonato com três dias de idade: timo de tamanho normal. Pode-se notar também intensa pericardite. B. Natimorto: timo menor que o normal com hemorragias multifocais. C. Neonato com dois dias de idade, PCR positivo para *Brucella* sp. com isolamento de *E. coli* em cultura pura de todas as amostras. Timo: aspecto microscópico da hemorragia (estrelas) associada a moderada linfólise (setas). H&E (200X). D. Natimorto: baço com múltiplos nódulos brancos coalescentes (setas), diagnosticado como esplenite granulomatosa ao microscópio. *Staphylococcus* sp. foi isolado do baço deste filhote. Este neonato foi positivo na imuno-histoquímica para detecção de antígenos de *Toxocara canis* no fígado.

82

Figura 11 Sistema linfo-hematopoético (linfonodos). A. Neonato com 13 dias de idade, acometido pela forma generalizada da infecção por herpesvírus canino, confirmada pelo resultado positivo na PCR. Linfonodos aumentados de volume e vermelhos devido a drenagem de hemorragia (setas). Glândula salivar (estrela). B. Neonato com dois dias de idade, portador de inclusões sugestivas de infecção viral na língua: linfonodos hipoplásicos (setas). Glândula salivar (estrela). C. Neonato com dois dias de idade, PCR positivo para *Brucella* sp. com isolamento de *E. coli* em cultura pura de sangue, pulmão, fígado, baço e rim (mesmo filhote ilustrado em 10C): hipoplasia linfoide e drenagem de hemorragia no linfonodo adjacente ao timo, o qual

- encontrava-se com hemorragia e linfólise. H&E (200X). D. Neonato com dois dias de idade, o mesmo ilustrado em 10C e 11C: linfonodo submandibular com depleção linfoide e preenchimento dos seios linfáticos por macrófagos com citoplasma eosinofílico abundante. H&E, (400X). 83
- Figura 12 Rins. A. Natimorto, Dálmata: cristais dourados em túbulos renais (setas). B. Neonato com nove dias de idade: hemorragia em medula renal (seta). Neonato portador de corpúsculos de inclusão em língua e pele, do qual foram isolados quatro gêneros bacterianos: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* sp. e *E. cloacae*. C. Neonato com 13 dias de idade, acometido pela forma generalizada de herpesvirose neonatal: infartos hemorrágicos multifocais em córtex e medula renais. D. Neonato com três dias de idade, *Brucella*-positivo em PCR: petéquias multifocais a coalescentes em rim. E e F. Neonato com 2 dias de idade, rim: aspecto microscópico de um caso de displasia renal moderada, com ectasia tubular multifocal (setas) e fibroplasia multifocal a coalescente (estrelas) associadas a perda de túbulos, mais acentuada na região medular. H&E (E:200X; F:400X). 84
- Figura 13 Sistema reprodutor. Neonato fêmea, dois dias de idade, portadora de displasia renal, ilustrada nas figuras 12E e F. Vulva. A. Exocitose neutrofílica e pústula intraepitelial (seta). B. Inclusões intranucleares grandes e eosinofílicas no epitélio da mucosa vulvar (setas). Este filhote apresentou PCR negativo para detecção de herpesvírus de amostras de rim, pulmão, fígado, baço e miocárdio. 85
- Figura 14 Sistema Nervoso. A. Natimorto, *Brucella*-positivo, ninhada a termo: giros cerebrais desenvolvidos. Hiperemia intensa e hemorragia de meninge. B. Neonato, com quatro dias de idade, ninhada prematura, nascido em cesariana de emergência devido a morte de cinco fetos e sepse da cadela: ausência de giros cerebrais. C. Neonato, morto três horas após a cesariana: giros cerebrais hipoplásicos em relação ao observado em A. D. Neonato, morto 11 dias após a cesariana: notam-se giros cerebrais mais desenvolvidos do que em A. 87
- Figura 15 Sistema músculo-esquelético. A. Natimorto da raça Whippet. Tórax longo e profundo com costelas bem arqueadas. B. Natimorto da raça Buldogue Francês. Tórax curto e achatado ventro-dorsalmente. Em A e B as barras transversais delimitam as cavidades torácica e abdominal. C e D. Aspecto da cavidade torácica e do recesso diafragmático em um neonato da raça Rottweiler (C) e em um neonato da raça Buldogue Francês (D), com zero e dois dias de idade respectivamente. E. Neonato da raça Buldogue Francês com *pectus excavatum*, dois dias de idade. Há uma depressão na porção média-caudal do esterno com acentuado achatamento ventro-dorsal do tórax. F. Neonato com hérnia diafragmática congênita, quatro dias de idade. Alças intestinais e baço (seta) no interior da cavidade torácica, deslocam o coração (estrela) para o hemisfério torácico direito. Havia hipoplasia pulmonar intensa neste neonato. 88

Figura 16	Morfologia de colônias bacterianas representativas dos gêneros mais frequentes neste estudo. A. <i>Staphylococcus</i> sp. isolado em cultura pura do baço de um feto abortado. Ágar sangue. B. <i>Enterococcus</i> β-hemolítico isolado em cultura pura do rim de um neonato de 13 dias. Ágar sangue. C. <i>Escherichia coli</i> isolada em cultura pura do pulmão de um neonato de quatro dias com pneumonia. MacConkey. D. Cultura mista de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> isolados do sangue cardíaco de um neonato com enterite e pneumonia por aspiração.	90
Figura 17	Número de filhotes positivos na PCR para <i>Brucella</i> spp. distribuídos de acordo com a idade, totalizando 200 filhotes.	91
Figura 18	Resultado da PCR para organismos da ordem Piroplasmida com os iniciadores PIRO A e PIRO B, em gel de agarose 1,5% corado por SYBR®Safe DNA Gel Stain. Produtos com 407 pb, característicos de <i>Babesia canis</i> . Amostras: mistura de DNA (1), fígado (2), baço (3), pulmão (4), rim (5), coração (6) do filhote suspeito. Controle positivo: amostra clínica de <i>Babesia canis</i> (7), controle negativo (8).	94
Figura 19	Análise dos produtos da digestão pelas enzimas <i>HinfI</i> e <i>TaqI</i> , em gel de agarose 1,5% corado por SYBR®Safe DNA Gel Stain. Produtos da digestão com as enzimas <i>HinfI</i> e <i>TaqI</i> , com 400 pb e 203pb/171pb, respectivamente, característicos de <i>Babesia canis vogeli</i> . Mistura de DNA (1), fígado (2), baço (3), pulmão (4), rim (5). Coração (6): amostra negativa. Controle: amostra clínica de <i>Babesia canis</i> (7).	94
Figura 20	Imuno-histoquímica para detecção de <i>Brucella</i> spp. A. Intestino delgado, natimorto: macrófagos positivos em lâmina própria e túnica muscular (setas) (200X). B. Pulmão, neonato, 10 dias de idade: macrófagos positivos no tecido conjuntivo periarterial e peribronquiolar (seta) (400X). C. Testículo, neonato, 13 dias de idade: macrófagos positivos perivasculares (setas) (200X). D. Artéria umbilical, natimorto: cocobacilos intracitoplasmáticos na túnica muscular arterial (setas) (400X). E. Pele adjacente ao cordão umbilical, natimorto: cocobacilos marcados na epiderme (seta) e no interior de macrófagos na derme (cabeças de seta) (1000X). F. Rim, natimorto: cocobacilos marcados intracitoplasmáticos no epitélio tubular (seta) (400X)..	97
Figura 21	Imuno-histoquímica para detecção de antígenos de <i>Toxocara canis</i> . A. Fígado: marcação positiva ao redor de ductos biliares (setas) e arteríola, em espaço porta com inflamação e edema leves (200X). B. Fígado: granuloma com células gigantes em borda de lobo hepático com marcação positiva no interior do granuloma (estrela) e no tecido conjuntivo adjacente (200X). C. Fígado: marcação positiva ao redor de ducto biliar em espaço porta com inflamação, edema e hemorragia (seta) (400X). D. Pulmão: marcação positiva em bronquíolo (estrela) e arteríola, em um pulmão com pneumonia intersticial (100X).	98

- Figura 22 Infecção bacteriana neonatal canina. Peritonite. A. Neonato com 12 horas de nascido. Peritonite fibrino-hemorrágica com edema, hemorragia e dilatação de alças intestinais associada a onfalite. Fibrina aderida ao peritônio adjacente ao cordão umbilical (setas). Foram isolados *Acinetobacter baumani*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* de fígado, baço, rim, pulmão e sangue cardíaco deste animal. B. Neonato com três dias de idade, submetido a cirurgia para correção de onfalocele logo após o nascimento, com sutura da parede abdominal. Observa-se peritonite fibrinosa difusa, com dilatação de alças intestinais e petéquias multifociais. *E. coli* foi isolada em cultura pura de fígado, baço, rim e pulmão. Do sangue cardíaco, *E. coli* foi isolada em associação a *Staphylococcus* sp. 99
- Figura 23 Brucelose fetal e neonatal canina. Lesões observadas em filhotes *Brucella*-positivos em PCR. A. Natimortos prematuros, em diferentes graus de autólise, nascidos em cesariana de emergência devido a morte de cinco fetos e sepsis da cadela. Nesta ninhada, *Staphylococcus* sp. foi isolado de pulmões, fígado e placenta de todos os natimortos. B. Natimorto da ninhada ilustrada em A, com edema e hemorragia na região periumbilical. C. Natimorto com efusão abdominal sero-hemorrágica. D. Neonato de dois dias de idade, com esplenomegalia moderada (seta). *E. coli* foi isolada em cultura pura de baço, fígado, e pulmão deste animal. E. Natimorto da ninhada ilustrada em A, com epicardite e pneumonia. F. Neonato de três dias de idade, com pericardite e pneumonia. Dos pulmões deste filhote foram isolados *Staphylococcus* sp. e *E. coli*. 101
- Figura 24 Herpesvirose neonatal canina. Neonato com 13 dias de idade, PCR positivo para herpesvírus canino A. Fezes pastosas acinzentadas nos pelos da região perianal. B. Língua, glossite necrótica: necrose de papilas linguais (seta). H&E (200X). C. Esplenomegalia (seta), intestino com áreas vermelhas multifocais, representativas de infartos hemorrágicos, e fígado (estrela) com pontos vermelhos multifocais e amarelado, devido a hepatite necro-hemorrágica e esteatose. D. Fígado. Área de necrose do parênquima hepático (estrela). H&E (400X). E. Rim: hemorragia difusa na superfície renal (seta). F. Rim: necrose e hemorragia em córtex e medula renais (estrela). H&E (50X). 103
- Figura 25 Glossite-gastroenterite e dermatite sugestivas de infecção viral. Lesões neonatais associadas a corpúsculo de inclusão sugestivo de infecção viral em língua e/ou pele. A. Neonato com dois dias de idade: dermatite necrótica associada a edema, eritema e vesículas. B. Neonato com um dia de idade: glossite hemorrágica. C. Neonato com quatro dias de idade: dermatite vesicular abdominal e vulvite caracterizada por eritema discreto. À microscopia das lesões apresentadas em A, B, C e D havia corpúsculos sugestivos de infecção viral. D, E, F. Neonato com 9 dias de idade; D: pododermatite ulcerativa (setas); E: pulmões difusamente vermelhos com áreas vermelho-escuras de hemorragia; F: pneumonia broncointersticial com

atelectasia e necrose alveolar multifocal a coalescente intensa (estrelas) e infiltrado leucocitário na parede e no lúmen bronquiolar (seta). H&E (200X). 105

Figura 26 Babesiose neonatal. Neonato com 15 dias de idade. A. Distensão abdominal, icterícia e palidez generalizada. B. Icterícia, hepato e esplenomegalia. Distensão gástrica devido a estase de leite administrado via sonda orogástrica. C. Rins com cortical vermelho escura devido a pigmentação por hemoglobina. D. Baço vermelho escuro intensamente aumentado de tamanho, medindo 8,0 cm de comprimento. E. Urina alaranjada e límpida, coletada por micção espontânea um dia antes da morte (foto: Juliano Silotti). F. Língua, histopatologia: estruturas esféricas intravasculares em um capilar, com morfologia compatível com *Babesia* sp. (1000X). 107

RESUMO

A mortalidade fetal e neonatal na espécie canina é reponsável por perdas significativas para os criadores e proprietários de cães. Diversos autores afirmam que as causas infecciosas são importantes, mas estudos epidemiológicos são muito escassos e restritos a algumas raças e canis, e ainda não foram realizados no Brasil. O objetivo deste trabalho foi investigar as doenças relacionadas a mortalidade fetal e neonatal canina com a associação de métodos anatomopatológicos, microbiológicos e moleculares. Foram necropsiados 203 filhotes de 89 ninhadas, provenientes de 32 canis localizados no estado do Espírito Santo, no sudeste do Brasil. As lesões inflamatórias predominaram e frequentemente estavam associadas à visualização de agentes bacterianos ao exame microscópico e/ou sua detecção pelos exames auxiliares. As lesões mais frequentes foram: pneumonia (85,4%), onfalite (56,3%), hepatite (47,2%), epicardite (38,5%), glossite (21,1%) e miocardite (17,4%). Malformações ocorreram em 7,5% dos animais examinados. Alterações cadavéricas impediram a visualização de lesões macro e microscópicas em 15 animais. O congelamento dos cadáveres antes da necropsia impediu a análise microscópica em 51 animais. Infecções bacterianas foram a principal causa de morte, tanto em infecções primárias, quanto em infecções secundárias. Os agentes bacterianos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus* sp. (62,6%), *Escherichia coli* (36,0%), *Klebsiella pneumoniae* (17,8%) e *Enterococcus* sp. (9,8%). O isolamento de mais de um gênero bacteriano ocorreu em grande número de filhotes (55,8%). Por meio da reação em cadeia da polimerase, verificou-se positividade de 21% para *Brucella* sp., 1,5% para herpesvírus canino e 1,5% para *Leishmania infantum*. A brucelose canina mostrou-se disseminada em muitos filhotes e canis, contudo, a frequência de aborto em ninhadas infectadas foi baixa (1/31). Este estudo evidenciou que a brucelose perinatal canina estava relacionada principalmente a natimortalidade e mortalidade neonatal nos canis positivos estudados, enquanto o aborto foi raro nessa população. Os filhotes *Brucella*-positivos na PCR analisados por imuno-histoquímica apresentaram ampla distribuição do agente nos tecidos, frequentemente com infecção bacteriana oportunista, especialmente por *Staphylococcus* (54%) e *Escherichia coli* (40,5%). Dentre os agentes virais, a infecção por herpesvírus em sua forma generalizada foi observada em apenas um indivíduo. Contudo, uma infecção viral caracterizada por gastroenterite, glossite e dermatite ulcerativa associadas a inclusões intracelulares sugestivas de infecção viral ocorreu em 60/161 (37,3%) dos animais examinados histopatologicamente, sempre associada a infecção bacteriana oportunista. Não foi possível identificar o agente etiológico destas lesões neste trabalho. Um caso de babesiose neonatal devido a infecção por *Babesia canis vogeli* foi diagnosticado por métodos anatomopatológicos e moleculares. Antígenos de *Toxocara canis* foram demonstrados por meio de imuno-histoquímica em focos de hepatite necrótica granulomatosa, hepatite portal e pneumonia intersticial, indicando que tais lesões podem estar relacionadas a migração visceral de larvas. *T. canis* foi diagnosticado também na forma adulta intestinal em três neonatos com nove a 20 dias de idade. Coinfecções foram a principal causa de morte dos fetos e neonatos neste estudo, geralmente com agentes bacterianos oportunistas, agentes virais e *Brucella* sp. Infecções por agentes bacterianos oportunistas são facilmente diagnosticadas por métodos de rotina e podem ocultar a ocorrência da doença primária. As infecções diagnosticadas nos fetos e neonatos estudados, de forma geral, tiveram uma morfologia perinatal diferente daquela observada em outras faixas etárias na espécie canina e são pouco documentadas na literatura, o que pode levar ao subdiagnóstico em muitos casos. A caracterização anatomopatológica das doenças perinatais caninas é a principal contribuição deste trabalho.

Palavras chave: *Brucella*, Herpesvírus, *Toxocara canis*, feto, neonato, cão.

ABSTRACT

Canine fetal and neonatal mortality is responsible for many losses to breeders and dog owners. Many researchers consider infectious diseases as important causes of death, but epidemiologic investigations are limited to some breeds or kennels and had not been performed in Brazil before. The goal of this study was to investigate diseases related to canine fetal and neonatal mortality through anatomopathological, microbiological, and molecular analysis. A total of 203 puppies were submitted to necropsy, from 89 litters and 32 kennels located in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. Inflammatory lesions predominated, frequently with visualization of bacterial agents in tissue lesions by microscopy and/or their detection by the complementary analysis. Lesions most frequently diagnosed were pneumonia (85,4%), omphalitis (56,3%), hepatitis (47,2%), epicarditis (38,5%), glossitis (21,1%), and myocarditis (17,4%). Malformations were diagnosed in 7,5% of puppies. *Post mortem* changes prevented morphologic diagnosis in 15 animals. Freezing artefacts jeopardized microscopy in 51 animals. Bacterial infections were the main cause of death, mainly as secondary but also as primary infections. Bacterial agents isolated more frequently were *Staphylococcus* sp. (62,6%), *Escherichia coli* (36,0%), *Klebsiella pneumoniae* (17,8%), and *Enterococcus* sp. (9,8%). Isolation of more than one bacterial genus occurred in many puppies (55,8%). Polymerase chain reaction detected positivity in puppies for *Brucella* (21%), canine herpesvirus (1,5%), and *Leishmania infantum* (1,5%). Canine brucellosis was spread in puppies and kennels, although the frequency of abortions of infected litters was low (1/31). This study brings evidence that canine perinatal brucellosis was mainly related to stillbirth and neonatal death in the positive kennels studied, while abortion was rare in this population. *Brucella*-PCR positive puppies submitted to immunohistochemistry presented wide tissue distribution of the agent, frequently associated with opportunistic bacterial infection, especially with *Staphylococcus* (54%) and *Escherichia coli* (40,5%). Among viral agents, herpesvirus generalized infection occurred in only one neonate. A viral infection characterized by gastroenteritis, glossitis, and ulcerative dermatitis with intranuclear inclusions suggestive of viral infection was detected in 60/161 (37,3%) of puppies submitted to histopathology, always in association with opportunistic bacterial infection. It was not possible to identify the etiologic agent of these lesions with the methods employed in this research. One case of neonatal babesiosis due to *Babesia canis vogeli* infection was diagnosed through anatomopathological and molecular methods. *Toxocara canis* antigens were detected through immunohistochemistry in foci of necrotizing and granulomatous hepatitis, portal hepatitis, and interstitial pneumonia, suggesting visceral larvae migration. Adult *T. canis* worms were also detected in intestinal lumen of three neonates, nine to 20 days old. Co-infections were the cause of death of the fetuses and neonates in this study, mainly due to association between opportunistic bacterial agents, viruses, and *Brucella* sp. Opportunistic bacterial infections are easily diagnosed by routine methods and may hide the primary disease if analysis are not accurate or directed towards specific agents as *Brucella* and viruses. The infections diagnosed in the fetuses and neonates in this study, in many cases, were morphologically distinct from that described for dogs in other age ranges and poorly documented in the literature, what may lead to underdiagnoses and misdiagnosis in many cases. Anatomopathological characterization of canine perinatal diseases is the main contribution of this study.

Keywords: *Brucella*, Herpesvirus, *Toxocara canis*, fetus, neonate, dog.

1. INTRODUÇÃO

A frequência de mortalidade fetal e neonatal na espécie canina é elevada e resulta em grandes prejuízos financeiros, genéticos e emocionais. Estima-se que cerca de 20 a 30% dos filhotes de cães que atingem o terço final da gestação não chegam ao desmame. A maior parte das mortes ocorre no período perinatal, que envolve a morte fetal no final da gestação, durante o parto, e a morte neonatal até sete dias após o parto (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a; Indrebo et al., 2007; Tønnessen et al., 2012; Mila et al., 2014). O risco de mortalidade perinatal canina está mais relacionado a variáveis individuais da ninhada do que à raça ou ao porte racial, sendo mais frequente na primeira ninhada de uma cadela e três vezes maior nas cadelas que têm a primeira ninhada com mais de 6 anos de idade (Tønnessen et al., 2012).

As perdas gestacionais na espécie canina cursam com reabsorção embrionária quando ocorrem ao longo dos primeiros 35 dias de gestação, quando se inicia o desenvolvimento fetal (England e Russo, 2006; Pretzer, 2008b). Durante o desenvolvimento fetal, a expulsão vaginal de fetos vivos ou mortos, incapazes de sobreviver fora do útero devido à imaturidade de seus sistemas, caracteriza o aborto (Dumon, 2005a). Todavia, pode ocorrer a manutenção da gestação na cadela após a morte de um ou mais fetos. Nestes casos, o feto morto fica retido no útero, podendo sofrer reabsorção dos fluidos corporais, o que caracteriza a condição chamada de mumificação fetal. Quando ocorre a morte de fetos ao final da gestação ou durante o parto, ou seja, quando não apresentam sinais vitais ao nascimento, os fetos mortos são classificados como natimortos (Schlafer, 2008; Tønnessen et al., 2012). Os fetos tornam-se neonatos durante o trabalho de parto, processo denominado “transição fetal-neonatal”, caracterizado por adaptações à vida extrauterina, como o início da respiração pulmonar (Vannucchi et al., 2012b; Lourenço e Machado, 2013). A partir de então, se ocorrer a morte do filhote, o evento deverá ser denominado morte neonatal e poderá ser classificado de acordo com o tempo decorrido entre o parto e a morte. A morte neonatal precoce ocorre nos primeiros sete dias após o nascimento, enquanto a morte neonatal tardia acontece a partir do sétimo dia após o nascimento, até o término da fase neonatal, ao desmame (Tønnessen et al., 2012; Lourenço e Machado, 2013). Todavia, para alguns autores, o período neonatal na espécie canina compreende o intervalo entre o nascimento e os 14 dias de idade (Prats, 2005b; Vannucchi et al., 2012), antes do início do desmame, que geralmente ocorre entre a terceira e a quarta semana de idade, chamado período de transição (Prats, 2005a).

Inúmeras doenças estão relacionadas à mortalidade fetal e neonatal na espécie canina, decorrentes de causas infecciosas e não-infecciosas. Dentre as causas não-infecciosas, citam-se hipóxia (associada a distocia), hipotermia, hipoglicemia, doenças genéticas, traumas e intoxicações (Dumon, 2005a; Lamm e Njaa, 2012; Münnich e Küchenmeister, 2014). A distocia é considerada a principal causa de morte perinatal em cães (Münnich, 2008; Münnich e Küchenmeister, 2014).

Diversas doenças infecciosas responsáveis pela mortalidade fetal e neonatal canina são graves e zoonóticas (Graham e Taylor, 2012), contudo, até o momento, são poucos os estudos que investigaram a etiologia e epidemiologia dessa casuística (Nielen et al., 1998; Larsen, et al., 2015; Young et al., 2015). Agentes bacterianos e virais são os mais citados dentre as causas infecciosas, enquanto os casos de infecções protozoais são raramente diagnosticados (Nielen et al., 1998; MacCallister et al., 2016; Reis et al., 2016) e, geralmente, experimentais (Pretzer, 2008a; Freshman, 2009). Segundo Münnich (2008), depois da distocia, as infecções bacterianas são a segunda causa de mortalidade perinatal canina mais frequente. Os poucos estudos

epidemiológicos publicados confirmam a alta prevalência de infecções bacterianas (Nielen et al., 1998; Young et al., 2015), enquanto que as doenças virais neonatais parecem ser raras na população canina, correspondendo a cerca de 1 a 2% dos casos (Nielen, et al., 1998; Larsen, et al., 2015; Young et al., 2015).

A anatomia patológica, em muitos casos de mortalidade fetal e neonatal canina, permite a identificação de lesões características e direcionadoras do diagnóstico, mas, em alguns casos, as lesões são mínimas, inespecíficas ou mesmo ausentes. Assim, para maior sucesso no diagnóstico, além da necropsia, ampla anamnese e exames auxiliares para a detecção de agentes infecciosos são também importantes (Nielen et al., 1998; Lamm e Njaa, 2012; Münnich e Küchenmeister, 2014; Young et al., 2015). Sempre que possível, as placentas devem ser analisadas, pois em alguns casos o agente etiológico poderá ser identificado apenas nos anexos fetais e não no feto (Schlafer, 2008).

Para o correto diagnóstico, a identificação do agente etiológico deve ser associada à visualização de lesões características, os diagnósticos diferenciais devem ser investigados e a possibilidade de coinfeção deve ser considerada (Morris et al., 2007; Lamm et al., 2010; Sahin et al., 2014; Bodewes et al., 2014; Larsen et al., 2015). Contudo, a morte súbita é relatada com frequência em neonatos caninos, devido à sua limitada capacidade de adaptação a situações adversas, como extremos de temperatura, anorexia e desidratação, e devido à imaturidade do sistema imunológico, com consequente susceptibilidade a inúmeros agentes infecciosos (Münnich e Küchenmeister, 2014). Nestes casos, lesões macroscópicas podem ser discretas ou ausentes (Morris et al., 2007; Lamm et al., 2010). Diante das particularidades metabólicas e imunológicas dos fetos e neonatos caninos, e de peculiaridades das alterações anatomopatológicas, o diagnóstico neste grupo de pacientes pode mostrar-se desafiador (Dumon, 2005a; Schlafer, 2008; Lamm et al., 2010).

Entretanto, raramente os fetos e neonatos caninos mortos são submetidos à necropsia, o que leva à falta de informações epidemiológicas sobre as causas de mortalidade perinatal, à raridade de relatos sobre o diagnóstico de determinadas doenças (Schlafer, 2008) e à falta de experiência dos profissionais para a realização de diagnóstico *post mortem* de pacientes com essa idade (Järplid et al., 1996).

Com frequência, as doenças produzem sinais inespecíficos e evolução hiperaguda, e os casos fatais acabam sendo diagnosticados como "síndrome do definhamento neonatal", sem determinação da etiologia (Järplid et al., 1996). Esta síndrome é um termo clínico que se refere a ocorrência de morte em neonatos que nasceram aparentemente normais, mas não define uma doença específica (Dumon, 2005a).

Alguns agentes infecciosos relacionados a mortalidade fetal e neonatal canina são zoonóticos, como *Brucella* spp., (Pretzer, 2008a; Schlafer, 2008; Graham e Taylor, 2012), *Leishmania infantum* (Pangrazio et al., 2009) e *Escherichia coli* (Münnich e Lübke-Becker, 2004), fato que reforça a necessidade de investigação diagnóstica nos casos de perdas gestacionais e perinatais de filhotes de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a fertilização até o desmame, os filhotes de cães são susceptíveis a agressões que podem ocasionar a sua morte, induzir malformações ou resultar no nascimento de filhotes fracos que morrem nos primeiros dias de vida. A evolução de cada caso irá depender do momento em que ocorre a agressão e do agente etiológico (Schlafer, 2008).

Na espécie canina, os embriões chegam ao útero entre sete e 10 dias após a fertilização, onde migram e se distribuem para que ocorra a implantação, entre 21 e 22 dias após o pico de LH (Concannon et al., 2001), quando se tornam detectáveis ao exame ultrassonográfico (England e Russo, 2006). O desenvolvimento embrionário transcorre até 35 dias de gestação, seguido pelo crescimento fetal até o parto, 65 ± 1 dias após o pico de LH (Concannon et al., 2001).

A morte embrionária geralmente resulta em reabsorção dos embriões. A detecção de morte embrionária na primeira metade da gestação é limitada pela dificuldade no diagnóstico precoce da gestação na cadela e, por isso, sua importância epidemiológica não é clara. Muitas vezes, nesses casos, a cadela não apresenta sinais clínicos. A avaliação ultrassonográfica é a única forma de documentar a reabsorção, o que é possível somente quando ela ocorre após a implantação embrionária (England e Russo, 2006).

Quando a morte fetal acontece depois de 35 dias de gestação, pode haver aborto ou mumificação (Schlafer, 2008). Na espécie canina, o aborto propriamente dito não é frequente, e, quando ocorre, é comum a cadela ingerir os fetos, placentas, secreções e não deixar vestígios que possibilitem a identificação do aborto (Dumon, 2005a). Este fato deve contribuir para a subnotificação de casos de aborto na espécie canina, que muitas vezes são confundidos com ausência de concepção, caso não tenha sido realizado o diagnóstico da gestação anteriormente (Carmichael, 1966). Contudo, o nascimento de filhotes vivos, juntamente com a expulsão de fetos mumificados e natimortos é uma ocorrência comum na espécie canina (Schlafer, 2008).

Com o término da gestação, há a necessidade de adaptações imediatas à vida extrauterina, para suprir as funções vitais de respiração, termorregulação e alimentação, até então realizadas através da placenta e do ambiente uterino. Falhas na adaptação de algum destes sistemas poderá culminar a morte neonatal. O evento mais crítico da transição fetal-neonatal canina é o estabelecimento da função pulmonar (Randal, 1978; Dumon, 2005a; Sipriani et al., 2009; Vannucchi et al., 2012a; Vannucchi et al., 2012b; Lourenço e Machado, 2013), e, para a sobrevivência neonatal, a transferência da imunidade passiva (Mila et al., 2014).

2.1. Aspectos fisiopatológicos da imaturidade de fetos e neonatos caninos

A histogênese pulmonar é caracterizada por cinco fases: embrionária, pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar. Nas semanas que antecedem o parto, os pulmões de fetos caninos transformam-se da fase pseudoglandular (entre 35 e 46 dias de gestação), para a canalicular (entre 48 e 57 dias de gestação) até a fase sacular, que se encontra histologicamente organizada apenas a partir de 60 dias de gestação. Nos cães, a fase alveolar é estabelecida somente após o nascimento, durante a vida neonatal. (Sipriani et al., 2009). A estrutura septal e alveolar de neonatos caninos nascidos a termo difere daquela dos prematuros. Nos prematuros, nascidos três dias antes da data prevista para o parto, os septos alveolares são mais espessos, preenchidos por tecido mesenquimal e células indiferenciadas. Alvéolos delimitados por septos delgados estão presentes apenas nos

fetos desenvolvidos a termo, a partir de 65 dias de gestação, embora o desenvolvimento do epitélio alveolar ocorra somente no período neonatal (Sipriani et al., 2009; Regazzi, 2011).

A produção de surfactante, importante parâmetro da maturação pulmonar, é maior nos neonatos caninos nascidos por parto vaginal, eutócico ou distócico, do que naqueles nascidos por cesariana eletiva, mesmo quando a cirurgia é realizada durante a fase 1 do trabalho de parto (fase preparatória). Este fato demonstra a importância da fase 2 do trabalho de parto (expulsão fetal) na maturação pulmonar (Silva et al., 2015). Em neonatos caninos prematuros, a corticoterapia no final da gestação foi associada a melhor capacidade respiratória, mas não aumentou a produção de surfactante (Vannucchi et al., 2012a).

Hipóxia fetal transitória ocorre durante o parto e é considerada fisiológica, com consequente aumento da concentração de CO₂ e acidose, tidos como os estímulos que desencadeiam a produção de surfactante pulmonar e ativação das funções gastrointestinais. Estímulos táteis e o estiramento dos vasos umbilicais no canal de parto, além do aumento na concentração de CO₂, promovem a estimulação da primeira inspiração. O estabelecimento da função respiratória deve corrigir a hipóxia e as alterações hemogasométricas que ocorrem durante a transição fetal-neonatal para possibilitar a sobrevivência do neonato (Lúcio et al., 2009; Vannucchi et al., 2012b).

Devido a particularidades metabólicas dos neonatos caninos, eles são extremamente vulneráveis a hipotermia, hipoglicemia e desidratação, que podem ocorrer isoladamente, mas geralmente evoluem associados, o que caracteriza a síndrome clínica conhecida como “tríade do recém-nascido”. Com frequência, estas alterações homeostáticas complicam outras doenças neonatais, sejam elas infecciosas ou não-infecciosas. Durante a primeira hora de vida ocorre hipotermia neonatal transitória independentemente do tipo de parto (Silva et al., 2009a). Na fase neonatal, a temperatura corporal depende da temperatura ambiental e somente alcançará os 38,5°C normais do adulto com quatro semanas de vida (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a; Münnich e Küchenmeister, 2014).

A hipotermia neonatal deve-se à imaturidade do hipotálamo ao nascer, à inexistência do reflexo de tremor até o sexto dia de vida e à escassez de tecido adiposo corporal. A homeotermia neonatal depende do calor corporal da mãe e do leite materno. A hipotermia neonatal pode induzir a depressão do sistema nervoso central, comprometimento cardiorrespiratório, diminuição do reflexo de sucção e da motilidade intestinal, hipoglicemia, desidratação, maior susceptibilidade a infecções, coma e morte. Por outro lado, se a temperatura ambiental for excessiva, pode ocorrer hipertermia, com redução da sensibilidade ao CO₂, desidratação e consequente constipação (Fisher, 1982; Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a; Münnich e Küchenmeister, 2014).

Após o nascimento, com a interrupção da nutrição proveniente da placenta, o neonato torna-se dependente da ingestão intermitente de leite para manutenção da glicemia (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a; Lourenço e Machado, 2013; Münnich e Küchenmeister, 2014). A falta de ingestão de leite pode ocasionar hipoglicemia rapidamente, pois as reservas de glicogênio hepático são limitadas, a gliconeogênese não é eficiente nos neonatos caninos (Dumon, 2005a; Münnich e Küchenmeister, 2014) e glicosúria ocorre com frequência (von Dehn, 2014). Além disso, endotoxemia, sepse, deficiências enzimáticas hereditárias e hipotermia podem também reduzir a glicemia, resultando em letargia, perda do reflexo de sucção com interrupção do aleitamento, convulsões, depressão e morte (Johnston et al., 2001; Münnich e Küchenmeister, 2014).

A imaturidade renal do neonato canino (Horster et al., 1971) impõe uma limitada capacidade de concentrar ou de diluir a urina, com níveis de ureia e creatinina elevados entre um e três dias de vida (von Dehn, 2014) e elevado risco à ocorrência de desidratação. Além disso, o neonato canino

apresenta a pele mais permeável devido a epiderme fina e pouco queratinizada, com uma maior área de superfície corporal relativa do que os cães adultos, dependendo da dieta láctea e da umidade ambiental para manter-se hidratado. Diarreia, doenças graves com a ocorrência de choque circulatório e exposição a temperaturas elevadas são capazes de induzir desidratação rapidamente em neonatos caninos (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a; Münnich e Küchenmeister, 2014).

Outro aspecto fundamental da vulnerabilidade fetal e neonatal é sua imaturidade imunológica. Os linfócitos aparecem no timo fetal dos cães por volta dos 35 dias de gestação, mas apenas a partir dos 45 dias de desenvolvimento intrauterino o timo está formado (Vrecenak et al., 2014) e os linfócitos podem ser encontrados nos linfonodos e no baço (Day, 2007). A imunidade celular parece ser limitada no período neonatal precoce nos cães. Três dias após o nascimento, neonatos caninos têm apenas cerca de 30% e 15%, respectivamente, do número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ presentes entre os 10 e 45 dias de idade. Ainda, a quantidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são inferiores durante todo o período neonatal quando comparada ao que é descrito para cães adultos (Klein et al., 2014). Após o nascimento, o timo continua o seu desenvolvimento para iniciar a involução a partir de seis meses de vida (Day, 2007).

Os filhotes de cães nascem hipogamaglobulinêmicos, o que os torna dependentes da imunidade passiva durante a fase neonatal para responderem prontamente aos desafios infecciosos (Dumon, 2005a; Day, 2007; Chastant-Maillard et al., 2012; Mila et al., 2014). A absorção intestinal de imunoglobulinas em neonatos caninos é ótima nas primeiras 4 horas, e declina drasticamente a partir de 10 horas após o nascimento (Chastant-Maillard et al., 2012), devido a acidificação do pH gástrico, maior digestão gastrointestinal de proteínas e, possivelmente, devido ao término da expressão de receptores para imunoglobulinas nas células intestinais (Dumon, 2005a; Day, 2007). Neonatos com níveis séricos de IgG inferiores a 230 ng/mL apresentaram maior risco de morte (Mila et al., 2014).

Neonatos caninos desprovidos de imunidade passiva são capazes de responder a estímulos antigênicos vacinais a partir de duas semanas de idade, embora sejam considerados imunocompetentes apenas a partir de seis a 12 semanas. Todavia, somente após os 12 meses os cães atingem concentrações séricas de IgG e IgM semelhantes às do adulto (Day, 2007).

Diante da fragilidade inerente a sua imaturidade ao nascimento, doenças infecciosas e agressões não-infecciosas ocasionam uma alta taxa de mortalidade em neonatos caninos. Tais doenças serão descritas a seguir.

2.2 Causas não-infecciosas de mortalidade fetal e neonatal canina

Dentre as causas não-infecciosas de mortalidade fetal e neonatal canina destaca-se a hipóxia associada a intercorrências durante a transição fetal-neonatal (Dumon, 2005a; Münnich e Küchenmeister, 2014). Com exceção da hipóxia, outras causas não-infecciosas de mortalidade fetal e neonatal canina são eventualmente documentadas na literatura. São citadas agressões físicas, distúrbios genéticos, intoxicações e desequilíbrios nutricionais (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a; Lamm e Njaa, 2012; Münnich e Küchenmeister, 2014).

2.2.1. Hipóxia fetal e neonatal

A hipóxia fetal decorrente de distocia (parto difícil) e consequente retenção do feto no útero ou no canal do parto por mais tempo, é considerada como a principal causa de mortalidade perinatal na espécie canina (Münnich, 2008; Münnich e Küchenmeister, 2014) e está associada a acidose metabólica e respiratória durante o pós-parto imediato (Lúcio et al., 2009). Neonatos caninos provenientes de parto distócico têm o reflexo inspiratório estimulado pelo aumento da concentração de CO₂ ainda no canal de parto, aspirando grandes volumes de líquidos durante a expansão pulmonar, o que compromete a função respiratória logo após o nascimento (Silva et al., 2009b).

Alterações no padrão respiratório e da radiopacidade pulmonar ao exame radiográfico são mais frequentes em neonatos nascidos em partos distócicos ou cirúrgicos do que naqueles nascidos em partos eutócicos. Embora atribuída a deficiente expansão alveolar e presença de líquido no parênquima pulmonar (Silva et al., 2009b), o diagnóstico diferencial relacionado a radiopacidade radiográfica em neonatos caninos hipóxicos requer mais estudos.

A distocia pode ser determinada por causas maternas, causas fetais ou uma associação de ambas. Cadelas de raças de porte pequeno e miniatura são predispostas a distocia, assim como cadelas primíparas com mais de seis anos de idade. As causas maternas incluem estreitamento do canal do parto, anormalidades das vias genitais e inércia uterina, que é caracterizada pela ausência de contrações miométriais, sendo esta última a causa mais frequente (Münnich e Küchenmeister, 2009; Luz et al., 2015). A inércia uterina pode ser classificada em primária, quando ocorre ausência de contrações miométriais, ou secundária, quando a inércia ocorre devido à exaustão depois de contrações improdutivas, como na obstrução do canal de parto ou em ninhadas muito numerosas. A inércia primária na cadela pode decorrer de hiperdistensão uterina, uso de progestágenos, hipocalcemia e gestação com feto único que não induz estímulo endócrino ou mecânico suficiente para desencadear as contrações uterinas (Luz et al., 2015).

Dentre as causas fetais de distocia incluem-se a postura ou apresentação anormais no canal de parto, tamanho excessivo, malformações e fetos mortos que obstruem o canal do parto. A morte fetal é uma causa importante de alterações posturais fetais (Münnich e Küchenmeister, 2009; Luz et al., 2015). São também citadas como causas fetais, a baixa vitalidade dos fetos que não conseguem estimular contrações uterinas vigorosas o suficiente. Por conseguinte, as distocias são também uma consequência de morbidade e mortalidade fetal intrauterina, e, portanto, a casuística de morte fetal ou neonatal associada a distocia deve ser considerada com cautela quanto à sua etiologia primária (Luz et al., 2015).

A distocia pode decorrer também do uso abusivo de ocitocina (Münnich e Küchenmeister, 2009), o que ocasiona a vasoconstrição placentária, desprendimento da placenta e contrações uterinas improdutivas (Dumon, 2005a), com acidose metabólica neonatal mais intensa do que aquela observada em neonatos nascidos sem o uso da ocitocina (Lúcio et al., 2009).

A hipóxia fetal/neonatal pode decorrer ainda da permanência do filhote no interior do saco amniótico após a expulsão, devido a falha do comportamento materno ou falta de assistência durante o parto. A ordem dos filhotes ao nascimento pode também determinar a ocorrência de hipóxia, sendo o primeiro e o último filhotes a nascerem os mais comprometidos, especialmente se encontrarem-se em apresentação posterior (Dumon, 2005a; Luz et al., 2015).

Insuficiência respiratória e hipóxia neonatal podem também ser ocasionadas por: cesariana realizada prematuramente, anestesia com ventilação incorreta da mãe (Dumon, 2005a) e o nascimento por parto cirúrgico, no qual os mecanismos fisiológicos que estimulam a respiração

na transição fetal-neonatal (compressão torácica e tração do cordão umbilical no canal do parto) são comprometidos (Silva et al., 2009b).

Neonatos prematuros nascidos em parto cirúrgico apresentam maior mortalidade com hipóxia, acidose e hipercapnia mais prolongadas do que os neonatos nascidos a termo (Vannucchi et al., 2015).

A produção insuficiente de surfactante ou a imaturidade estrutural pulmonar determinam a síndrome da angústia respiratória neonatal (SARN), especialmente importante em nascimentos prematuros (Vannucchi et al., 2012b). A SARN é caracterizada clinicamente por polipneia, cianose, bradicardia e vocalização expiratória (Dumon, 2005a). Com frequência, neonatos que apresentam estes sinais são afastados da ninhada pela mãe, o que leva a hipotermia. Este é um fator importante que contribui para a dificuldade de sobrevivência dos neonatos caninos prematuros (Dumon, 2005a). A SARN é uma importante causa de morbidade e mortalidade neonatal em diversas espécies, especialmente em prematuros, inclusive em humanos (Manktelow e Baskerville, 1972; Cutz et al., 1978; Vannucchi et al., 2012b). A mortalidade dentre neonatos caninos com SARN é de cerca de 35%, com 90% das mortes ocorrendo até 48 horas após o nascimento (Münnich e Küchenmeister, 2014). A SARN se caracteriza morfológicamente como a “doença das membranas hialinas”, com atelectasia alveolar, hiperemia, dilatação bronquiolar, material eosinofílico (fibrina, eritrócitos e restos celulares) recobrimo o revestimento dos bronquíolos, e edema no interior dos espaços aéreos (Manktelow e Baskerville, 1972; Cutz et al., 1978). Entretanto, dificuldade respiratória pode ocorrer em neonatos humanos relacionada a outras doenças, como sepse, pneumonia, aspiração de mecônio, e asfixia durante o parto, além da SARN (Parkash et al., 2015).

Além de risco de morte por asfixia, na hipóxia fetal ocorre diminuição na frequência cardíaca e aumento na motilidade intestinal, frequentemente com eliminação de mecônio no líquido amniótico e muitas vezes sua aspiração. A hipóxia neonatal grave pode ocasionar ainda lesões na mucosa intestinal que favorecem a translocação bacteriana, o que pode ser uma causa de sepse. Além disso, neonatos hipóxicos podem apresentar perda do reflexo de sucção, com o risco de desenvolverem hipoglicemia e desidratação (Münnich e Küchenmeister, 2014).

2.2.2. Trauma

Lesões traumáticas em neonatos caninos podem ocorrer de forma acidental, devido a alterações comportamentais ou falta de experiência da mãe. As lesões infligidas aos neonatos podem ser representadas por lacerações, esmagamento ou canibalismo (Evans, 1968). Fatores estressantes para a cadela podem ser representados por hospitalização, permanência em ambiente estranho ou em temperatura ambiental inadequada (Dumon, 2005a).

Um trauma importante que pode ocorrer durante o parto é a evisceração do neonato se a cadela tracionar e realizar a avulsão do cordão umbilical. Muitas vezes este trauma evolui com a ingestão dos intestinos do neonato e o canibalismo. Lacerações podem ocorrer durante a tentativa de transportar o neonato. O esmagamento do filhote pela mãe é um trauma que pode ocorrer quando a “cama” é inadequada, ou quando a ninhada não é supervisionada constantemente, principalmente durante o parto e no pós-parto imediato (Evans, 1968; Dumon, 2005a). Em ninhadas órfãs, podem ocorrer lesões cutâneas ou genitais devido a sucção exercida entre os irmãos de ninhada em extremidades do corpo, como membros e genitália (Jonhston et al., 2001).

2.2.3. Transtornos do aleitamento

Cadelas ansiosas ou estressadas podem abandonar a ninhada ou impedir o aleitamento e aquecimento dos neonatos mecanicamente ou por lambedura excessiva, levando a hipotermia, hipoglicemia, desidratação e morte (Fisher, 1982; Dumon, 2005a).

A ausência da produção de leite, chamada agalactia, é observada principalmente em primíparas e em cadelas submetidas a cesariana. Sua etiologia pode estar relacionada a estresse, doença sistêmica, disfunção da secreção de prolactina, má nutrição ou ausência das transformações endócrinas que caracterizam o término da gestação e início do trabalho de parto, devido a partos prematuros vaginais ou cirúrgicos (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a).

É também relevante considerar que a agalactia impede a transferência de imunidade passiva, e que neonatos que não ingerem o colostro logo após o parto terão maior risco de mortalidade neonatal (Fisher, 1982; Mila et al., 2014). Já a galactoestase é caracterizada pela incapacidade de ejeção do leite, geralmente associada a estresse da cadela, decorrente da ausência de liberação ou ação da ocitocina. Ambas podem levar a hipoglicemia, desidratação e hipotermia do neonato (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a).

Em ninhadas muito numerosas, a competição entre os neonatos pode cursar com subnutrição caso a produção láctea da cadela seja insuficiente. Por outro lado, neonatos famintos que ficaram separados da cadela por mais de duas a três horas, podem ingerir quantidades excessivas de leite ocasionando regurgitação e falsa via, ou diarreia osmótica (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a).

2.2.4. Ambiente inadequado

Os fatores ambientais relacionados a mortalidade neonatal canina são a temperatura, a estrutura física, relacionada principalmente a segurança e privacidade, e a cama para o parto e criação da ninhada (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a).

A cadela gestante submetida a estresse ambiental pode sofrer perda fetal (Verstegen et al., 2008). Ambientes estressantes, com barulho e outros animais que ameacem a privacidade e segurança da cadela, podem comprometer o parto e a lactação, pois com a liberação de adrenalina há inibição do efeito da ocitocina (Peterson, 2011; Münnich e Küchenmeister, 2014).

Os ambientes frios, especialmente se houver correntes de ar, podem favorecer a ocorrência de hipotermia nos neonatos, enquanto os ambientes demasiadamente quentes podem levar a desidratação e hipertermia (Johnston et al., 2001; Dumon, 2005a). O desconforto térmico para a cadela, em ambientes muito frios ou muito quentes, pode também gerar estresse e impedir o adequado aleitamento e cuidado com a ninhada (Fisher, 1982).

A “cama” para o parto e criação da ninhada deve permitir que os neonatos sejam protegidos de trauma por esmagamento, sendo construídas com uma barra lateral que propicie a eles um refúgio caso a cadela os comprima contra as paredes laterais ao deitar. A compressão do neonato pelo corpo da mãe contra a lateral ou o fundo da caixa pode gerar fraturas e asfixia por compressão torácica (Dumon, 2005a). A “cama” deve também proporcionar uma fonte de calor segura e ter tamanho adequado para permitir espaço para a cadela amamentar e cuidar dos neonatos (Prats, 2005b; Peterson, 2011). A forração da “cama” deve permitir fácil higienização e movimentação dos neonatos. A forração inadequada pode favorecer a persistência de agentes infecciosos ou fazer com que um neonato fique preso e impedido de mamar, podendo ocorrer a tríade neonatal (Peterson, 2011).

Higiene precária é um importante fator predisponente a inúmeras doenças infecciosas (Verstegen et al., 2008; Peterson, 2011). A desinfecção é importante para a eliminação de fontes de infecção, e deve ser realizada com produtos adequados a cada situação, como, por exemplo, o emprego de cloro nos casos de ambiente contaminado por parvovírus (Fisher, 1982).

2.2.5. Desordens nutricionais durante a gestação

Carências ou excessos nutricionais durante a gestação podem ser responsáveis por malformações fetais (Prats, 2005b). Cadelas obesas têm menos filhotes por ninhada com maior taxa de mortalidade neonatal (Peterson, 2011). Dietas hiperproteicas durante a gestação são citadas como indutoras de deformidades do esqueleto, como a síndrome-do-cão-nadador, caracterizada por abdução dos membros e deformidade torácica (Dumon, 2005a).

O excesso de vitamina A ocasiona mumificação fetal, palatosquise e deformidades da cauda. A cadela gestante deve receber 1.000 UI/kg ao dia, doses superiores a 12.500 UI/kg na dieta entre os dias 17 e 22 da gestação pode levar a malformação (Dumon, 2005a).

O excesso de vitamina D pode levar a ossificação precoce das fontanelas, hipoplasia do esmalte dentário e estenose valvular cardíaca fetal (Dumon, 2005a). A suplementação com vitamina D e cálcio durante a gestação podem também predispor a cadela a hipocalcemia ao final da gestação ou durante a lactação (Johnson et al., 1987; Johnston et al., 2001), o que pode levar a distocia, e alterações comportamentais como agitação, abandono ou mesmo agressão aos filhotes (Peterson, 2011).

2.2.6. Intoxicações e teratogênese

Diversos medicamentos, dependendo da dose, momento e duração da administração, podem induzir malformações fetais em cães. O período mais embriotóxico é aquele que antecede a implantação do embrião, os primeiros 20 dias de gestação (Johnston e Raksil, 1987; Dumon, 2005a). São citados: griseofulvina e outros antifúngicos, progestágenos, corticoides, antibióticos (di-hidroestreptomicina, terramicina, tetraciclina, gentamicina), carbaril, diazinon (Dumon, 2005a).

Morte fetal e aborto foram relatados após a administração de bromocriptina, carbaril, dexametasona, estradiol e prostaglandinas (Johnston e Raksil, 1987).

2.2.7. Distúrbios genéticos

Transtornos genéticos hereditários podem ser determinantes de lesões e doenças que levam a morte fetal ou neonatal com ocorrência familiar em algumas linhagens ou raças específicas (Dumon, 2005a). Por outro lado, anomalias cromossômicas podem decorrer de erros na maturação dos gametas ou na fecundação e ocorrer de forma esporádica (Johnston e Raksil, 1987).

A frequência de anomalias cromossômicas em cães é desconhecida devido à escassez de estudos e de disponibilidade de laboratórios que realizem citogenética em animais. Anormalidades cromossômicas do embrião podem decorrer do envelhecimento dos gametas após a ovulação, resultando em ninhadas com número reduzido de fetos em diversas espécies animais. Em humanos, alterações numéricas cromossômicas são detectadas em mais da metade dos casos de

aborto no início da gestação e polissomias cromossômicas são mais frequentes em gestantes mais velhas (Johnston e Raksil, 1987).

Há raros relatos de natimortalidade, malformações e subdesenvolvimento em fetos caninos portadores de polissomias cromossômicas. Malformações múltiplas em um mesmo feto canino portador de polissomia cromossômica incluem: palatosquise, agenesia óssea, artrogripose, hérnia diafragmática, ectopia visceral, atresia ani, fontanelas cranianas abertas, lordose e persistência do arco aórtico direito. Em outros casos, é relatada a ocorrência de hidrocefalia, agenesia vertebral focal, hipospádia e criptorquidismo bilateral combinados a polissomia de cromossomos sexuais (Johnston e Raksil, 1987).

Malformações ósseas hereditárias são consideradas possíveis causas de mortalidade neonatal. Em buldogues, osteocondrodisplasia é caracterizada por abdução dos membros pélvicos e torácicos (síndrome-do-cão-nadador) e achatamento dorsoventral do tórax (*pectus excavatum*) com arqueamento das costelas, concavidade na superfície do esterno, redução do volume torácico, dispneia e morte (Louw, 1983; Fossum, 1993). A deformidade torácica pode cursar com alterações respiratórias e cardíacas devido ao mal posicionamento do coração (Fossum, 1993). Esta condição pode ser favorecida por dietas hiperproteicas (Dumon, 2005a). Hemivértebra pode ocorrer associada a estas alterações torácicas e perpendiculares em neonatos caninos. Hemivértebra muitas vezes é assintomática, ou produz sinais neurológicos por compressão medular em filhotes mais velhos (Drew, 1974). A osteocondrodisplasia parece ser determinada por herança autossômica recessiva (Louw, 1983).

Malformações cardíacas podem ser hereditárias e levar a morte fetal ou neonatal. Em uma colônia de cães da raça Boxer com estenose subaórtica idiopática, a mortalidade neonatal foi de 50%, e foi atribuída à severidade das alterações cardíacas e ao baixo peso ao nascer apresentado pelos neonatos. Contudo, fertilidade, gestação e parto não foram comprometidas (Johnson et al., 1987).

A palatosquise ocorre com maior frequência em cães braquicefálicos, com um padrão que sugere herança poligênica. Todavia, a intoxicação por vitamina A também é citada como uma possível causa de palatosquise (Dumon, 2005a).

Doenças metabólicas hereditárias, como a doença de armazenamento de glicogênio (glicogenose) podem cursar com natimortalidade e mortalidade neonatal em cães. Cães da raça Maltês podem ser portadores de uma mutação no gene que codifica a glicose-6-fosfatase, o que caracteriza a doença de armazenamento de glicogênio do tipo Ia (Brix et al., 1995). Natimortalidade e mortalidade neonatal, e, principalmente, ao desmame, ocorrem em cães portadores desta mutação. Os animais acometidos apresentam degeneração por acúmulo de glicogênio em hepatócitos e epitélio tubular, além de subdesenvolvimento, apatia e emaciação. Lesões decorrentes de uremia podem também estar presentes, como pneumopatia urêmica (Brix et al., 1995; Kishnani et al., 2001).

O edema linfático congênito, determinado por gene autossômico dominante, pode ser uma etiologia de anasarca congênita, entretanto a anasarca pode ser também secundária a malformações cardíacas (Dumon, 2005a) ou decorrente de infecção pelo vírus diminuto dos caninos (Carmichael et al., 1991).

2.2.8. Distúrbios hormonais

O exame físico de cadelas com histórico de perdas gestacionais (aborto e natimortalidade) deve incluir avaliação de alterações sugestivas de distúrbios endócrinos. A avaliação clínica completa e exames laboratoriais de rotina auxiliam no direcionamento do diagnóstico, que pode ser confirmado apenas com dosagens hormonais apropriadas (Verstegen et al., 2008).

Hipoluteoidismo caracteriza-se pela insuficiência da concentração de progesterona plasmática para a manutenção da gestação, ocasionando morte embrionária ou fetal. É uma alteração pouco documentada na literatura, e não há estudos que confirmem a existência de insuficiência luteínica primária na cadela (Johnston et al., 2001; Kustritz, 2005; Verstegen et al., 2008). Os casos relatados ocorreram por volta de 25 a 30 dias de gestação. Estudos experimentais indicam que a concentração plasmática menor que 2 a 3 ng/mL por 24 a 48 horas resulta em perda gestacional. Quando a concentração é menor do que 5 ng/mL, a suplementação hormonal é indicada (Verstegen et al., 2008).

Entretanto, a correlação entre a baixa concentração sérica de progesterona com a morte fetal em uma cadela no momento em que ocorre a perda da gestação deve ser considerada com cautela, pois deve-se investigar se a morte fetal foi decorrente do hipoluteodismo ou de alguma outra causa que levou a falha da função do corpo lúteo. O mecanismo responsável pela insuficiência do corpo lúteo não é conhecido (Johnston et al., 2001; Verstegen et al., 2008), mas sabe-se que o sofrimento fetal ocasiona a redução da produção de progesterona (Kustritz, 2005).

O hipotireoidismo é a endocrinopatia mais diagnosticada em cães, todavia, há poucas informações sobre sua correlação com morte fetal canina. Em mulheres, a insuficiência tireoidiana está relacionada a aborto, partos prematuros e natimortalidade. Em cães, casos de abortos, mumificação fetal e natimortalidade são atribuídos ao hipotireoidismo, mas não há estudos sistematizados para investigação da causa de mortalidade fetal e neonatal em cadelas gestantes portadoras de hipotireoidismo (Johnson et al., 1987; Johnston et al., 2001).

Em uma colônia de Borzois, tireoidite linfocítica pareceu ser uma característica determinada por herança recessiva. Nestes cães, a infertilidade era um grave problema. Aborto no terço médio da gestação, mumificação fetal e natimortalidade foram comuns. Predisposição racial e familiar são frequentes nos casos de hipotireoidismo canino (Johnson et al., 1987).

2.3. Causas infecciosas de mortalidade fetal e neonatal canina

A morte fetal ou neonatal associada a infecções pode decorrer de placentite, sem acometimento direto dos tecidos fetais pelo agente, de infecção direta do feto ou neonato com lesões inflamatórias, ou de malformações e sequelas decorrentes da infecção (Verstegen, 2008; Münnich e Küchenmeister, 2014). Ainda, o adoecimento da cadela pode levar à morte fetal/neonatal, sem a infecção direta do filhote ou da placenta (Johnson et al., 1987).

A infecção da cadela com frequência compromete a viabilidade da gestação, podendo ocasionar morte embrionária, aborto, natimortalidade, nascimento de filhotes fracos ou morbidade e mortalidade de neonatos após o parto (Johnson et al., 1987; Lamm e Njaa, 2012). Embora a cadela muitas vezes não apresente sinais clínicos nem alterações hematológicas, o agente infeccioso pode causar severas lesões fetais (Johnson et al., 1987; Verstegen, 2008). Ocasionalmente, secreção vaginal purulenta ou hemorrágica em cadelas gestantes pode representar um indício de morte fetal (Kornblatt et al., 1983; Sahin et al., 2014). O aborto e/ou mortalidade perinatal é muitas vezes o

único sinal clínico relatado em casos de infecção fetal ou placentária (Caldow e Graham, 1998; Sahin et al., 2014).

Em muitos casos de mortalidade neonatal atribuída a causas infecciosas relata-se a morte súbita do neonato na ausência de sinais clínicos (Vela et al., 2006; Lamm et al., 2010). Contudo, diarreia é uma alteração frequente em infecções neonatais (Dumon, 2005a), e dispneia, hemoptise e hipotermia podem também ocorrer (Kornblatt et al., 1983). A ausência de ganho de peso é um importante sinal de doença no neonato, por isso o monitoramento diário do peso a partir do nascimento é essencial para o diagnóstico precoce de doenças (Prats, 2005b).

Algumas condições que podem ser predisponentes à infecção neonatal em cães são: hipóxia, hipotermia, hipoglicemia, desidratação, e falha na ingestão de colostro (Münnich e Küchenmeister, 2014). As fontes de infecção para o neonato canino são muitas vezes a própria mãe, sua cavidade oral, fezes (Münnich e Lübke-Becker, 2004), secreção vaginal (Münnich e Lübke-Becker, 2004; Groppetti et al., 2012), e leite (Schäfer-Somi et al., 2003; Münnich e Lübke-Becker, 2004). Em alguns casos, a infecção pode ser proveniente do alimento ingerido pela cadela, como no aborto por *Salmonella* (Caldow e Graham, 1998).

Há forte correlação negativa entre a mortalidade perinatal canina e os níveis séricos de imunoglobulinas. Neonatos com concentração sérica de imunoglobulinas menor ou igual a 230 mg/dL apresentaram menor taxa de sobrevivência (Mila et al., 2014). Nos cães, o período de melhor absorção de imunoglobulinas é curto, até cerca de 6 horas após o nascimento (Chastant-Maillard et al., 2012) e formas eficientes de compensar as falhas na transferência de imunidade passiva ainda não foram estabelecidas, o que torna a imunodeficiência um risco frequente para o neonato canino (Mila et al., 2014).

Neste contexto, as infecções são consideradas uma importante causa de mortalidade perinatal na espécie canina (Münnich, 2008; Lamm e Njaa, 2012). Em humanos, as infecções são apontadas como a principal causa de mortalidade neonatal (Shah e Padbury, 2014).

O resultado da infecção bacteriana fetal ou neonatal é a sepse, condição clínico-patológica caracterizada por alterações conhecidas como "síndrome da resposta inflamatória sistêmica". Nos adultos, a sepse é caracterizada por sinais clínicos típicos, como febre, leucocitose, taquicardia e taquipneia (Silverstein e Otto, 2012). Entretanto, a resposta de fetos e neonatos caninos a agressões pró-inflamatórias difere daquela dos adultos em alguns aspectos, especialmente em razão de sua imaturidade imunológica e metabólica. Neonatos caninos são incapazes de desenvolver febre nos primeiros dias de vida devido a imaturidade hipotalâmica. Ao contrário, apresentam hipotermia e hipoglicemia quando desenvolvem sepse, o que piora muito o prognóstico devido à grande probabilidade de evoluírem com a síndrome da "tríade do recém-nascido" (Münnich, 2008; Münnich e Küchenmeister, 2014).

As infecções bacterianas são consideradas a principal causa infecciosa de mortalidade fetal e neonatal canina (Münnich, 2008; Graham e Taylor, 2012). A *Brucella canis* é citada por muitos autores como um agente bacteriano muito importante como causa de aborto, natimortalidade e morte neonatal na espécie canina (Pretzer, 2008a; Givens e Marley, 2008; Graham e Taylor, 2012; Lamm e Njaa, 2012). Todavia, os agentes bacterianos isolados com mais frequência em casos de sepse neonatal canina são a *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae* (Nielen et al., 1998; Münnich, 2008; Meloni et al., 2014). Em casos de aborto, são também relatados, de forma esporádica, a infecção por *Salmonella enterica* (Caldow e Graham, 1998; Philbey et al., 2014) e *Campylobacter jejuni* (Pretzer, 2008a; Sahin et al., 2014).

Dentre os agentes virais, o herpesvírus canino e o vírus diminuto dos caninos são os mais estudados (Decaro et al., 2012a). Há ainda raríssimos relatos de infecção perinatal pelo parvovírus canino (Carpenter et al., 1980; Lenghaus e Studdert, 1982), adenovírus canino (Spalding et al., 1964; Almes et al., 2010) e vírus da cinomose canina (Pandher et al., 2006). Entretanto, a importância epidemiológica destes agentes carece de mais estudos. Os poucos levantamentos publicados indicam baixa prevalência de lesões virais em casos de mortalidade fetal e neonatal canina (Nielen et al., 1998; Larsen et al., 2015; Young et al., 2015).

Os agentes protozoais são pouco estudados e pouco relatados em fetos e neonatos caninos. Ocorre transmissão transplacentária de *Leishmania infantum* (Pangrazio et al., 2009), *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (Taques et al., 2016). Contudo, a mortalidade neonatal decorrente de infecção natural está documentada apenas em dois relatos referentes a *N. caninum* (MacAllister et al., 2016; Reis et al., 2016).

A seguir, serão descritos aspectos relevantes da infecção de fetos e neonatos caninos.

2.3.1. Agentes bacterianos

2.3.1.1. *Brucella canis*

A brucelose em cães é classicamente relacionada a infecção por *Brucella canis*, embora o cão seja também susceptível a infecção por *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* (Greene e Carmichael, 2012). *Brucella* spp. é um cocobacilo Gram-negativo associado a mortalidade fetal e neonatal em diferentes hospedeiros, lesões inflamatórias em múltiplos órgãos e é um agente zoonótico importante em muitas regiões do mundo (Hollett, 2006; Xavier et al., 2009a).

Os micro-organismos do gênero *Brucella* pertencem ao filo α -Proteobacteria, que também inclui importantes patógenos intracelulares dos gêneros *Bartonella* e *Rickettsia* e patógenos de plantas, dentre outros, além de micro-organismos simbioses (Moreno et al., 2002). Recentemente, uma nova espécie do gênero *Brucella* foi proposta, isolada de raposas vermelhas na Áustria (Scholz et al., 2016), unindo-se a outras 10 espécies que compõem o gênero (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis*, e *B. pinnipedialis*), distintas entre si por características fenotípicas e seletividade de seus respectivos hospedeiros (Olsen e Palmer, 2014) Além disso, outras espécies tem sido identificadas, incluindo a *B. pappionis*, associada a aborto em babuínos (Whatamore et al., 2014), uma espécie móvel, isolada de anfíbios (Eisenberg et al., 2012) e um isolado ainda não classificado taxonomicamente, que foi obtido de lontra marinha (Miller et al., 2017).

Descrita pela primeira vez por Carmichael (1966), relacionada a uma epidemia de abortos em cães da raça Beagle, *B. canis* é, desde então, sempre destacada como importante causa de mortalidade fetal e neonatal e de infertilidade na espécie canina (Carmichael, 1966; Fisher, 1982; Pretzer, 2008a; Graham e Taylor, 2012). No Brasil, a infecção por *B. canis* em cães de canis comerciais é frequente (Keid et al., 2004; Keid et al., 2017).

Na população canina, a brucelose geralmente está relacionada a infecção por *B. canis*. Entretanto, dependendo de exposição a fontes não usuais de infecção, os cães podem ser infectados por outras espécies do gênero, como a *B. abortus* em cães que vivem em áreas rurais (Wareth et al., 2016) ou a *B. suis* em cães de caça que tem contato com suídeos selvagens. Contudo, *B. suis* pode também ser isolada de cães de áreas urbanas (James et al., 2017).

A infecção fetal pode ocorrer pela via transplacentária e a infecção neonatal pelo contato com as secreções maternas, especialmente o leite e a secreção vaginal. Em adultos, a infecção dos cães se dá através do contato de mucosas dos cães susceptíveis com secreções que contenham o agente, principalmente as secreções do cio, parto e pós-parto, mas também o sêmen e a urina, e, de forma importante, pela ingestão de fetos e placentas após o aborto (Wanke, 2004; Hollett, 2006; Greene e Carmichael, 2012). A transmissão é geralmente direta, de cão para cão, pois o agente não se multiplica no ambiente, mas pode ser veiculado via fômites (Olsen e Palmer, 2014).

A alteração clínica mais relacionada ao diagnóstico de brucelose canina é o aborto de fetos mortos ou vivos, entre 45-55 dias de gestação (Carmichael, 1966; Holst et al., 2012; Kaden et al., 2014), muitas vezes sem nenhum sinal de doença prévia na cadela, seguido de secreção vaginal mucoide ou serossanguinolenta, marrom ou esverdeada a acinzentada, por 1 a 6 semanas. Os cães adultos infectados geralmente aparentam boa saúde apesar de prolongada bacteremia (Carmichael e Kenney, 1970). Uma cadela infectada com histórico de aborto pode desenvolver gestação posterior sem mortalidade fetal/neonatal (Carmichael, 1966; Carmichael e Kenney, 1970) ou pode ocorrer mortalidade fetal e/ou neonatal de forma intermitente. Todavia, a infecção por *B. canis* não interfere no ciclo estral (Greene e Carmichael, 2012).

Morte e reabsorção embrionária e fetal, com até 40 dias de gestação, foram também relatados (Carmichael e Kenney, 1970; Greene e Carmichael, 2012) e clinicamente podem parecer falha na concepção (Carmichael, 1966). Filhotes gerados a termo podem ser natimortos ou nascerem vivos, todavia, a mortalidade perinatal é geralmente alta. Nos filhotes que sobrevivem ao desmame, são relatados linfadenomegalia generalizada por hiperplasia linfoide, hiperglobulinemia, febre transitória, leucocitose, convulsões, pelo seco e perda de vigor (Greene e Carmichael, 2012).

Nos casos de aborto, placentite é uma lesão importante e os fetos podem se apresentar em diferentes estágios de autólise, com edema, congestão e hemorragia no subcutâneo da região abdominal, mais acentuados na área periumbilical (Carmichael, 1966; Carmichael e Kenney, 1970), com quantidade moderada de efusão serossanguinolenta peritoneal (Greene e Carmichael, 2012). Falha no desenvolvimento normal dos pelos em fetos abortados é associada à infecção por *B. canis* por Carmichael (1966). Carmichael e Kenney (1970) relataram leucócitos no interior do estômago e intestinos fetais, e sugeriram que este pudesse ser um indício de infecção por ingestão de líquido amniótico, que contém alta concentração bacteriana.

As lesões fetais incluem broncopneumonia, miocardite, hemorragia renal multifocal com infiltrado de linfócitos e macrófagos no interstício e região perivascular da pelve, além de linfadenite e hepatite. Frequentemente, no fígado, há infiltrado linfocitário com alguns neutrófilos ao redor das veias sublobulares com pequenos focos de necrose em região portal (Carmichael e Kenney, 1968). As lesões da infecção por *Brucella* em neonatos caninos não se encontram descritas na literatura e serão discutidas neste estudo, embora seja relatado o isolamento de *B. canis* do sangue de neonatos com cinco dias de idade, nascidos de duas cadelas infectadas experimentalmente (Carmichael e Kenney, 1968).

Nos cães adultos infectados por *Brucella*, as alterações macroscópicas mais frequentes são linfadenomegalia e esplenomegalia (Carmichael, 1966; Moore e Kakuk, 1969; Carmichael e Kenney, 1970; Greene e Carmichael, 2012). Em cães inoculados experimentalmente, os órgãos linfoides são sempre afetados. Nas placas de Peyer ocorre hiperplasia linfoide difusa, aumento no número de figuras de mitose nos centros germinativos dos folículos linfoides e, por vezes, neutrófilos. Nos seios dos linfonodos e no baço, há grande quantidade de plasmócitos e macrófagos, com a formação de granulomas (Carmichael e Kenney, 1970). Em alguns casos, os

seios linfoides também contêm neutrófilos. No baço, a proliferação de células reticulares e o infiltrado de plasmócitos é mais frequente do que nos linfonodos. A bactéria na forma de cocobacilo pode ser observada no citoplasma dos macrófagos com o emprego de colorações especiais (Moore e Kakuk, 1969).

Nos machos adultos, são frequentes epididimite e atrofia testicular associados a esterilidade, linfadenomegalia, dermatite e edema escrotal, relutância em copular e prostatite (Carmichael e Kenney, 1970, Greene e Carmichael, 2012). No espermograma, células inflamatórias associadas a alterações no sêmen como espermatozóides imaturos, deformidade de acrossomo, cauda dobrada, edema de peça intermediária, caudas duplas, cabeças isoladas, gotas citoplasmáticas, aglutinação cabeça-cabeça, e redução da motilidade são alterações frequentes que com o tempo evoluem para azoospermia (Greene e Carmichael, 2012).

As lesões inflamatórias mais proeminentes nos cães adultos ocorrem na próstata, epidídimo e útero gestante, sendo mais discretas na pelve renal, ductos deferentes, bexiga urinária e ureter (Carmichael e Kenney, 1970). Microscopicamente, há necrose extensa do parênquima prostático e túbulos seminíferos associada a infiltrado inflamatório, espessamento da túnica albugínea com atrofia e fibrose testicular. Por vezes, apenas degeneração do epitélio seminífero é observada, restando apenas espermatogônias e células de Sertoli, com grave comprometimento da espermatogênese bilateral ou unilateral (Moore e Kakuk, 1969). Endometrite subaguda a crônica pode ser observada no útero, com hiperplasia glandular e nódulos de células reticulares. Em fêmeas pós-púberes não gestantes pode ocorrer vulvite discreta (Carmichael e Kenney, 1970). Pode ocorrer vasculite necrosante nos órgãos alvo dos esteróides gonadais: próstata, escroto, prepúcio e vulva (Greene e Carmichael, 2012).

Miocardite, meningoencefalite, necrose hepática focal associada a granulomas e infiltrado focal de linfócitos na vesícula biliar são lesões extragenitais frequentes (Carmichael e Kenney, 1970). Alterações renais ocorrem em alguns cães, caracterizadas por nefrite intersticial discreta e hialinização da membrana basal glomerular com mínimo infiltrado ou proliferação celular. Ainda, discospondilite, osteomielite e poliartrite podem ocorrer associadas a claudicação, paresia e ataxia na infecção por *B. canis* (Greene e Carmichael, 2012).

Sinais clínicos de doença ocular são descritos em cães adultos, como opacidade de córnea e glaucoma, devido às reações sistêmicas inflamatórias associadas a brucelose canina (Greene e Carmichael, 2012). Infecção ocular direta também ocorre e sinais clínicos oftálmicos diversos, como cegueira e blefaroespasma, podem constituir a queixa clínica principal, especialmente em animais castrados. As lesões oculares relacionadas a infecção por *B. canis* incluem hifema, edema corneano, iridociclite granulomatosa, neurite do nervo óptico e coriorretinite exsudativa com infiltrado difuso de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. O endotélio corneano apresenta vacuolização com variável infiltrado de plasmócitos. Exsudato com leucócitos pode estar presente na câmara anterior (Ledbetter et al., 2009b).

A resolução espontânea da bacteremia pode ocorrer meses ou anos após a infecção, e coincide com redução da titulação de anticorpos circulantes. Após a bacteremia, a bactéria pode persistir em órgãos como a próstata ou epidídimos. Cura espontânea da infecção foi documentada, podendo chegar a 50% dos animais infectados (Moore e Kakuk, 1969). Os cães que apresentaram eliminação espontânea da *B. canis* tornaram-se imunes a reinfeção (Carmichael e Kenney, 1970, Greene e Carmichael, 2012).

Colorações especiais devem ser utilizadas para visualização do agente, por exemplo, a coloração de Brown-Brenn (Greene e Carmichael, 2012) ou o tricrômico de Brabeito-Lopez (Moore e

Kakuk, 1969). A imuno-histoquímica é uma técnica muito interessante para a detecção de *Brucella* nos tecidos e é descrita em bovinos infectados experimentalmente por *B. abortus* (Xavier et al., 2009b), entretanto, o diagnóstico de brucelose em cães por métodos imuno-histoquímicos não fora descrito anteriormente na literatura, sendo um dos aspectos de originalidade da presente tese.

O diagnóstico preciso da brucelose canina é especialmente relevante devido a sua importância zoonótica, ao impacto que a doença pode produzir em um plantel e a dificuldade para a eliminação do agente, tanto do cão infectado como do plantel de criação de um canil (Pickerill e Carmichael, 1972; Makloski et al., 2011). Nos casos de mortalidade fetal ou neonatal, amostras indicadas para a detecção da *Brucella* são baço, pulmão e linfonodos, além da placenta e do conteúdo gástrico de fetos abortados ou de natimortos, (Greene e Carmichael, 2012). Dos adultos, amostras frequentemente empregadas para o diagnóstico são o sangue ou swab de secreção vaginal (Keid et al., 2009).

O isolamento e caracterização microbiológica do isolado são o diagnóstico padrão ouro na brucelose. Entretanto, o cultivo da *Brucella* spp. é complicado por ser um organismo de crescimento lento, que requer meios de cultivo enriquecidos e seletivos e que impõe risco zoonótico, devendo ser preferencialmente realizado em laboratórios com nível 3 de biossegurança (Bricker, 2002; Mol et al., 2014). O cultivo da *B. canis* pode ser realizado em caldo triptose, ágar tripticase de soja ou dextrose, e deve-se ter o cuidado de manter a incubação por até 30 dias com repiques periódicos, devido ao lento crescimento de *Brucella* spp. A identificação após o isolamento pode ser realizada por métodos fenotípicos, bioquímicos e moleculares (Keid et al., 2007b; Mol et al., 2014).

Diante do risco biológico e limitações do isolamento, a PCR é uma técnica interessante para o diagnóstico da brucelose canina. É relatada com sucesso em amostras de sangue, sêmen e swab vaginal (Keid et al., 2007a; Keid et al., 2009). Entretanto, devido a possibilidade de bacteremia intermitente e dificuldade de crescimento *in vitro* da *B. canis*, podem ocorrer resultados de cultivo e PCR falso-negativos (Greene e Carmichael, 2012; Mol et al., 2014).

Métodos sorológicos são muito utilizados para o diagnóstico da brucelose canina. Entretanto, em geral, estes testes apresentam sensibilidade e especificidade menores do que o cultivo e a PCR (Keid et al., 2004; Keid et al., 2009). Todavia, devido a bacteremia intermitente de *B. canis* e possibilidade de ocorrência de resultado falso-negativo em cultivo e PCR, os métodos sorológicos são indicados, apesar de, em alguns casos, apresentarem resultados inconsistentes (Escobar et al., 2010). Contudo, a positividade sorológica é detectável geralmente a partir de 12 semanas após a infecção, antes disso, a hemocultura apresenta maior sensibilidade. Após este período, verifica-se boa sensibilidade e especificidade na imunodifusão em gel de ágar (IDGA) realizada com antígenos de membrana de *B. canis*, mas apenas durante a fase de bacteremia. Com o emprego de antígenos citoplasmáticos de *B. canis* a positividade é detectável até seis meses após a hemocultura tornar-se negativa (Zoha e Carmichael, 1982).

A IDGA, na maioria das vezes, é realizada com antígenos de membrana de *B. ovis*. O teste de soroaglutinação rápida (RSAT), assim como o emprego do 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT) também são descritos com o uso de antígenos de *B. ovis* (Keid et al., 2007b). Segundo Escobar et al. (2010), especificidade e sensibilidade de provas sorológicas que empregam antígenos de *B. canis*, *B. ovis* e *B. abortus* RB51 são equivalentes. Todavia, resultados sorológicos falso-negativos são relatados em animais bacterêmicos (Dentringer et al., 2014), inclusive após a ocorrência de aborto (Holst et al., 2012).

Deve-se estar atento a ausência de reação cruzada entre anticorpos anti-*Brucella rugosa* (*B. canis* e *B. ovis*) e antígenos de brucelas lisas (*B. abortus* e *B. suis*) ao se optar pelo antígeno a ser utilizado para o diagnóstico de cães, que, na grande maioria das vezes, são infectados por *B. canis* (Mol et al., 2014). Contudo, a possibilidade de infecção de cães por *B. suis* (James et al., 2017) e *B. abortus* (Wareth et al., 2016) evidencia a necessidade de desenvolvimento de métodos sorológicos que possibilitem o diagnóstico de infecção canina por brucelas lisas e rugosas.

A brucelose canina representa um desafio diagnóstico (Lucero et al., 2010; Maklosky, 2011; Holst et al., 2012). Considerada importante como causa de mortalidade fetal e neonatal, deve sempre ser incluída dentre os diagnósticos diferenciais destes casos (Wanke, 2004; Graham e Taylor, 2012; Greene e Carmichael, 2012). Para o controle e erradicação da brucelose em canis comerciais, é fundamental o emprego de métodos com alta sensibilidade e especificidade (Pickerill e Carmichael, 1972; Maklosky, 2011), pois cadelas portadoras da infecção por *Brucella* que transmitiram o agente para seus fetos podem ter resultados falso-negativos em sorologia (Holst et al., 2012) e PCR (Taqes et al., 2016).

O presente trabalho contribui com a caracterização anatomopatológica de casos naturais de brucelose perinatal canina, muito importante para fundamentar o diagnóstico em casos de mortalidade fetal e neonatal. As informações disponíveis até o momento baseiam-se em estudos experimentais (Carmichael e Kenney, 1970).

2.3.1.2. *Streptococcus* spp.

Streptococcus spp. são bactérias em forma de cocos, Gram-positiva, anaeróbicas facultativas, presentes na microbiota normal de mamíferos e em infecções piogênicas localizadas ou generalizadas em animais e humanos (Greene e Prescott, 2012). Embora a ocorrência de *Streptococcus* spp. na microbiota vaginal de cadelas tenha sido associada a menor frequência de infecções no diestro, *Streptococcus* β -hemolítico é reconhecido como causa de aborto canino (Groppetti et al., 2012) e *S. canis*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus* são relacionados a mortalidade fetal e neonatal em cães (Lamm et al., 2010).

A precisa identificação das espécies e subespécies de *Streptococcus* isoladas de casos de infecção e sepsis é importante para melhor interpretação da relevância clínico-patológica do diagnóstico, visto que há *Streptococcus* que podem se comportar como comensais ou patogênicos, e pertencer a grupos sorológicos distintos com diferentes perfis de patogenicidade (Greene e Prescott, 2012). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* foi associado a pneumonia lobar fatal em neonatos caninos com até 72 horas de nascidos e morte súbita (Vela et al., 2006) e *S. agalactiae* foi identificado em neonatos de duas ninhadas que morreram com pneumonia e/ou congestão generalizada (Kornblatt et al., 1983).

Em casos de infecção perinatal por *Streptococcus*, as alterações macroscópicas muitas vezes são mínimas. Septicemia e broncopneumonia, por vezes hemorrágica, são relacionadas à infecção por *Streptococcus* em neonatos (Lamm et al., 2010). Consolidação pulmonar multifocal por pneumonia necro-hemorrágica, vasculite e congestão generalizada, são citados em associação a infecção neonatal por *S. dysgalactiae* (Vela et al., 2006) e *S. agalactiae* (Kornblatt et al., 1983).

Ao exame microscópico, as lesões associadas a infecção por *Streptococcus* frequentemente são caracterizadas por necrose com infiltrado inflamatório de intensidade variável, podendo inclusive apresentar inflamação mínima ou ausente (Lamm et al., 2010; Graham e Taylor, 2012). Nos

pulmões, intenso infiltrado neutrofílico muitas vezes associa-se a necrose, fibrina e hemorragia. Êmbolos de cocos bacterianos podem estar presentes em vasos sanguíneos de vários órgãos, com vasculite e necrose da parede vascular e tecidos adjacentes (Lamm et al., 2010), ou no interior de alvéolos e bronquíolos (Vela et al., 2006). O infiltrado na parede vascular pulmonar foi constituído predominantemente por neutrófilos e macrófagos na infecção por *S. dysgalactiae* com hemorragias microscópicas em diversos órgãos (Vela et al., 2006). Pielonefrite ascendente neonatal também está relacionada ao *S. agalactiae*. Entretanto, neonatos com cultivo positivo para este agente podem apresentar congestão generalizada apenas, indicativa de choque circulatório, na ausência de lesões inflamatórias (Kornblatt et al., 1983).

O diagnóstico da infecção fetal e neonatal por *Streptococcus* sp. pode ser realizado mediante o isolamento do agente a partir de amostras de tecidos em meios de cultura de rotina, como o ágar sangue (Graham e Taylor, 2012). A identificação do isolado pode ser realizada por métodos bioquímicos, sorológicos e moleculares (Vela et al., 2006). É importante a correlação do agente com lesões teciduais características e a investigação da possibilidade de coinfeções com outros agentes bacterianos e com agentes virais (Lamm et al., 2010).

2.3.1.3. *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. são cocos bacterianos Gram-positivos e espécies deste gênero bacteriano são comuns na microbiota normal dos cães (Saijonmaa-Koulumies e Lloyd, 2002; Gropetti et al., 2012). Diferentes espécies de *Staphylococcus* estão relacionadas a quadros patogênicos em neonatos caninos (Schäfer-Somi et al., 2003; Rota et al., 2011; Meloni et al., 2014), mesmo aquelas presentes na microbiota de animais saudáveis, as quais ganharam maior importância com a emergência de cepas resistentes a meticilina (Kawakami et al., 2010; Moodley et al., 2014) e devido a sua importância zoonótica (Somayaji et al., 2016).

Staphylococcus pseudintermedius é considerado um importante agente em casos de sepse neonatal e pode estar presente no leite ou na vagina das cadelas, que servem como fonte de infecção para os neonatos (Rota et al., 2011). Outros *Staphylococcus* são descritos em estudos de isolamento bacteriano de neonatos caninos, como *S. haemolyticus*, *S. simulans* (Schäfer-Somi et al., 2003) e *S. aureus* (Meloni et al., 2014). Todavia, as lesões fetais e neonatais em caninos portadores de infecção por *Staphylococcus* não estão descritas na literatura científica.

Staphylococcus spp. são organismos de fácil isolamento por métodos de rotina, contudo sua identificação requer a realização de provas bioquímicas laboriosas para a distinção entre as inúmeras espécies do gênero (Sasaki et al., 2007). Métodos moleculares podem auxiliar na distinção entre espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (Bannoehr et al., 2009).

2.3.1.4. Enterobacteriaceae e outras bactérias Gram-negativas

A família Enterobacteriaceae inclui bacilos ou cocobacilos Gram-negativos indutores de sepse (Koenig, 2012), como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (Nielen et al., 1998; Münnich, 2008; Meloni et al., 2014). Algumas cepas de *E. coli* são consideradas organismos patogênicos primários, enquanto *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e a maioria das cepas de *E. coli*, são considerados organismos oportunistas (Koenig, 2012). Outro organismo Gram-negativo ocasionalmente isolado em necropsia de neonatos caninos, não pertencente à família Enterobacteriaceae, é *Pseudomonas aeruginosa* (Münnich, 2008; Meloni et al., 2014).

E. coli é um bacilo anaeróbico facultativo, Gram-negativo, parte da microbiota intestinal e genitourinária de animais saudáveis (Graham e Taylor, 2012) e frequentemente isolado de amostras coletadas em necropsia de fetos e neonatos caninos (Nielen et al., 1998; Schäfer-Somi et al., 2003; Meloni et al., 2014; Münnich, 2008). Mais da metade das cepas de *E. coli* isoladas de neonatos caninos correspondem a cepas provenientes de amostras vaginais de suas respectivas mães. Outras fontes de infecção de *E. coli* para os neonatos são as fezes, o leite e a cavidade oral da cadela (Münnich e Lübke-Becker, 2004). A emergência de cepas de *E. coli* com resistência a múltiplos antimicrobianos é um problema na medicina veterinária e uma preocupação para a saúde pública (Koenig, 2012)

Em cães adultos, cepas comensais de *E. coli* que habitam o intestino raramente causam doença, e cepas patogênicas com potencial de causar infecção em locais extraintestinais podem ocorrer simultaneamente na microbiota intestinal. Estas cepas possuem genes de virulência capazes de vencer as defesas do hospedeiro, realizar invasão e produzir toxinas (Koenig, 2012). Enquanto apenas cepas patogênicas são capazes de secretar exotoxinas, todas as cepas de *E. coli* liberam endotoxinas quando ocorre a lise celular, que podem desencadear a síndrome da resposta inflamatória sistêmica nos casos de sepse associada a infecção por *E. coli* (Graham e Taylor, 2012; Koenig, 2012).

Alterações morfológicas associadas a infecção por *E. coli* nos cães dependem da cepa, e podem variar desde lesões mínimas, com as células bacterianas aderidas a porção apical dos enterócitos, até a ocorrência de necrose do topo das vilosidades, edema e infiltrado de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos na lâmina própria, enterite fibrinonecrotica e trombose de vasos da lâmina própria. Lesões extraintestinais incluem pneumonia, meningite, nefrite e necrose fibrinoide de vasos cutâneos com necrose da epiderme (Koenig, 2012). Todavia, as alterações morfológicas dos fetos e neonatos caninos associadas a infecção por *E. coli* não estão descritas na literatura, apesar de seu isolamento frequente (Nielen et al., 1998; Münnich e Lübke-Becker, 2004; Meloni et al., 2014).

K. pneumoniae é encontrada na nasofaringe e na microbiota intestinal, e pode ser isolada de casos graves de bacteremia, infecções respiratórias, gastrintestinais, e gênito-urinárias em cães (Koenig, 2012), além de estar presente em casos de mastite em cadelas e em seus respectivos neonatos mortos devido a sepse bacteriana (Schäfer-Somi et al., 2003). Como nos outros casos de isolamento bacteriano, as lesões relacionadas a infecção neonatal por *K. pneumoniae* não se encontram descritas na literatura.

Salmonella enterica é também uma espécie da família Enterobacteriaceae. A espécie *S. enterica* inclui mais de 2400 sorotipos, identificados através de reação de soroaglutinação (Greene, 2012b). Salmonelose em cães pode se manifestar como aborto, natimortalidade e metrite, além de gastroenterite hemorrágica e morte, embora os relatos sejam ocasionais (Morse et al., 1976, Philbey et al., 2014). Podem ocorrer ainda meningoencefalite e artrite (Philbey et al., 2014). *Salmonella* Typhimurium e *S. Dublin* foram isoladas da vagina de cadelas que haviam abortado, porém os fetos e placentas não estavam disponíveis para exame. *S. Typhimurium* foi isolada de um neonato com cinco dias de idade que morreu após dois dias de diarreia (Philbey et al., 2014). *S. Panama* foi também relatada em aborto e morte neonatal canina (Graham e Taylor, 2012).

O aborto em cães associado a infecção por *Salmonella* Montevideo foi relacionado a ingestão de carcaças de ovinos portadoras do mesmo sorotipo de *Salmonella*. O aborto ocorreu sem que as cadelas demonstrassem qualquer sinal clínico, assim como os demais cães do plantel, que apresentavam boa saúde. Os cães eram alimentados com carne de cavalo crua e alguns cães do plantel tiveram contato com fetos ovinos abortados (Caldow e Graham, 1998). *Salmonella* pode

também ser veiculada aos cães por meio de ração seca comercial, como identificado em surtos de salmonelose em canis militares na Alemanha, evidenciando outra possível fonte de infecção deste patógeno com risco zoonótico (Schotte et al., 2007).

Não foram relatadas lesões macro ou microscópicas nos casos de mortalidade fetal relacionados a *Salmonella* Montevideo, apenas o isolamento do agente do estômago e tecidos fetais (Caldow e Graham, 1998). Em um modelo experimental em bezerros, a infecção intestinal por *Salmonella* ocasionou intenso infiltrado neutrofílico nas placas de Peyer e as células bacterianas foram detectadas por microscopia eletrônica no citoplasma de células do epitélio intestinal e de fagócitos no lúmen intestinal e no tecido linfoide (Santos et al., 2002).

Aborto canino pode também ocorrer devido a infecção por *Campylobacter jejuni*. Neste caso, o líquido amniótico encontrava-se hemorrágico, e a placenta apresentava exsudato fibrino-hemorrágico, infiltrado com neutrófilos degenerados, restos celulares, degeneração e necrose de sinciotrofoblastos multifocal e infiltrado leve multifocal de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos no estroma alantóico. Nos fetos, não foram descritas lesões, a não ser discreto infiltrado de neutrófilos degenerados no pulmão de um deles (Sahin et al., 2014).

Com algumas exceções, como o *C. jejuni*, bactérias Gram-negativas são isoladas a partir de amostras de tecidos por métodos de cultivos de rotina, em meios ricos como o ágar sangue, ou seletivos como o ágar MacConkey e ágar Mannitol. A identificação é realizada com base nas características macroscópicas das colônias e com o emprego de provas bioquímicas (Meloni et al., 2014). Para o isolamento de *C. jejuni* é necessário o uso de meios enriquecidos (Sahin et al., 2014) e para o isolamento de *Salmonella* recomenda-se o uso de meios seletivos (Greene, 2012b).

2.3.2. Agentes virais

2.3.2.1. Herpesvírus canino.

O herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) é um vírus DNA de fita dupla pertencente à subfamília Alphaherpesvirinae. Há apenas um sorotipo viral e a variação antigênica entre isolados de campo é pequena (Decaro et al., 2008). O agente foi identificado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1965 (Carmichael et al., 1965) e em seguida na Inglaterra, França, Austrália e Holanda. O herpesvírus canino encontra-se distribuído mundialmente (Greene, 2012a) e é considerado enzootico na população canina (Ronsse et al., 2004).

A soroprevalência na população canina é alta em diversos países, variando entre 20 e 80% de positividade. Acredita-se que sejam ainda números subestimados, visto que o CaHV-1 é um imunógeno fraco (Evermann et al., 2011). Embora disseminado entre os cães, sua prevalência como causa de mortalidade neonatal canina é baixa. Um estudo realizado na Dinamarca, com 57 fetos e neonatos caninos, provenientes de 37 ninhadas, relata lesões e morte devido a infecção por CaHV-1 em apenas um neonato (1,8%) e 21% de positividade para o vírus em qPCR, porém, na ausência de lesões (Larsen et al., 2015). A importância epidemiológica do CaHV-1 como causa de mortalidade neonatal requer mais estudos.

A infecção pelo CaHV-1 pode ocasionar aborto, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de filhotes fracos, ou a morte neonatal (Decaro et al., 2008; Greene, 2012a), e pode causar traqueobronquite grave em animais idosos ou imunossuprimidos (Kawakami et al., 2010). Conjuntivite e ceratite ulcerativa e não ulcerativa ocorrem em cães jovens, com 10 a 16 semanas de idade (Ledbetter et al., 2009a). Um caso fatal de gastroenterite associado a corpúsculos de inclusão disseminados em diversos órgãos, em uma cadela de nove anos de idade, evidencia sua

importância patológica fora da fase neonatal (Gadsden et al., 2012). Contudo, a doença associada ao CaHV-1 é devastadora quando ocorre em filhotes infectados com menos de uma semana de vida. A partir de três semanas, embora ainda susceptíveis à infecção generalizada, o quadro clínico tende a ser mais brando (Evermann et al., 2011).

A transmissão do CaHV-1 pode ocorrer pela via transplacentária e por contato de mucosas com as lesões herpéticas das mucosas genitais, com aerossóis e secreções que contenham o vírus, fetos e envoltórios fetais após aborto ou mumificação e a maioria das secreções de filhotes doentes, especialmente a urina. (Dumon e Mimouni, 2005; Greene, 2012a). Portanto, os filhotes de cães podem adquirir a infecção no útero, no canal do parto, pelas secreções oronasais da mãe e de outros cães, inclusive dos irmãos de ninhada que estejam eliminando o agente. A transmissão também pode ocorrer via fômites (Evermann et al., 2011).

Após a infecção e um curso de replicação viral inicial, o CaHV-1 permanece latente, principalmente nos gânglios trigeminal e lombossacro, e nos linfonodos retrofaríngeos e tonsilas (Miyoshi et al., 1999). Durante o período de latência há declínio e até desaparecimento dos anticorpos circulantes. A reativação da replicação viral ocorre em momentos de estresse e imunossupressão, e é acompanhada de elevação nos títulos de anticorpos circulantes (Decaro et al., 2008; Greene, 2012a). Cadelas durante o cio apresentam maior soropositividade, o que sugere reativação do agente associada ao ciclo estral. Entretanto, a presença ou ausência de anticorpos nas reprodutoras não está correlacionada à ocorrência de mortalidade perinatal (Ronsse et al., 2005).

A temperatura ótima para incubação do CaHV-1 *in vitro* é de 35 à 36°C, o que *in vivo* corresponde à temperatura corpórea de neonatos e à das mucosas denominadas “frias” no adulto, como mucosas genitais, respiratórias e oculares. Por isso, a hipotermia é um importante fator predisponente para o desenvolvimento da forma fatal neonatal (Dumon e Mimouni, 2005; Greene, 2012a).

Os neonatos acometidos normalmente desenvolvem anorexia, sinais de cólica, diarreia amarelada a acinzentada, choro constante, dispneia, secreção nasal mucopurulenta ou hemorrágica, opistótono e movimentos de pedalagem. A morte ocorre geralmente de um a três dias após o início dos sinais clínicos (Oliveira et al., 2009; Greene, 2012a).

Em neonatos inoculados experimentalmente, a doença é reproduzida apenas quando a inoculação do CaHV-1 ocorre em filhotes com menos de uma semana de vida e caracteriza-se por hemorragias petequiais na pele, subcutâneo, faringe, serosa gastrointestinal, fígado, bexiga urinária, ovários, útero e endocárdio; linfadenomegalia generalizada e esplenomegalia intensa; eritema na região periumbilical; pulmões levemente firmes com áreas esbranquiçadas, acinzentadas e avermelhadas de 1 a 5 mm, edema pulmonar e equimoses subpleurais. Nos rins, ocorrem petéquias multifocais a coalescentes e áreas de infarto (Carmichael, 1965).

Em casos de infecção natural perinatal pelo CaHV-1, a maioria dos neonatos examinados apresentam as lesões renais hemorrágicas macroscopicamente, mas estas lesões podem estar ausentes em alguns indivíduos que morrem com a doença. No fígado, hepatomegalia, áreas pálidas e petéquias ocorrem em cerca de metade dos neonatos acometidos (Oliveira et al., 2009). As lesões fetais são semelhantes àsquelas observadas nos neonatos e necrose também pode ser observada na placenta (Decaro et al., 2008). Fluido seroso a hemorrágico na cavidade pleural e peritoneal é frequente (Greene, 2012a).

Microscopicamente, as lesões da herpesvirose neonatal canina caracterizam-se por necrose e hemorragia disseminadas em fígado, rins, miocárdio, lâmina própria intestinal, pâncreas, adrenais, e pulmões, com exsudação de fibrina alveolar. Raramente, ocorre discreta reação inflamatória constituída por macrófagos e linfócitos (Carmichael et al., 1965; Oliveira et al., 2009). Adjacentes às áreas de necrose, podem ser observados raros corpúsculos de inclusão intranucleares acidofílicos nas células tubulares renais, da mucosa nasal, de alvéolos pulmonares, em hepatócitos e neurônios. Menos frequentemente, as inclusões podem ocorrer em células endoteliais e miocárdicas. No baço, há hiperplasia de linfócitos (Carmichael et al., 1965) e necrose linfoide, assim como nos linfonodos, além de hemorragia e hiperemia. No timo, há hiperplasia e congestão. (Oliveira et al., 2009).

Lesões oculares ocorrem também após inoculação experimental neonatal do CaHV-1, com necrose e inclusões intranucleares em neurônios e infiltrado discreto de linfócitos, macrófagos e neutrófilos na retina (Carmichael et al., 1965).

Nos neonatos que sobrevivem à infecção aguda, os rins apresentam fibroplasia, infiltrado inflamatório glomerular, hiperplasia tubular e, ocasionalmente, dilatação tubular e displasia renal; nos olhos, há inflamação da retina (Percy et al., 1971), além de panuveíte, ceratite, sinéquia, catarata, corioretinite, degeneração e/ou displasia de retina e atrofia do nervo óptico (Evermann et al., 2011). No sistema nervoso, ocorrem meningoencefalite e periventriculite mononuclear, mais frequente em cerebelo, tálamo, tronco encefálico e medula. Os vasos sanguíneos apresentam hipertrofia e hiperplasia de células endoteliais e, em alguns casos, vasculite. Ocasionalmente, podem ocorrer: necrose segmentar no córtex cerebelar, redução da celularidade das camadas granular e de Purkinge, ganglioneurite nos gânglios trigeminal e do tronco simpático, além de neurite multifocal. As lesões medulares também podem estar presentes e são mais frequentes na região cervical. Microscopicamente, há microgliose, astrocitose, e proliferação vascular (Percy et al., 1970).

Nos adultos infectados pelo CaHV-1, podem ser observados secreção ocular, espirros, tosse e infertilidade. Quando há mortalidade perinatal, que se aproxima de 100% dos filhotes da ninhada, a cadela geralmente não apresenta nenhum outro sinal clínico. Cadelas que apresentam perdas fetais/neonatais em uma gestação, posteriormente desenvolvem gestações normais (Evermann et al., 2011). Nas mucosas de pênis ou vagina, podem ocorrer: secreção, hiperemia, pápulas, vesículas e hiperplasia linfoide (Decaro et al., 2008; Greene, 2012a). Nas cadelas, as lesões vaginais vesiculares ou papulares ocorrem durante o proestro e regredem no anestro (Greene, 2012a).

O diagnóstico da infecção fetal ou neonatal pelo CaHV-1 pode ser realizado com o isolamento do vírus em células MDCK (*Madin-Darbi canine kidney*) ou através de PCR de tecidos como pulmões, rim e fígado (Greene, 2012a). A detecção do vírus deve ser acompanhada da identificação das lesões características de necrose hemorrágica, pois o agente pode estar presente em animais assintomáticos. A utilização de métodos semiquantitativos, como a PCR em tempo real é interessante para indicar a correlação entre carga viral e doença fetal ou neonatal (Larsen et al., 2015). Em adultos, a infecção pelo CaHV-1 pode ser determinada por métodos sorológicos como o ELISA, ou pela PCR com DNA extraído de amostras de sangue. Todavia, a soropositividade deve ser interpretada com cautela, pois pode ocorrer também durante a latência da infecção. Por outro lado, o sangue não é uma boa amostra para a detecção direta do CaHV-1, pois a viremia nesta doença é rara (Ronsse et al., 2005; Greene 2012a).

2.3.2.2. Vírus Diminuto Canino (Parvovírus canino tipo-1)

A família Parvoviridae contempla dois vírus importantes como causa de doença e mortalidade em fetos e neonatos caninos. O vírus diminuto canino (CnMV) foi isolado pela primeira vez em 1967, das fezes de cães militares saudáveis (Binn et al., 1970). Poucos anos depois, outro parvovírus canino foi descrito, responsável por uma grave epidemia de diarreia em cães de diversas partes do mundo durante as décadas de 70 e 80. Este segundo parvovírus a ser isolado de cães foi chamado então de parvovírus canino tipo-2 (CPV), para diferenciá-lo do primeiro vírus da família Parvoviridae descrito, o CnMV (Decaro e Buonavoglia, 2012). Embora nos registros taxonômicos o CnMV nunca tenha sido denominado oficialmente como parvovírus canino tipo-1 (ICTV, 2013), algumas vezes este nome é empregado como referência a ele (Hashimoto, 1999; Pratelli et al., 1999; Greene e Decaro, 2012).

Com características físicas e químicas típicas de outros parvovírus, o CnMV difere dos demais principalmente quanto ao tipo de célula permissiva em cultivo, espectro de hemaglutinação, antigenicidade (Binn et al., 1970) e perfil genômico (Macartney et al., 1988). Geneticamente, o CnMV apresenta uma característica singular dentre os demais parvovírus, semelhante ao parvovírus bovino, uma terceira fase de leitura aberta (*open reading frame*) em seu genoma, que os distingue dos demais parvovírus conhecidos até então (Schwartz et al., 2002). Em face da similaridade genômica entre eles (43%) e distância filogenética dos demais membros da família Parvoviridae, o gênero *Bocavírus* foi criado para agrupar o parvovírus bovino e o vírus diminuto canino (ICTV, 2003; Bodewes et al., 2014). Posteriormente, o gênero foi renomeado para *Bocaparvovirus*, e passou a incluir novos bocavírus identificados em cães (*Bocavírus canino-2*), gatos e humanos (ICTV, 2013).

O CnMV foi diagnosticado pela primeira vez como causa de mortalidade fetal e neonatal canina apenas na década de 90, em fetos inoculados experimentalmente (Carmichael et al., 1991) e em neonatos infectados naturalmente que morreram a partir de cinco dias de vida (Harrison et al., 1992). É uma causa de enterite, pneumonia, miocardite e linfadenite durante as primeiras semanas de vida dos cães (Harrison et al., 1992; Carmichael et al., 1994; Mochizuki et al., 2002). Semelhante a outros parvovírus, é um vírus pequeno (20 nm), não envelopado, que contém DNA fita simples como material genômico. São extremamente estáveis no meio ambiente e resistentes a desinfetantes comuns (Binn et al., 1970; Greene e Decaro, 2012).

O CnMV pode ser encontrado nas fezes de cães de diferentes idades com gastroenterite (Ohshima et al., 2010), em coinfeção com outros agentes, como o CPV, o vírus da cinomose e o coronavírus canino (Mochizuki et al., 2002), e no líquor de cães com sinais neurológicos (Eminaga et al., 2011). É um vírus patogênico para os fetos e neonatos caninos (Manteufel e Truyen, 2008; Decaro et al., 2012b) especialmente para aqueles com até três semanas de idade (Carmichael et al., 1991; Carmichael et al., 1994). Sua patogenicidade em cães jovens e adultos ainda não está totalmente elucidada (Mochizuki et al., 2002; Ohshima et al., 2010; Eminaga et al., 2011). Estudos soropidemiológicos relatam positividade em cães entre 5 a 70% e sugerem que o CnMV tenha ampla distribuição mundial. Contudo, o real impacto do CnMV na saúde canina é desconhecido (Decaro et al., 2012a). Não há relatos da ocorrência do CnMV no Brasil até o momento.

Acredita-se que a transmissão natural do CnMV seja oronasal (Greene e Decaro, 2012). A inoculação de cadelas gestantes pelas vias oronasal, intrauterina e endovenosa leva a infecção e morte fetal (Carmichael et al., 1991). Dependendo do momento em que ocorre a infecção pelo CnMV, pode haver reabsorção embrionária, morte fetal, aborto, anasarca, natimortalidade, nascimento de filhotes fracos e/ou mortalidade neonatal (Carmichael et al., 1991; Decaro et al.,

2012a). A inoculação direta do feto leva a subdesenvolvimento fetal, pneumonia e miocardite (Carmichael et al., 1991).

Em cadelas inoculadas entre os dias 25-35 de gestação pela via oronasal, há eliminação do vírus nas fezes entre quatro e oito dias pós-infecção. Os embriões e/ou fetos infectados experimentalmente pela via transplacentária são reabsorvidos ou nascem com anasarca ou baixo peso. O útero de cadelas com morte fetal contém material mucoide viscoso esverdeado, a placenta pode apresentar focos de necrose e se desprender com facilidade (Carmichael et al., 1991).

As lesões em fetos abortados após inoculação experimental de cadelas gestantes são: pneumonia neutrofílica, vasculite pulmonar, miocardite predominantemente linfocitária, congestão generalizada e atrofia tímica. Corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos podem ser observados em pequena quantidade no miocárdio, epitélio alveolar e bronquial (Carmichael et al., 1991) e no epitélio da mucosa intestinal, desde as criptas até o topo das vilosidades no intestino delgado, nos enterócitos do intestino grosso, e nas células acinares do pâncreas (Hashimoto, 1999). Não há relatos de diagnóstico de infecção natural por CnMV associada a morte fetal.

Em inoculação experimental com CnMV por via oral de neonatos entre quatro e seis dias de idade, há discretos sinais respiratórios e perda do reflexo de sucção entre cinco e seis dias após a inoculação, com a morte do neonato em aproximadamente 24 horas. As lesões mais proeminentes são de consolidação pulmonar com áreas avermelhadas e acinzentadas, mais intensas nas regiões ventrais e hilares (Carmichael et al., 1994).

Filhotes infectados naturalmente com menos de quatro semanas de idade com frequência apresentam sinais clínicos vagos ou discretos antes da morte rápida, enquanto outros demonstram depressão, anorexia, choro, dispneia, diarreia e vômito. As lesões incluem pneumonia, enterite catarral e necrose miocárdica, com conteúdo intestinal líquido ou pastoso amarelado e estriações pálidas acinzentadas no miocárdio (Harrison et al., 1992; Järplid et al., 1996; Decaro et al., 2012b). Frequentemente, em uma ninhada, morbidade e mortalidade não atingem 100% dos filhotes (Harrison et al., 1992; Järplid et al., 1996; Pratelli et al., 1999; Decaro et al., 2012b).

Microscopicamente, a infecção neonatal se caracteriza por pneumonia broncointersticial com bronquite e bronquiolite neutrofílica e macrofágica, necrose focal e desprendimento do epitélio bronquial e bronquiolar (Harrison et al., 1992; Carmichael et al., 1994; Järplid et al., 1996). Corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos ocorrem, ocasionalmente, no epitélio bronquiolar e alveolar (Carmichael et al., 1994; Pratelli et al., 1999).

Nos intestinos de neonatos, os corpúsculos de inclusão intranucleares são grandes e eosinofílicos ou anfofílicos, localizados em enterócitos do topo das vilosidades do duodeno e jejuno, com edema na lâmina própria (Harrison et al., 1992; Järplid et al., 1996). Nas criptas intestinais, pode haver hiperplasia e necrose de células isoladas, com corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos (Macartney et al., 1988; Harrison et al., 1992) e infiltrado neutrofílico na lâmina própria das vilosidades de duodeno, jejuno e periferia das placas de Peyer (Carmichael et al., 1994).

No coração, são observadas necrose e, ocasionalmente, mineralização. Contudo, não há descrição de corpúsculos de inclusão intranucleares nos cardiomiócitos nas infecções neonatais (Harrison et al., 1992; Pratelli et al., 1999), nem de positividade na reação de imunofluorescência neste órgão (Pratelli et al., 1999). Infiltrado mononuclear focal caracterizando miocardite é raro (Järplid et al., 1996).

O timo pode apresentar atrofia e edema (Greene e Decaro, 2012), além de necrose linfóide no córtex (Carmichael et al., 1994). Na inoculação de neonatos com uma cepa de CnMV atenuada, relatam-se atrofia e edema no timo, além de corpúsculos de inclusão intranucleares anfófilos em timócitos e linfócitos dos centros germinativos de linfonodos e nódulos linfóides intestinais, linfadenomegalia e linfólise em linfonodos (Macartney et al., 1988). Corpúsculos de inclusão em linfócitos não são relatados por outros autores (Carmichael et al., 1991; Harrison et al., 1992; Carmichael et al., 1994; Pratelli et al., 1999).

Por meio de imunofluorescência, foi demonstrado tropismo do CnMV para o epitélio intestinal (Harrison et al., 1992; Carmichael et al., 1994), epitélio alveolar e bronquial (Carmichael et al., 1991; Carmichael et al., 1994; Pratelli et al., 1999), tonsilas e timo (Carmichael et al., 1991; Carmichael et al., 1994), miocárdio fetal, útero e placenta (Carmichael et al., 1991). O vírus é detectado apenas quando os fetos são coletados logo após a morte. Nos fetos autolisados, coletados cerca de duas semanas após a morte fetal, o CnMV não foi detectado pela imunofluorescência nem por isolamento viral (Carmichael et al., 1991).

O CnMV pode ser isolado do intestino delgado, baço, linfonodos mesentéricos e timo dos neonatos. A viremia é baixa e o CnMV é eliminado nas fezes em maior quantidade entre os dias três a cinco após a inoculação. A maior concentração viral é encontrada nos pulmões e intestinos. O vírus está presente em pequena quantidade nos tecidos linfóides, inclusive no timo e no baço (Carmichael et al., 1994).

O diagnóstico da infecção pelo CnMV é limitado pela dificuldade de isolamento do vírus (Mochizuki et al., 2002; Decaro et al., 2012b; Lau et al., 2012), realizado originalmente na linhagem de células neoplásicas Walter Reed - WRCC (Binn et al., 1970), e ocasionalmente em células MDCK (Mochizuki et al., 2002). Entretanto, Pratelli e Moschidou (2012) descrevem o cultivo do CnMV em diferentes linhagens celulares, constatando que o espectro de células permissivas a este vírus é maior do que relatado por outros autores, com crescimento em linhagens de células derivadas de cães, bovinos, humanos e nos monócitos caninos. Contudo, alternativas comerciais não estão disponíveis para o diagnóstico do CnMV no Brasil.

2.3.2.3. Parvovírus canino

O parvovírus canino (CPV), pertencente ao gênero *Parvovirus* e família Parvoviridae, é um pequeno vírus DNA de fita simples envolto em um capsídeo que contém duas proteínas estruturais principais: VP1 e VP2. São partículas virais muito estáveis no meio ambiente e de alta transmissibilidade (Decaro e Buonavoglia, 2012; Greene e Decaro, 2012).

O CPV foi identificado como uma causa importante de diarreia hemorrágica em cães no final da década de 70, e a cepa viral original foi denominada como CPV-2 para diferenciá-lo do outro vírus da família Parvoviridae isolado de cães poucos anos antes, o CnMV. É um vírus mais instável que outros do mesmo gênero, o que deve ter contribuído para a emergência das novas cepas virais nos anos seguintes, o CPV-2a e o CPV-2b, que substituíram completamente a cepa original (CPV-2) nas infecções naturais. Posteriormente, no ano 2000, uma nova cepa foi identificada, o CPV-2c (Decaro e Buonavoglia, 2012).

A infecção em cães na fase perinatal pode desencadear uma forma generalizada da doença com necrose celular disseminada (Lenghaus e Studdert, 1982), muitas vezes evoluindo para a forma cardíaca nos filhotes sobreviventes (Lenghaus et al., 1980; Robinson et al., 1980). Quando a

infecção ocorre a partir de seis semanas de idade, geralmente manifesta-se como a forma de gastroenterite necro-hemorrágica (Greene e Decaro, 2012).

Antígenos do parvovírus canino ocorrem em diversos tecidos nos casos fatais. Todavia, o epitélio da língua é o local com positividade mais frequente (96%), enquanto no intestino delgado, baço e timo a ocorrência de antígenos é menos frequente (85,2%, 79,6% e 66,7%, respectivamente), especialmente quando há autólise ou congelamento e descongelamento antes da necropsia (Greene e Decaro, 2012).

Corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser observados ao longo de todo o epitélio estratificado do trato digestório superior e no epitélio das criptas do intestino delgado (Greene e Decaro, 2012). O epitélio da língua dos cães infectados é o local com maior ocorrência de corpúsculos, o qual, como na maioria dos tecidos, localiza-se no núcleo (Matsui et al., 1993). Entretanto, muitas vezes, os corpúsculos de inclusão do CPV, quando no epitélio da língua, parecem se localizar no citoplasma. Todavia, a origem intranuclear dos corpúsculos foi demonstrada por meio de microscopia eletrônica, visto que o vacúolo citoplasmático onde está o corpúsculo é uma projeção da membrana nuclear, e assim, a correta localização deve ser denominada como “pseudocitoplasmática” (Hullinger et al., 1998).

Em neonatos naturalmente infectados, mortos entre seis e nove dias de vida, necrose celular, inflamação, e hemorragia ocorrem em diversos tecidos, como as meninges, pulmões, rins, intestinos, linfonodos e baço. Corpúsculos de inclusão intranucleares são relatados em cardiomiócitos e em células musculares lisas do trato gastrointestinal. Não há reação inflamatória evidente associada aos corpúsculos de inclusão (Lenghaus e Studdert, 1982). Em neonatos mortos com 12-19 dias, corpúsculos intranucleares em cardiomiócitos na ausência de inflamação também são relatados (Carpenter et al., 1980).

A forma cardíaca da parvovirose se caracteriza pela infecção de cardiomiócitos durante a fase fetal ou neonatal, podendo ocorrer a morte na fase aguda ou tardiamente, semanas ou meses após a infecção. Na maioria dos casos, a doença se manifesta em filhotes com mais de três semanas de idade (Robinson et al., 1980). A inoculação intrauterina do CPV-2b ocasiona a morte dos filhotes a partir de 23 dias de idade, com lesões de perivasculite, pneumonia intersticial, miocardite mononuclear extensa, e inflamação semelhante no nodo sinoatrial. Filhotes que sobrevivem até 3-4 meses apresentam, além de miocardite, extensas áreas de fibrose, congestão e edema pulmonar (Lenghaus et al., 1980).

O parvovírus canino está também relacionado a casos de eritema multiforme em filhotes de cães (Favrot et al., 2000; Woldemeskel et al., 2011). As lesões cutâneas ocorrem em filhotes com cerca de duas semanas de idade, caracterizando-se como lesões eritematosas e ulcerativas, disseminadas por todo o corpo, especialmente nos coxins, nas orelhas, na cavidade oral, com raras pústulas (Woldemeskel et al., 2011).

Ao exame microscópico, corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos ou anfofílicos, e citoplasmáticos eosinofílicos, são observados nos queratinócitos, além de paraqueratose, acantose, necrose, infiltrado linfocitário, por vezes neutrofílico. Corpúsculos intranucleares semelhantes são visualizados em mastócitos dérmicos, mucosa da língua, orofaringe, glândulas esofágicas, enterócitos das criptas intestinais e cardiomiócitos no coração. Esta morfologia é característica de eritema multiforme, uma lesão cutânea imunomediada incomum em cães e gatos, que pode ter agentes químicos ou virais como etiologia. Corpúsculos de inclusão positivos na imunomarcagem com anticorpos anti-CPV, a caracterização molecular da cepa CPV-2b, e

partículas virais identificadas no conteúdo intestinal, relacionam as lesões dermatológicas à infecção viral (Woldemeskel et al., 2011).

O diagnóstico da infecção pelo CPV em neonatos caninos pode ser realizado a partir do isolamento viral de amostras de coração, pulmão, fígado, rim e intestino delgado (Lenghaus e Studdert, 1982). A detecção de antígenos virais em amostras de fezes pode ser realizada com o emprego de ELISA, que é específico, mas com limitada sensibilidade. O método com melhor sensibilidade para detecção do CPV em amostras de fezes de cães é a PCR. Contudo, tanto a detecção de antígenos quanto de DNA do CPV pode ter resultados positivos na presença de cepas vacinais, até alguns meses após a vacinação (Greene e Decaro, 2012).

2.3.2.4. Vírus da Cinomose Canina

O vírus da cinomose canina (CDV) é um membro do gênero *Morbillivirus*, da família Paramixoviridae, que contém no seu nucleocapsídeo uma fita simples de RNA e é envolto por um envelope lipoproteico derivado da membrana celular hospedeira (Greene e Vandeveld, 2012).

Raros relatos mencionam o CDV como causa de mortalidade fetal e neonatal canina. Aborto na ausência de infecção fetal e parto prematuro de neonatos infectados são descritos após inoculação experimental de cadelas gestantes. Os neonatos infectados apresentam atrofia tímica, depleção e/ou necrose linfóide, com corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos em células linfóides e epiteliais (Krakowka et al., 1977).

Entretanto, em casos de infecção natural diagnosticados em neonatos com cinco a 12 dias de idade, foram descritos: emese, diarreia, epistaxe, pneumonia intersticial caracterizada por pulmões armados com impressão das costelas e infiltrado intersticial de macrófagos com raros linfócitos e neutrófilos, na ausência de corpúsculos de inclusão. Antígenos do CDV detectados por imuno-histoquímica no epitélio bronquial e a reação positiva na RT-PCR confirmaram a presença do CDV nos tecidos afetados (Pandher et al., 2006).

2.3.2.5. Adenovírus canino

O Adenovírus canino raramente é citado como causa de doença ou morte em neonatos caninos (Lamm e Njaa, 2012). Entretanto, este vírus é relatado em casos de neonatos com a "síndrome do definhamento neonatal" (Spalding et al., 1964) e de filhotes entre a segunda e a quarta semanas de vida, com letargia, dispneia, secreção nasal, anorexia, vômito, diarreia, dor abdominal e morte (Almes et al., 2010).

As alterações anatomopatológicas incluem secreção nasal e/ou ocular, efusão pleural serosa discreta, consolidação pulmonar cranioventral a difusa e pulmões armados com impressão de costelas, ocasionalmente associados a linfadenomegalia submandibular. Ao exame microscópico, nos pulmões, havia áreas de necrose com corpúsculos de inclusão intranucleares anfófilos grandes em numerosas células epiteliais bronquiolares e em raros macrófagos alveolares, aumento de macrófagos alveolares, edema, fibrina e neutrófilos não-degenerados. Infecção bacteriana pode ocorrer associada à infecção pelo adenovírus. Com menor frequência, foram descritas degeneração vacuolar, necrose hepatocelular e corpúsculos de inclusão intranucleares em hepatócitos. No baço, havia depleção linfóide e, ocasionalmente, corpúsculos de inclusão intranucleares em macrófagos. Tecidos avaliados através de imuno-histoquímica mostraram

reação positiva para adenovírus canino associado às lesões. Adenovírus canino tipo-2 foi caracterizado por meio de PCR (Almes et al., 2010).

2.3.3. Agentes protozoários

2.3.3.1. *Neospora caninum*

Neospora caninum é um protozoário coccídeo com distribuição mundial que apresenta um ciclo biológico de dois hospedeiros, com canídeos como hospedeiros definitivos e, potencialmente, diversos animais domésticos e silvestres como hospedeiros intermediários (Dubey e Lappin, 2012). Cistos teciduais infectantes foram documentados em bovinos, ovinos, búfalos, cavalos, bisões e veados, natural ou experimentalmente, além de soropositividade. Contudo, anticorpos anti-neospora e DNA de *N. caninum* ocorrem também em galinhas e aves silvestres, roedores e lagomorfos (Dubey e Schares, 2011). No cão, o principal hospedeiro definitivo, oocistos são formados no epitélio intestinal de jejuno e íleo (Kul et al., 2015), embora a eliminação de oocistos não seja frequente (Dubey e Schares, 2011).

A neosporose está relacionada, principalmente, a ocorrência de aborto e morte neonatal em bovinos e doença neuromuscular em cães. Raramente, aborto e morte neonatal em ovinos e caprinos são também relatados, mesmo em rebanhos com soroprevalência alta. A transmissão horizontal de *N. caninum* ocorre pela via fecal-oral, com a ingestão de oocistos provenientes das fezes de cães ou pela ingestão de tecidos provenientes de hospedeiros intermediários, como a carne e tecido nervoso de bovinos infectados. A transmissão vertical pode ocorrer pela via transplacentária ou transmamária (Dubey e Schares, 2011; Dubey e Lappin, 2012).

Cães mais velhos apresentam maior soroprevalência, o que indica que a maioria dos animais se infecta ao longo da vida e a transmissão horizontal deve ser mais relevante. A ingestão de tecidos infectados, teoricamente de qualquer animal, é a fonte de infecção mais provável para os carnívoros. Entretanto, devido a limitada viabilidade de *N. caninum* nos tecidos após a morte do hospedeiro intermediário, acredita-se que a ingestão de caça como pombos e outras aves, logo após a morte, seja mais importante para a infecção do cão. A importância de transmissão pela ingestão de tecidos infectados em detrimento da transmissão vertical ou pela ingestão de oocistos fecais é reforçada pelo fato de que a soroprevalência entre cães de áreas urbanas é menor do que entre cães rurais, onde há mais oportunidades de ingestão de tecidos frescos (Dubey e Schares, 2011).

Infecção transplacentária ocorre em cadelas infectadas experimentalmente (Dubey e Lindsay, 1989). A neosporose em filhotes de ninhadas nascidas de cadelas infectadas naturalmente tem sido denominada “infecção neonatal”, pois pode decorrer de infecção transplacentária ou através da amamentação, visto que em todos os casos de infecção natural documentados na literatura apenas os casos de morte neonatal foram investigados, enquanto os natimortos não foram examinados ou, quando necropsiados, *N. caninum* não foi detectado. O diagnóstico dos filhotes acometidos nos casos de infecção natural foi realizado apenas depois de semanas de amamentação e contato irrestrito com a mãe em um ambiente potencialmente contaminado (Dubey et al., 1988; Barber e Trees, 1998; Dubey et al., 2005). Embora confirmada experimentalmente (Dubey et al., 2005; Dubey e Lappin, 2012) e com evidências moleculares de infecção em natimortos (Taques et al., 2016), a transmissão transplacentária de *N. caninum* em casos de infecção natural ainda requer confirmação.

A infecção neonatal pode ocorrer em ninhadas de cadelas com infecção recente ou antiga, e a positividade entre os filhotes de uma mesma ninhada ou de diferentes ninhadas de uma mesma cadela pode variar entre 0 e 100% (Dubey et al., 1988; Dubey e Lindsay, 1989; Dubey et al., 2005; Barber e Trees, 1998; Heckeroth e Tenter, 2007; Cavalcante et al., 2012, Reis et al., 2016). Na infecção transplacentária experimental (Dubey e Lindsay, 1989; Cavalcante et al., 2012) ou na infecção neonatal natural de cães (Dubey et al., 1988; Barber e Trees, 1998), sinais de doença fetal ou neonatal raramente são relatados (Dubey e Lindsay, 1989; MacAllister et al, 2016; Reis et al, 2016) e natimortos e neonatos mortos no período neonatal precoce foram descartados sem a realização de necropsia (Dubey et al., 1988; Barber e Trees, 1998). Todavia, Cavalcante et al. (2012) relataram alta mortalidade perinatal em cadelas infectadas experimentalmente durante a gestação (53,8-60%), entretanto, com positividade em PCR de apenas três dentre 23 neonatos testados, sendo todos negativos pela imunohistoquímica, não estabelecendo relação entre a mortalidade neonatal e a infecção por *N. caninum*,

Mortalidade fetal e neonatal canina associada a neosporose parece ter ocorrência esporádica, com apenas raros casos documentados até o momento, embora a transmissão neonatal pareça comum. Nos casos naturais de neosporose em neonatos caninos, a apresentação clínica é diversa e inclui insuficiência respiratória, diarreia, incoordenação motora ou morte súbita, entre oito e 20 dias de idade (Dubey e Lindsay 1989; MacAllister et al., 2016; Reis et al., 2016). Baixo ganho de peso também ocorreu em infecção neonatal por *N. caninum* (Dubey et al., 2005; Reis et al., 2016).

As lesões descritas em casos de mortalidade fetal e neonatal em cães decorrente de infecção por *N. caninum* se baseiam em apenas um caso de inoculação experimental (Dubey e Lindsay, 1989) e dois relatos de neonatos com infecção natural (MacAllister et al., 2016; Reis et al., 2016). Subdesenvolvimento e morte fetal e neonatal ocorreram após a inoculação experimental de cadelas durante a gestação (Dubey e Lindsay, 1989). Lesões macroscópicas foram evidentes após a primeira semana de vida, com ascite associada a hepatite (com hepatomegalia e fígado de consistência friável), cardiomegalia e atelectasia pulmonar. Microscopicamente, em natimortos e neonatos, havia pneumonia intersticial ou broncointersticial, miocardite, com necrose miocárdica e infiltrado mononuclear em epicárdio, endocárdio e átrios, encefalite com gliose e manguitos perivascularares, nefrite e adrenalite, além de cistos com taquizoítos intralesionais. (Dubey e Lindsay, 1989; MacAllister et al., 2016; Reis et al., 2016).

A ocorrência da forma clássica da doença, com paresia e paralisia e/ou rigidez de membros pélvicos e atrofia muscular, em cães com infecção neonatal, é pouco comum, e, quando ocorre, manifesta-se clinicamente a partir de cinco semanas de vida (Dubey et al., 1988; Dubey e Lindsay, 1990; Barber e Trees, 1998; Dubey et al., 2005; Dubey e Schares, 2011). Portadores assintomáticos podem desenvolver sinais clínicos da neosporose diante de imunossupressão com o uso de corticosteroides (Dubey e Lindsay, 1990).

A partir de cinco semanas de idade, nos filhotes com paresia ou paralisia, as lesões predominantes são encefalomielite, polirradiculoneurite e polimiosite granulomatosa, com palidez, atrofia e fibrose muscular, necrose multifocal, vasculite e raros cistos com taquizoítos ou bradizoítos no citoplasma de células musculares e no sistema nervoso. Os músculos mais acometidos são dos membros, com maior intensidade nos membros pélvicos, mas também podem ocorrer lesões na língua, masseter, esôfago, diafragma e miocárdio. O infiltrado inflamatório é predominantemente mononuclear, mas neutrófilos e eosinófilos podem estar presentes ocasionalmente (Dubey et al., 1988; Dubey e Lindsay, 1990; Dubey et al., 2005). Necrose hepática e pneumonia podem ocorrer também depois de cinco semanas de idade, associadas a cistos contendo taquizoítos (Dubey e Lindsay, 1990). Megaesôfago é uma lesão rara nos casos de neosporose (Dubey et al., 2005).

Enterite associada a diarreia e estruturas parasitárias no citoplasma de enterócitos do jejuno e do íleo ocorre na forma entérica da doença (Kul et al., 2015).

O diagnóstico da infecção por *N. caninum* pode ser realizado por PCR, sorologia, isolamento (inoculação) (Dubey e Schares, 2011), histopatologia e imuno-histoquímica (Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2005). O isolamento de *N. caninum* é considerado difícil, e, frequentemente, não é possível realizá-lo a partir de amostras positivas em PCR (Dubey e Schares, 2011). A identificação de oocistos nas fezes como forma de diagnóstico da infecção por *N. caninum* deve ser realizada considerando como diferencial *Hammondia heydorni*, devido à grande semelhança morfológica entre os oocistos dessas duas espécies de coccídeos. Além disso, grande número de cães infectados por *N. caninum* não elimina oocistos nas fezes, ou os eliminam em pequena quantidade, sendo mais indicados métodos sorológicos e moleculares para detecção do agente no sangue ou em tecidos (Dubey e Schares, 2011). Pode ocorrer coinfeção de *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* em cadelas, por isso, a identificação de um dos dois agentes não deve excluir a possibilidade de ocorrência do outro simultaneamente, devido à semelhança morfológica entre os dois (Al-Qassab et al., 2009).

A correlação entre a infecção por *N. caninum* e mortalidade fetal ou neonatal canina deve ser realizada com cautela. A positividade em um estudo molecular com natimortos provenientes de partos distócicos foi de 95% (Taques et al., 2016), contudo, portadores assintomáticos entre cães com infecção neonatal são comuns (Dubey e Lindsay, 1990; Barber e Trees, 1998; Dubey et al., 2005; Heckeroth e Tenter, 2007). A identificação do agente nos tecidos fetais associado às lesões inflamatórias evidencia de forma inequívoca a participação de *N. caninum* no quadro de morbidade e mortalidade neonatal canina (Dubey e Lindsay, 1989; MacAllister et al., 2016; Reis et al., 2016).

2.3.3.2. *Leishmania infantum*

Leishmaniose visceral é uma importante zoonose decorrente da infecção pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinonímia *L. chagasi*), um protozoário que tem o cão como principal reservatório. Em geral, a leishmaniose se caracteriza como uma doença crônica com lesões inflamatórias, predominantemente macrofágicas, disseminadas em diversos órgãos, especialmente nos tecidos linfo-hematopoéticos e nos olhos (Koutinas e Koutinas, 2014). Tropismo de *L. infantum* por órgãos reprodutores foi demonstrado no cão, onde se encontra associada a lesões inflamatórias com macrófagos e amastigotas intralésionais na glândula, prepúcio e epidídimo, e é eliminada no sêmen (Diniz et al., 2005). Por outro lado, sua frequência na genitália de cadelas é pequena (Silva et al., 2008).

A transmissão de *L. infantum* depende de um vetor flebotomíneo, representado pela *Lutzomia longipalpis* no Brasil. Todavia, sua transmissão sexual e vertical encontra-se bem documentada (Silva et al., 2009a; Turchetti et al., 2014). Na ausência do vetor, a transmissão sexual e transplacentária pode manter o ciclo da doença em um plantel reprodutivo (Boggiatto et al., 2011).

Contudo, a importância da leishmaniose visceral como causa de doença em fetos e neonatos caninos ainda não foi comprovada. Apesar da confirmação da transmissão transplacentária da *L. infantum* em cadelas gestantes naturalmente infectadas, lesões relacionadas a morte de fetos caninos não são relatadas na literatura. O agente foi detectado por meio da PCR e identificado em tecidos de 32% de 53 fetos examinados pela IHQ, embora nenhuma lesão tenha sido demonstrada.

Os tecidos que mais vezes se mostraram positivos pela PCR e IHQ foram o baço, o fígado, a medula óssea e os linfonodos (Pangrazio et al., 2009).

Em um relato, dois natimortos gerados por uma cadela positiva foram identificados como positivos pela PCR e IHQ. Todavia, a morte fetal ocorreu aos 68 dias de gestação sem que a cadela evidenciasse sinais de trabalho de parto, sendo realizada cesariana. Não foram documentadas lesões fetais compatíveis com a leishmaniose nem outras causas de mortalidade perinatal canina, especialmente a inércia uterina primária, não sendo possível estabelecer a relação causal entre a identificação do agente e a morte fetal (Silva et al., 2009c).

2.3.3.3. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um importante protozoário coccídeo que tem o gato doméstico e outros felídeos como hospedeiros definitivos e infecta diversos animais vertebrados como hospedeiros intermediários, inclusive cães, bovinos, ovinos e o homem. Infecções congênitas, oculares e no sistema nervoso central fazem do *T. gondii* um importante organismo zoonótico. A transmissão vertical é importante e bem documentada em humanos e ovinos, mas os casos confirmados em cadelas são raros (Dubey e Lappin, 2012).

Após inoculação experimental de cadelas gestantes, foram descritos aborto, natimortalidade e morte neonatal. Contudo, *T. gondii* não foi visualizado nos tecidos dos fetos ou dos neonatos (Bresciani et al., 1999). Aborto, morte fetal e neonatal foram relatadas também após a reinfecção de cadelas portadoras de infecção natural por *T. gondii*. Nos neonatos com infecção congênita, *T. gondii* pode ser isolado da medula espinhal, rim e retina e detectado por imuno-histoquímica em cérebro e medula espinhal. Entretanto, lesões macroscópicas não foram visualizadas (Bresciani et al., 2009).

Apesar de lesões características de infecção por *T. gondii* em fetos e neonatos caninos ainda não terem sido descritas, sua importância em casos de mortalidade fetal e neonatal canina merece atenção. A positividade em PCR de sangue cardíaco coletado de natimortos caninos provenientes de casos de distocia foi de 78,6% em um estudo realizado no estado do Mato Grosso, Brasil, o que demonstra a grande frequência de transmissão de *T. gondii* na população canina (Tiques et al., 2016). Contudo, neste estudo, não foi realizada análise histopatológica, o que impediu o estabelecimento de correlação entre *T. gondii* e doença ou morte fetal.

2.3.3.4. *Cystoisospora canis*

Isospora canis são protozoários coccídeos considerados espécie-específicos. Neonatos caninos adquirem a infecção por meio de ingestão de oocistos e o período pré-patente é de sete a 11 dias. Os esporozoítos excistam e infectam o epitélio intestinal, reproduzindo-se por várias gerações, de onde podem migrar para os linfonodos mesentéricos e outros tecidos e formar cistos. Podem ocorrer diarreia, raramente hemorrágica, vômito, anorexia, desidratação e morte. Neonatos caninos e filhotes muito jovens têm maior risco de adoecer diante da infecção por *I. canis* (Datz, 2011).

O diagnóstico pode ser determinado pelo exame coproparasitológico, especialmente com métodos de flutuação. Os oocistos de *I. canis* que podem ser diferenciados de outros coccídeos por sua morfologia e morfometria (Datz, 2011).

2.3.4. Helmintos

Toxocara canis, *Ancylostoma caninum* e *Dirofilaria immitis* são helmintos nematoides com a capacidade de infectar fetos ou neonatos caninos, representando uma potencial causa de morbidade e mortalidade neonatal (Johnson et al., 1987; Datz, 2011). Contudo, apesar de mencionado por alguns autores, as lesões relacionadas a morbidade e mortalidade fetal e neonatal canina devido a helmintoses não foram descritas até o momento.

Toxocara canis é um ascarídeo com alta prevalência na espécie canina. As cadelas apresentam larvas em estado de latência em tecidos somáticos, que são ativadas após 42 dias de gestação e migram até o útero ou as glândulas mamárias, podendo causar infecção fetal pela via transplacentária e neonatal pela via transmamária. As larvas realizam uma migração hepato-pulmonar-traqueal até serem deglutidas para chegar ao intestino e se tornarem adultos (Barriga, 1988; Overgaauw e van Knapen, 2013). Em sua migração pelos tecidos, podem ocorrer lesões em rins, pulmões e fígado (Datz, 2011). Em filhotes com mais de um mês de idade e cães adultos, as larvas podem permanecer nos tecidos, mas em fetos e neonatos caninos, em geral as larvas migram até o intestino e tornam-se adultos, sendo raro encontrá-las nos tecidos (Barriga, 1988). Estágios somático e larval são resistentes a anti-helmínticos, o que dificulta a erradicação da infecção e torna o *T. canis* um grave problema em plantéis de criação de cães (Johnson et al., 1987; Barriga 1988; Datz, 2011; Overgaauw e van Knapen, 2013). Todavia, não foram realizados estudos que evidenciem a importância da toxocaríase na mortalidade fetal e neonatal canina.

Ancylostoma caninum é um nematoide hematófago que, semelhante ao *T. canis*, tem uma fase larval de latência em tecidos somáticos com reativação durante a gestação, quando migram para as glândulas mamárias para realizar a infecção dos neonatos pela via transmamária. Os neonatos podem apresentar diarreia, perda de peso e anemia grave (Johnson et al., 1987; Datz, 2011).

Dirofilaria immitis é um nematoide que tem um ciclo com uma fase em um vetor artrópode, um mosquito. As microfíliarias são capazes de atravessar a placenta canina, contudo, esta fase do parasita não é capaz de se tornar adulto no feto ou no neonato, apenas circular pelos delicados capilares do filhote (Johnson et al., 1987).

O diagnóstico da infecção por *T. canis* e *A. caninum* é realizado mediante a observação de ovos no exame coproparasitológico ou da observação dos parasitas adultos no lúmen intestinal na necropsia (Johnson et al., 1987). As formas larvais teciduais de *T. canis* podem ser identificadas por meio de exame histopatológico e imuno-histoquímica (Flecher et al., 2016).

2.3.5. Importância zoonótica de agentes relacionados a morte fetal e neonatal canina

Organismos do gênero *Brucella* são reconhecidos por sua importância zoonótica, relacionada a exposição de risco ocupacional ou ingestão de produtos alimentícios de origem animal contaminados com a bactéria. Todavia, a *B. canis* geralmente é citada como um organismo de menor importância zoonótica (Xavier et al., 2009a; Moreno, 2014). Entretanto, com o crescente número de pessoas dedicadas a atividades ocupacionais com cães e com o aumento no número de cães de estimação no interior das residências, em íntimo contato com seus proprietários, parece ser prudente que esta zoonose mereça maior consideração por parte dos serviços de proteção à saúde pública (Krueger et al., 2014).

Em humanos, a brucelose causada por *B. canis* é relatada em distintos quadros clínicos, muitas vezes crônicos, inespecíficos e insidiosos, com febre intermitente, dor de cabeça, fraqueza,

artralgia, constipação (Wallach et al., 2004), e em outros casos com lesões mais graves, como bronquiolite (Dentringer et al., 2014), endocardite, aneurismas, osteomielite, abscessos epidurais, efusão pleural (Piampiano et al., 2000) e gastroenterite (Lucero et al., 2010).

Nos últimos anos, mais atenção foi dispensada aos casos de brucelose humana associada a infecção pela *B. canis*, mas esta ainda é uma zoonose considerada subdiagnosticada (Dentringer et al., 2014; Krueger et al., 2014), especialmente devido a inexistência de métodos padronizados e programas oficiais para diagnóstico dos casos humanos e rastreamento dos casos caninos (Hollett, 2006; Dentringer et al., 2014). Apesar de caracterizar-se predominantemente como uma doença de risco ocupacional (Wallach et al., 2004; Dentringer et al., 2014; Krueger et al., 2014; Moreno, 2014), casos como o de uma criança em contato com um filhote infectado recém adquirido (Dentringer et al., 2014) e de famílias contaminadas por seus cães de estimação (Lucero et al., 2010) também são relatados, e devem servir de alerta para que maior atenção seja dispensada ao risco zoonóticos representado pelos filhotes de cães. Em um levantamento soroepidemiológico realizado em amostras de 180 pessoas residentes no estado da Bahia, Brasil, 4,6% apresentaram reação positiva em um ELISA para *B. canis* (Angel et al., 2013).

Há evidências moleculares do comportamento zoonótico de outros agentes bacterianos relacionados a mortalidade fetal e neonatal canina. A similaridade genética entre isolados de *E. coli* provenientes de dois cães e das fezes do proprietário do canil, que apresentava diarreia crônica, sugere a possibilidade de transmissão zoonótica deste agente (Münnich e Lübke-Becker, 2004). *Streptococcus* spp. são frequentemente isolados de casos de sepse em pessoas, e sua importância zoonótica é bem reconhecida. A transmissão se dá por contato direto das pessoas com cães doentes ou saudáveis e portadores assintomáticos (Greene e Prescott, 2012).

Outro aspecto importante é a ocorrência de cepas bacterianas resistentes a drogas antimicrobianas, especialmente em cães que utilizam com frequência antibióticos em cadelas gestantes (Milani et al., 2012; Rota et al., 2011). Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes são isoladas com maior frequência de cães provenientes de canis que praticam o uso excessivo de antibióticos, diferente do perfil de resistência apresentado por isolados bacterianos obtidos de cães de canis que não utilizam antibióticos com frequência (Milani et al., 2012). *Staphylococcus pseudintermedius* metilina-resistentes são citados entre os isolados (9:89) obtidos de leite de cadelas e de neonatos necropsiados, procedentes de canis que fazem uso excessivo de antibióticos (Rota et al., 2011).

O cão pode representar também uma fonte de infecção por *Salmonella* para as pessoas, tanto o próprio animal de estimação (Morse et al., 1976) quanto o contato com cães de abrigos ou clínicas veterinárias (Wright et al., 2005). Devido aos hábitos de ingestão oportunista de carcaças (Caldow e Graham, 1998), alimentação com carne crua (Morley et al., 2006) e até mesmo através de ração comercial, os cães podem se tornar portadores de *Salmonella* em contato de risco com as pessoas (Philbey et al., 2014). A eliminação de *Salmonella* na secreção vaginal de cadelas (Philbey et al., 2014) indica também o risco potencial de transmissão zoonótica através da assistência ao parto ou durante o aborto.

Campylobacter jejuni é também causa de infecção e doença em humanos, geralmente a partir de ingestão de carne ou leite. Entretanto, através de comparação por sequenciamento genômico de isolados de casos de aborto canino, foi possível evidenciar que os mesmos genótipos foram relatados com frequência em casos de infecção em pessoas (Sahin et al., 2014). Assim, a manipulação de placentas infectadas por *Campylobacter* pode ser também considerada uma exposição com potencial risco zoonótico para o criador de cães.

Leishmania infantum e *Toxoplasma gondii* são importantes patógenos zoonóticos para humanos documentados em casos de infecção vertical em cães (Pangrazio et al., 2009; Taques et al., 2016) e também presentes no sêmen de cães (Diniz et al., 2005; Arantes et al., 2009). Geralmente o cão não é um transmissor de *T. gondii* para humanos, mas com sua eliminação no sêmen e a possibilidade de estar na placenta, há risco potencial de transmissão durante o manejo reprodutivo em canis, assim como de *L. infantum*, caso medidas simples de proteção pessoal não sejam adotadas, como o uso de luvas durante a assistência ao parto e inseminação artificial.

A toxocaríase também é uma zoonose importante com ocorrência mundial. Em humanos, ocasiona lesões inflamatórias granulomatosas em diversos tecidos, inclusive intraocular com possibilidade de desenvolvimento de cegueira. Os humanos se infectam através da ingestão de ovos embrionados e larvas, e a principal fonte de contaminação do ambiente com ovos de *T. canis* é a cadela lactante (Barriga, 1988; Overgaauw e van Knapen, 2013). Granulomas hepáticos em crianças devido a migração visceral de larvas de *T. canis* parecem estar relacionados a infecção secundária por *Staphylococcus aureus* (Lambertucci et al., 2001).

Diante da vulnerabilidade dos fetos caninos a inúmeros desafios infecciosos no interior do útero da cadela, de sua imaturidade ao nascer, da dependência dos neonatos de adequada transferência de imunidade passiva, e dos inúmeros desafios infecciosos no ambiente extrauterino, as doenças infecciosas devem representar um fator importante para a ocorrência frequente de mortes durante o período de vida fetal e neonatal dos cães.

Muitos autores contribuíram com valiosas informações sobre as causas de mortalidade fetal e neonatal canina, mas ainda há uma lacuna no que se refere à epidemiologia destes processos, e, especialmente, com relação às lesões direcionadoras do diagnóstico.

A grande frequência de agentes infecciosos zoonóticos dentre os diagnósticos diferenciais dos casos de mortalidade fetal e neonatal canina evidencia a necessidade de determinação precisa dos agentes envolvidos em cada caso, para a proteção da saúde dos criadores, tratadores e dos futuros proprietários dos filhotes sobreviventes, potenciais portadores desses patógenos.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral foi realizar o diagnóstico de doenças relacionadas a mortalidade de fetos e neonatos caninos provenientes de canis de criação de cães de raça. Para tanto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- i) Descrever lesões presentes em fetos e neonatos caninos acometidos por doenças espontâneas;
- ii) Realizar cultura, isolamento bacteriano e identificação bacteriológica de amostras de tecidos coletados em necropsia;
- iii) Pesquisar a ocorrência de *Brucella* spp., herpesvírus canino, parvovírus canino, vírus diminuto canino e *Leishmania infantum*, por métodos moleculares, nos tecidos de fetos e neonatos caninos necropsiados;
- iv) Identificar, por métodos moleculares, o agente etiológico protozoário de um caso de anemia hemolítica neonatal canina.
- v) Detectar antígenos de *Brucella* spp. e *Toxocara canis* nos tecidos de fetos e neonatos caninos necropsiados através da técnica de imuno-histoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi aprovada pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número de protocolo 197/2014.

4.1. População estudada

Foram necropsiados 203 fetos e neonatos caninos acometidos por doenças espontâneas, mortos entre novembro de 2014 e julho de 2016, provenientes de 89 ninhadas, de 32 canis de criação de cães de raça do estado do Espírito Santo. Vinte e nove canis localizavam-se na região da Grande Vitória, que compreende os municípios de Vitória, Vila Velha, Serra, Guarapari, Cariacica e Viana. Dois canis localizavam-se na região Serrana e um na região do Litoral Sul.

Neste estudo, foram considerados fetos, os filhotes que não completaram a transição fetal-neonatal (Vannucchi et al., 2012b), e neonatos, os que morreram com até 21 dias após o nascimento (Indrebo et al., 2007). Dentre os fetos, aqueles que eram desprovidos de pelos e com desenvolvimento corporal incompleto foram classificados como fetos abortados, e aqueles que morreram ao término da gestação foram denominados natimortos (Schlafer, 2008).

Para cadastramento, foi distribuído aos criadores material impresso contendo orientações sobre a forma de coleta de amostras, uma ficha de cadastro e fichas para identificação de ninhadas, além do termo de compromisso e esclarecimento para ser preenchido e assinado (Anexo). Todos os criadores informaram que os animais dos plantéis foram regularmente vermifugados e vacinados contra cinomose, hepatite infecciosa canina, parvovirose, leptospirose e raiva, e que não foram testados regularmente para brucelose canina.

Os criadores foram orientados a resfriar os filhotes mortos entre 2° e 8°C em caixa térmica com gelo reciclável fornecida pela equipe da pesquisa, evitando-se o congelamento, e alertados sobre a necessidade do uso de luvas. Se disponíveis, as placentas deveriam ser acondicionadas em frascos plásticos estéreis. Foram encaminhados 150 filhotes resfriados, e, por opção dos proprietários, 53 foram congelados antes do encaminhamento.

As raças amostradas foram classificadas de acordo com o porte racial, com base no peso médio estimado do adulto, em: miniatura: 0,5-5 kg; pequeno porte: 6-15 kg; médio porte: 16-29 kg; grande porte: > 30 kg. Raças caninas de todos os portes foram representadas, em um total de 19 raças, seis raças classificadas como miniatura, quatro raças de porte pequeno, seis de porte médio e três de porte grande. A identificação de cada raça foi substituída por um código para manter em sigilo a identidade do canil de origem. A distribuição dos filhotes examinados por portes e raças e o número de cães que encaminharam filhotes de cada raça encontram-se na Figura 1 e na Tabela 1. O número de cães residentes nos canis amostrados variou entre 01 e 90 e o número de filhotes encaminhados por cada criador variou entre 01 e 50 (Tabela 2).

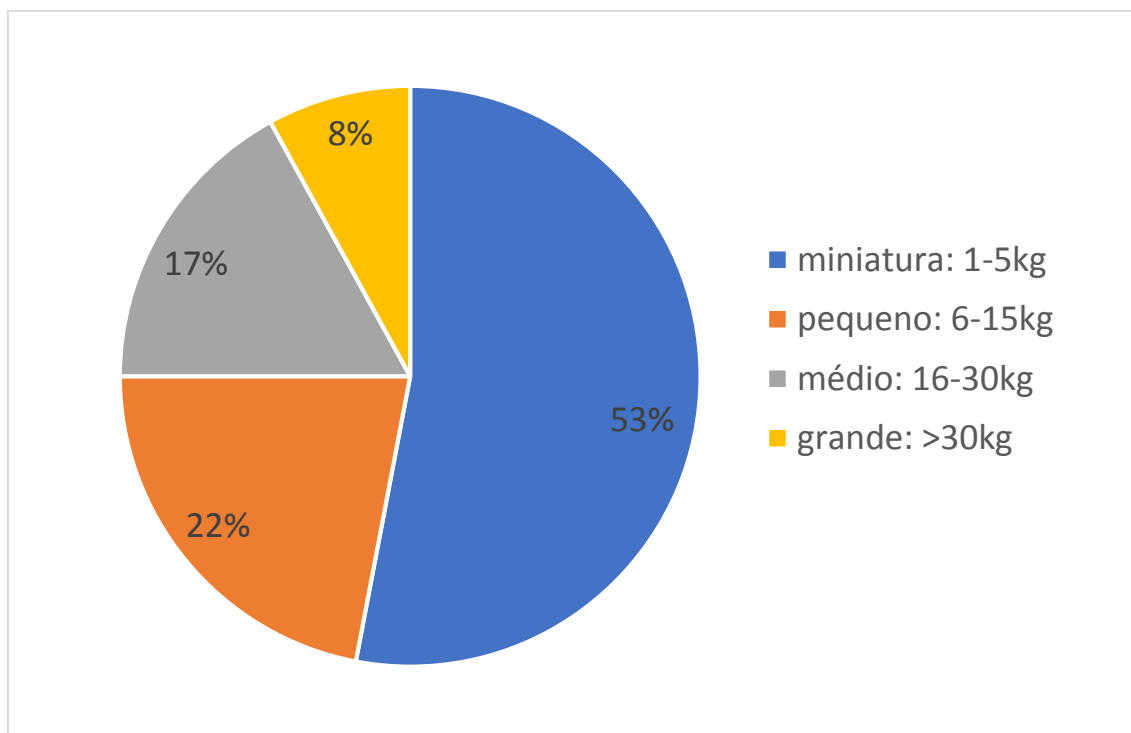


Figura 1. Distribuição dos filhotes examinados nos diferentes portes raciais.

Tabela 1. Distribuição dos filhotes e de ninhadas por porte e raça, e o número de canis representados em cada raça.

Porte	Raças	Filhotes	Ninhadas	Canis
Miniatura	MI-1	45	15	1
Miniatura	MI-2	39	27	9
Miniatura	MI-3	14	3	1
Miniatura	MI-4	5	3	2
Miniatura	MI-5	4	4	3
Miniatura	MI-6	1	1	1
Pequeno	PE-1	20	7	6
Pequeno	PE-2	8	3	2
Pequeno	PE-3	4	4	3
Pequeno	PE-4	2	1	1
Médio	ME-1	6	2	2
Médio	ME-2	4	2	1
Médio	ME-3	3	1	1
Médio	ME-4	2	2	1
Médio	ME-5	1	1	1
Médio	ME-6	1	1	1
Grande	GR-1	31	10	2
Grande	GR-2	12	1	1
Grande	GR-3	1	1	1

Obs.: A identificação das raças encontra-se codificada para manter em sigilo a identidade do canil de origem dos animais examinados nesta pesquisa.

MI: Miniatura

PE: Pequeno

ME: Médio

GR: Grande

4.2. Anatomopatologia

4.2.1. Técnica de necropsia e coleta de amostras

O exame dos filhotes iniciava-se com a paramentação da equipe (com máscaras, óculos de acrílico, luvas e avental) e preparação do material para a coleta de amostras. Todo o instrumental e a mesa de necropsia eram previamente higienizados com água e detergente e, imediatamente antes de cada exame, foram flambados (por 5 minutos a mesa, e 15 minutos o instrumental).

Tabela 2. Canis cadastrados, número de cães no plantel e de filhotes encaminhados.

Canil	Número de cães no plantel	Filhotes encaminhados	Raças
1	90	50	MI-1, MI-4
2	95	25	MI-2
3	17	24	GR-1
4	36	15	MI-3, MI-4
5	14	12	GR-2
6	27	7	GR-1
7	7	6	PE-1
8	12	6	PE-2
9	10	5	ME-1
10	18	5	MI-4, MI-5, PE-3
11	5	5	PE-2
12	98	4	MI-2
13	11	4	ME-2
14	10	3	MI-2
15	6	3	PE-2
16	18	3	ME-3
17	não informado	3	MI-2, MI-5
18	1	3	PE-1
19	14	2	MI-2
20	13	2	MI-2, GR-3
21	14	2	PE-2
22	12	2	PE-2
23	32	2	MI-2, PE-3
24	6	2	ME-4
25	7	1	ME-1
26	1	1	PE-2
27	não informado	1	MI-2
28	16	1	PE-3
29	não informado	1	MI-2
30	4	1	ME-6
31	16	1	GR-3
32	não informado	1	MI-6
Total		203	19

Inicialmente, foi realizado o exame externo minucioso, seguido por uma incisão longitudinal de pele e subcutâneo da região mentoniana à região púbica, com a avaliação e coleta de linfonodos superficiais. A região de pele ao redor do cordão umbilical era contornada para permitir a sua coleta, juntamente com o úraco (Figura 2).

Com material estéril, foi realizada a abertura das cavidades, e, após a inspeção e descrição das lesões, procedia-se à coleta de amostras para extração de DNA, isolamento bacteriano e exame histopatológico. Inicialmente, o baço e o omento foram removidos e acondicionados em placa

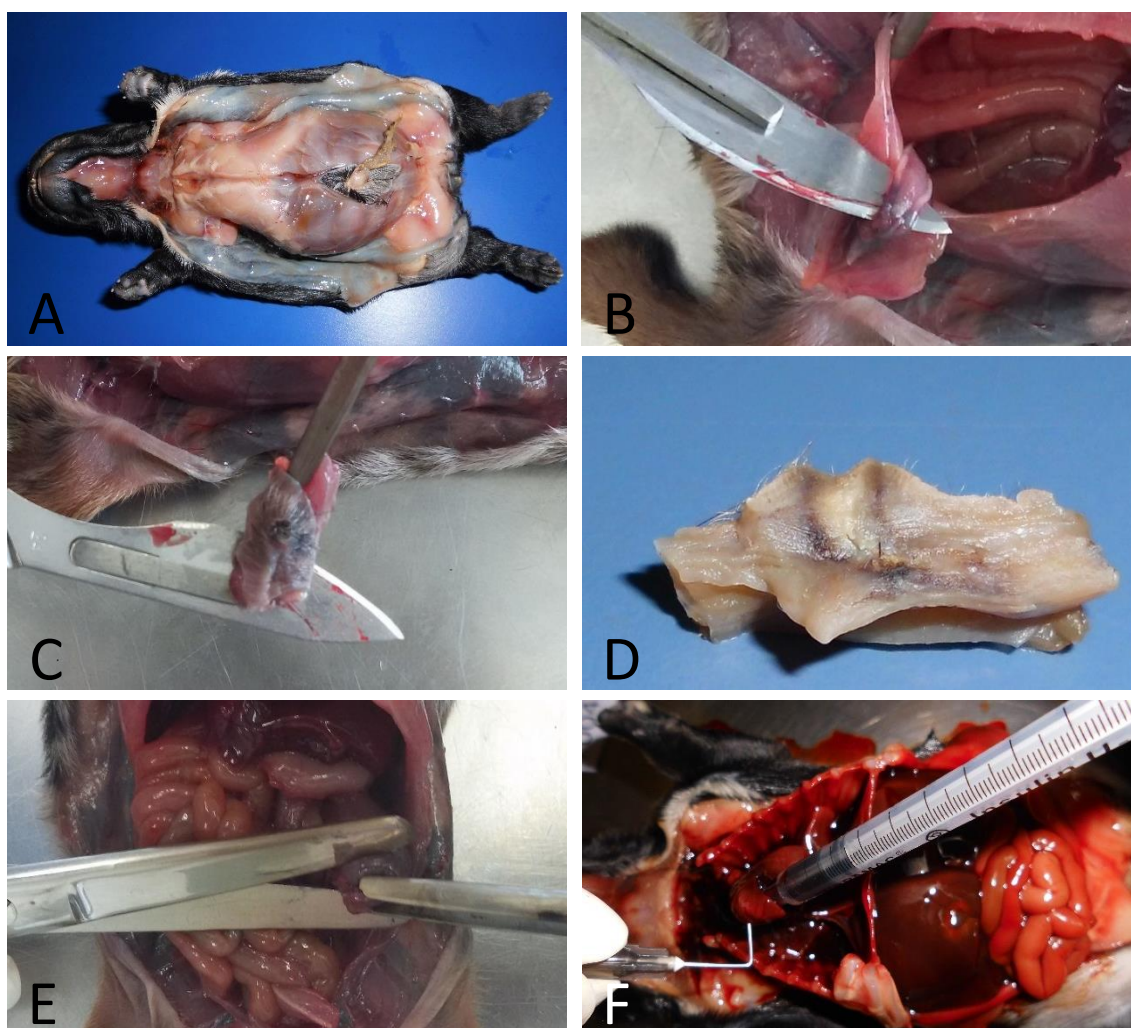


Figura 2. Necropsia de fetos e neonatos caninos. A. Incisão de pele e subcutâneo, contornando o cordão umbilical. B. Secção do úraco, que foi mantido junto à parede abdominal. C. Fragmento contendo umbigo, pele adjacente, parede abdominal e úraco. D. Após a fixação, o umbigo e os tecidos adjacentes foram seccionados longitudinalmente na linha média para inclusão em parafina. E. Coleta de amostra de rim para extração de DNA e isolamento bacteriano. F. Coleta de sangue cardíaco através de secção do ventrículo direito, para isolamento bacteriano.

de petri estéril, com separação em três a seis partes, dependendo de seu tamanho: uma para extração de DNA, uma para isolamento bacteriano e uma para exame histopatológico. Em seguida, foram coletados quatro fragmentos de fígado, rim e pulmão (dois para extração de DNA e dois para isolamento bacteriano). Com uma incisão no ventrículo direito foi coletado 0,1 mL de sangue cardíaco para isolamento bacteriano, e um fragmento de miocárdio do ventrículo direito e outro do ventrículo esquerdo para extração de DNA. Imediatamente após a coleta, as amostras foram resfriadas em isopor com gelo reciclável para encaminhamento ao laboratório de microbiologia.

Após a coleta das amostras para análises moleculares e isolamento bacteriano, procedia-se à palpação dos órgãos, coleta de fragmentos de intestinos delgado e grosso, dos órgãos torácicos e abdominais em bloco e do crânio, para fixação em formol 10% tamponado. Fígado e pulmões eram fatiados e a porção restante dos rins aberta longitudinalmente antes da imersão no fixador.

Os filhotes foram classificados em três grupos distintos de acordo com as alterações cadavéricas observadas: fresco, autolisado, mumificado. Independentemente de terem sido congelados ou não antes da necropsia, eram considerados frescos os indivíduos com alterações cadavéricas ausentes ou leves. Autolisados foram os filhotes que apresentaram autólise, embebição hemoglobínica e/ou pseudomelanose. Mumificados eram fetos que sofreram autólise tecidual intrauterina e reabsorção parcial ou total dos fluidos corporais, com grande alteração de cor e consistência dos tecidos, geralmente escurecidos (marrom, cinza ou pretos) e friáveis.

A determinação da idade do feto/neonato baseou-se em informações fornecidas pelo criador na ficha de identificação de ninhada (Anexo) e em características morfológicas do cadáver, como o desenvolvimento de pelos e unhas, que ocorre ao final da gestação (Pretzer, 2008b), expansão pulmonar (que ocorre com a primeira respiração, imediatamente após o nascimento), desidratação do coto umbilical (observada nas primeiras 24 horas após o nascimento) e evolução do processo de cicatrização umbilical (entre o segundo e sétimo dias após o nascimento).

4.2.2. Histopatologia

Fragmentos de baço, timo, linfonodos, fígado, rim, coração, pulmão, estômago, intestinos delgado e grosso, cordão umbilical, bexiga, gônadas, útero, encéfalo e fragmentos de pele (quando lesões macroscópicas estavam presentes) foram coletados para exame microscópico e fixados em formalina a 10% tamponada para inclusão em parafina, cortados com espessura de 4 µm em micrótomo de rotação e corados por Hematoxilina e Eosina.

4.2.3. Microscopia eletrônica

Com o objetivo de analisar inclusões observadas em células epiteliais da mucosa lingual de um filhote, um fragmento da língua fixado em formol 10% tamponado foi transferido para solução de Karnovsky, lavada em tampão fosfato 0,1 M, transferida para tetróxido de ósmio 2%, lavada com salina contendo 17,8% de sucrose, e transferida para solução aquosa de acetato de uranil com 13,3% de sucrose. A amostra foi então desidratada em etanol, imersa em acetona, incluída em resina epon, cortada, corada com citrato de chumbo, e examinada em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12-120 kV – FEI SpiritBiotwin, USA) (Turchetti et al. 2013).

4.3. Análises moleculares

4.3.1. Extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR)

Amostras de pulmão, coração, fígado, baço e rim foram coletados de forma asséptica, congelados a -80°C , e encaminhados em gelo seco ao Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A extração de DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pitcher et al. (1989), com algumas modificações. Um fragmento de aproximadamente 50 mg de tecido foi macerado com o auxílio de uma lâmina de bisturi em 100 μL de tampão TE pH 8.0 (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M pH 8.0 - Synth/Brasil), seguido da adição de 500 μL de solução de GES (5 mol/L de tiocianato de guanidina - Sigma-Aldrich/ EUA, 100 mmol/L EDTA pH 8.0 - Synth/Brasil, e 0,5% v/v sarcosyl - Sigma-Aldrich/EUA) e de incubação por 10 minutos em gelo. Foram adicionados 250 μL de acetato de amônio 7,5 M gelado (Synth/Brasil), seguido de incubação em gelo por 10 minutos, e adição de 500 μL de solução de clorofórmio 2-pentanol (24:1) (Sigma-Aldrich/EUA) gelado. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 18.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e a ele adicionados 405 μL de isopropanol gelado (Merk Millipore/Alemanha). As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 6.500 g e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70% (Merk Millipore/Alemanha). O precipitado final foi ressuspenso em 100 μL de água ultrapura e incubado a 54°C por 15 minutos para completa eluição. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C para uso posterior.

O DNA extraído foi analisado por espectrofotometria para avaliação da pureza e da concentração e, após a avaliação, foi feita uma mistura equitativa contendo 50 ng/ μL de DNA extraído de cada órgão, com concentração final de 250 ng/ μL . Para averiguação da integridade do DNA extraído foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da actina- β de cada mistura (Turchetti et al., 2015). Para isso, foram usados 22 μL de PCR SuperMix (22 mM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM cloreto de magnésio, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP, 22 U/mL Taq DNA Polimerase recombinante - Invitrogen/EUA), 0,5 μL de cada primer (10 μM), F: 5'-GGCATCCTGACCCTGAAGTA-3' e R: 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3', e 2,5 μL de DNA da amostra. A amplificação foi feita a 95°C por 10 minutos, 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos durante 35 ciclos consecutivos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos, com produto esperado de 98 pares de base (pb). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com SYBR®Safe DNA Gel Stain (Invitrogen/EUA) e examinados em um transiluminador de luz ultravioleta.

As amostras positivas para actina- β foram submetidas à PCR para *Leishmania infantum*, *Brucella* spp. Herpesvírus canino, Parvovírus canino e *Bocaparvovirus*. Para isso, foram usados 22 μL de PCR Supermix (Invitrogen/EUA), 1,0 μL de cada primer (10 μM) e 2,5 μL de DNA da amostra, exceto na PCR para *Leishmania*, em que foi feita uma solução contendo 5,1 μL de 10 X PCR buffer, 5,1 μL de solução de dNTP a 200 μM , 0,2 μM de cada primer, 3 mM de MgCl_2 , 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen/USA) e 2,5 μL de DNA da amostra, em um volume final de 25 μL . Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose com concentração variando de 0,8% a 1,5%, dependendo da reação, que foram corados com SYBR®Safe DNA Gel Stain (Invitrogen/EUA) e examinados em um transiluminador de luz ultravioleta. Detalhes sobre os parâmetros das PCR utilizados e primers empregados nas reações encontram-se resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de primers, tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento e referências utilizadas para as PCR realizadas neste trabalho.

Gene Amplificado (agente)	Iniciadores e referências	Temperatura, tempo e ciclos para PCR	Produto PCR (pb)
<i>bcbp31</i> (<i>Brucella</i> spp.)	Baily et al., 1992 F: 5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3' R: 5'-CGCGCTTGCCCTTCAAGGTCTG-3'	94°C-3 min.; 40 ciclos (94°C-30 seg., 60°C-30 seg., 72°C-30 seg.) e 72°C-10 min.	223 pb
Fragmento LT1 do kDNA (<i>Leishmania infantum</i>)	Diniz et al., 2005 F: 5'-CTTTTCTGGTCCCCGCGGGTAGG-3' R: 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'	94°C-4 min.; 49 ciclos (94°C-30 seg., 59°C-30 seg., 72°C-30 seg.) e 72°C-10 min.	145 pb
Glicoproteína B (CaHV-1)	Ronsse et al., 2005 F: 5'-CCTAAACCTACTTCGGATGA-3' R: 5'-GGCTTTAAATGAACTTCTCTGG-3'	94°C-3 min.; 60 ciclos (94°C-50 seg., 49°C-50 seg., 72°C-50 seg.) e 72°C-10 min.	450 pb
VP1/VP2 (CPV)	Strottmann et al., 2008 F: 5'-GGGTGGAAATCACAGCAAC-3' R: 5'-AAATGGCCCTTGTTAGACG-3'	95°C-5 min.; 30 ciclos (94°C-60 seg., 54°C-60 seg., 72°C-60 seg.) e 72°C-10 min.	887 pb
(<i>Bocaparvovirus</i>)	Este trabalho F: 5'-GCCAGCACNGGNAARACMAA-3' R: 5'-CATNAGNCAYTCTCCACCA-3'	95°C-5 min.; 35 ciclos (95°C-30 seg., 57,5°C-30 seg., 72°C-30 seg.) e 72°C-10 min.	141 pb

Todas as reações de PCR incluíram um controle negativo e um controle positivo. Para o controle negativo, a amostra de DNA foi substituída por 2,5 µL de água ultrapura na mistura. O controle positivo das reações para detecção de *Brucella* sp. foi representado por DNA genômico extraído de colônias de *Brucella ovis* (cujo alvo de amplificação é 100% conservado em comparação à *B. canis*); nas reações para detecção de *Leishmania infantum* foi utilizado como controle positivo o DNA extraído do sangue de um cão sabidamente infectado; nas reações para detecção de herpesvírus canino, foi utilizada uma amostra de CaHV-1 isolada de um neonato canino e gentilmente cedida pelo Professor Dr. João Pessoa de Araújo Júnior (UNESP-Botucatu); nas reações para detecção de parvovírus canino, foi utilizada uma amostra de parvovírus vacinal (Nobivac Puppy DP®, MSD); nas reações para detecção de *Bocaparvovirus* foi utilizado um oligonucleotídeo sintético de 230 pb (Integrated DNA Technologies Inc., USA), delineado a partir do alinhamento de sequências de vírus do gênero *Bocaparvovirus*.

4.3.2. Sequenciamento dos produtos da reação de *Brucella* spp.

Para confirmar os resultados obtidos na PCR para *Brucella* spp., os produtos amplificados nas reações de amostras de três filhotes positivos para *Brucella* spp., provenientes de três canis diferentes, foram sequenciados. Para isso, o produto foi recortado do gel e purificado com o emprego do kit QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen/EUA) de acordo com orientações do fabricante e sequenciado por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye3.1. A análise dos arquivos gerados foi realizada com o emprego dos softwares livres Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>) e as sequências obtidas comparadas com referências depositadas por meio do Blast (Altschul et al., 1990).

4.3.3. PCR-RFLP para identificação de Piroplasmas

Amostras de DNA de um neonato canino com anemia hemolítica (icterícia e esplenomegalia) suspeito de infecção protozoal, foram submetidas a PCR-RFLP para identificação de protozoários da ordem Piroplasmida, segundo o protocolo descrito por Lemos et al. (2012). Para tanto, foi realizada PCR com os primers PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3'), que têm como alvo uma região do gene 18SrRNA, seguida de digestão dos produtos da reação pelas enzimas *HinfI* e *TaqI* (Lemos et al., 2012).

Foram analisadas as amostras de DNA de fígado, baço, pulmão, rim e coração isoladamente e combinadas em uma mistura equitativa, na concentração final de 250 ng/μL. As reações de PCR foram realizadas com 2,5 μL da amostra de DNA, 22 μL de PCR Supermix (Invitrogen - USA), 1,0 μL de cada primer (10 μM). A reação foi realizada com a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da reação foram submetidos a digestão pelas enzimas *HinfI* e *TaqI* por 3 horas (Lemos et al, 2012). Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 1,5% corado por SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen/EUA) e examinados em luz ultravioleta.

Além disso, para confirmar os resultados obtidos no RFLP, o produto de duas reações para o gene 18S rRNA foram sequenciados. Na primeira reação foram usados os iniciadores Bab 33-57 (5'-GCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAA-3') e Bab 432-409 (5'-TTCCTTAGATGTGGTAGCCGTTTC-3'), que amplificam um fragmento de ~370 bp. Os parâmetros da amplificação foram 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 40 segundos, 56°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Na segunda reação, foram usados os iniciadores Bab 143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') e Bab 858-834 (5'-CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCC-3'), com produto esperado de ~715 bp. As condições da reação foram 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, os produtos amplificados foram recortados do gel e purificados usando o kit QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen/EUA) de acordo com orientações do fabricante e sequenciado por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye3.1. A análise dos arquivos gerados foi realizada com o emprego dos softwares livres Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&>

catID=600583&tab=DetailInfo) e as sequências obtidas foram comparadas com referências depositadas por meio do Blast (Altschul et al., 1990).

4.4. Imuno-histoquímica

4.4.1. Detecção de antígenos de *Brucella* spp.

Para detecção de *Brucella* spp. nos tecidos, seções com 4 µm de espessura de pulmão, coração, fígado, baço, estômago, intestinos, rim, cordão umbilical, próstata, gônadas e útero de 10 filhotes, sistema nervoso e olho de três filhotes, foram submetidos a reação imuno-histoquímica. Para inclusão dos animais nesta análise, o critério foi a positividade para *Brucella* sp. na reação de PCR e ausência de autólise ou autólise discreta dos tecidos (boa qualidade histológica) ao exame microscópico de cortes corados por hematoxilina e eosina.

Foi utilizado um anticorpo primário policlonal anti-*Brucella* spp. produzido em coelho (Santos et al., 1998). A reação de imuno-histoquímica foi realizada como descrito por Xavier et al. (2009b), com algumas modificações. Os cortes de tecido foram desparafinizados, hidratados, e incubados em três banhos sucessivos de peróxido de hidrogênio 10%, por 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, e após cada etapa da reação, os cortes de tecidos foram lavados três vezes seguidas em PBS. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com a incubação dos cortes de tecidos em leite desnatado (Molico®) na concentração de 2,5%, por 1 hora. Então, os tecidos foram incubados com o anticorpo primário, na diluição de 1:1000, em câmara úmida, em temperatura de geladeira, *overnight*. O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo universal (coelho e camundongo) biotinizado e o complexo estreptoavidina-peroxidase (LSAB2 System-HRP, DAKO/EUA), os quais foram incubados, respectivamente, por uma hora e 40 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada com o cromógeno AEC, por 10 minutos (DAKO/EUA). Em seguida, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Meyer.

Como controle positivo, foram usados tecidos de camundongos sabidamente infectados por *Brucella*. Os controles negativos foram constituídos pelos tecidos dos camundongos infectados e por cortes de tecido de um natimorto canino positivo na PCR para *Brucella* spp. com a supressão do anticorpo primário na reação imuno-histoquímica.

Os tecidos foram avaliados em microscopia de luz comum e a frequência de marcação positiva por campo de grande aumento (400X) foi classificada em três intensidades: + = uma marcação positiva a cada 10 campos ou mais; ++ = uma marcação positiva a cada dois campos; +++ = mais de duas marcações positivas em mais de 10 campos.

4.4.2. Detecção de antígenos de *Toxocara canis*

Para detecção de antígenos de *Toxocara canis* nos tecidos dos fetos e neonatos caninos, foi produzido um anticorpo primário policlonal anti-*T. canis* em coelho, de acordo com a metodologia descrita por Flecher et al. (2016). Resumidamente, fêmeas adultas de *Toxocara canis* foram obtidas de cães naturalmente infectados após vermifugação. Os ovos foram coletados e incubados em solução de ácido sulfúrico 1% por seis semanas, até se tornarem ovos com larvas de terceiro estágio, quando então foram inoculados por via oral em um coelho. Foram realizadas

três inoculações com intervalo de 15 dias. Após duas semanas da última inoculação, o coelho foi eutanasiado para realização de necropsia e coleta de sangue para obtenção do soro. Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Vila Velha, sob o parecer 361-2015.

Cortes histológicos de fígado e pulmão de 10 filhotes foram utilizados nesta reação de imuno-histoquímica. Foram selecionados para análise cinco filhotes portadores de necrose e/ou granulomas hepáticos e cinco que não apresentavam a lesão e que não apresentassem autólise nos tecidos ao exame microscópico de cortes corados por hematoxilina e eosina.

Para a reação de imuno-histoquímica, foi utilizado o kit SPD - Sistema HRP (Spring/EUA). Depois de realizada desparafinização, os cortes de tecidos foram tratados para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas de acordo com orientações do fabricante. O anticorpo primário policlonal anti-*T. canis* foi utilizado na diluição de 1:1000 e incubado em câmara úmida em temperatura de geladeira *overnight*. O conjugado foi constituído pelo complexo estreptoavidina-peroxidase, incubado por 15 minutos, e a revelação com o cromógeno DAB, incubação por 10 minutos e contra-coloração dos tecidos com hematoxilina.

Cada bateria de reação imuno-histoquímica incluiu como controles secções de fígado de gerbil infectado experimentalmente por *T. canis* em um outro estudo (Flecher et al., 2016). O controle negativo foi realizado com a supressão do anticorpo primário na reação.

4.5. Isolamento e identificação bacteriana

Amostras de 174 filhotes foram coletadas para isolamento e identificação bacteriana. Foram excluídos desta análise 29 filhotes devido ao avançado grau de autólise e/ou putrefação do cadáver. Fragmentos com aproximadamente 100 mg de pulmão, fígado, baço e rim e 0,1 mL de sangue cardíaco foram coletados de 159 filhotes. Em quatro fetos abortados não foi possível coletar o baço nem o sangue cardíaco, em dez filhotes não havia sangue no interior do coração, e de um natimorto foram coletados apenas pulmão e sangue cardíaco devido ao canibalismo da região abdominal. Foram submetidas ao isolamento bacteriano 849 amostras, através dos métodos de rotina descritos por Koneman (1997) e relacionados a seguir.

Os fragmentos de tecido foram macerados individualmente em placa de petri com 2 mL de solução salina. Do homogenado de tecido em salina, 50 µL foram inoculados em ágar sangue ovino (BHI Ágar – Acumedia/Neogen/EUA + sangue ovino 10%), 50 µL em ágar MacConkey (Kasvi/Brasil); e 100 µL em 5 mL de caldo BHI (Kasvi/Brasil), incubados a 37°C por 18-24 horas, em estufa bacteriológica. Nos casos de cultivos negativos, 50 µL do caldo BHI com a respectiva amostra, após incubação por 24 horas, eram plaqueados em ágar sangue e ágar MacConkey, para incubação a 37°C por mais 24 horas. Os cultivos positivos foram submetidos a repiques nos respectivos meios para isolamento bacteriano.

O isolamento e identificação dos isolados bacterianos foram realizados por meio de análise da morfologia macroscópica das colônias, ocorrência de hemólise em ágar sangue, digestão da lactose em ágar MacConkey, morfologia da célula bacteriana na coloração de Gram, prova da catalase (Peróxido de Hidrogênio 3%, 10 volumes – Rioquímica/Brasil) e reação de oxidase (tiras de oxidase – Newprov/Brasil) para triagem inicial. Então, um isolado representativo de cada gênero bacteriano, obtido de cada filhote, foi submetido às análises adicionais descritas abaixo para identificação ao nível de gênero ou espécie.

Para identificar *Staphylococcus* spp., os isolados de organismos Gram-positivo e catalase-positivo foram submetidos às provas de motilidade (meio MIO – Synth) e resistência ao NaCl 6,5% (NaCl PA – Dinâmica Química Contemporânea/Brasil) em BHI caldo (Kasvi/Brasil). Isolados de cocos Gram-positivo, catalase-positivo, oxidase-negativo, motilidade-negativo e NaCl-positivo foram classificados como *Staphylococcus* spp. (Figura 3). Para diferenciar *Streptococcus* de *Enterococcus*, os organismos Gram-positivo e catalase-negativo foram inoculados em meio BHI caldo com NaCl 6%. Foram classificados como *Streptococcus* spp. os isolados com resultado negativo e *Enterococcus* spp. os isolados com resultado positivo na prova de NaCl, representado pela turvação do meio de cultura (Figura 3).

Isolados bacterianos caracterizados como Gram-negativo foram submetidos às provas bioquímicas do sistema IMViC: indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato. Para a realização da prova do indol, o isolado foi inoculado em meio MIO (Synth/Brasil), incubado a 37°C por 24h, e adicionado o reagente de Kovacs (Newprov/Brasil). Os testes de vermelho de metila e Voges-Proskauer foram realizados com inoculação em caldo MRVP (Kasvi/Brasil), e para a prova de fermentação do citrato, a inoculação foi feita em ágar citrato (Kasvi/Brasil). Isolados indol-positivo, vermelho de metila-positivo, Voges-Proskauer-negativo e citrato-negativo, foram identificados como *E. coli*. Isolados indol-negativo, vermelho de metila-negativo, Voges-Proskauer-positivo e citrato-positivo, foram identificados como *K. pneumoniae*.

Trinta e cinco isolados de bactérias Gram-negativas foram submetidos a identificação com o sistema Bactray® (Laborclin/Brasil), de acordo com orientações do fabricante. Após identificação, os isolados foram criopreservados em solução de glicerol 10% em caldo BHI.

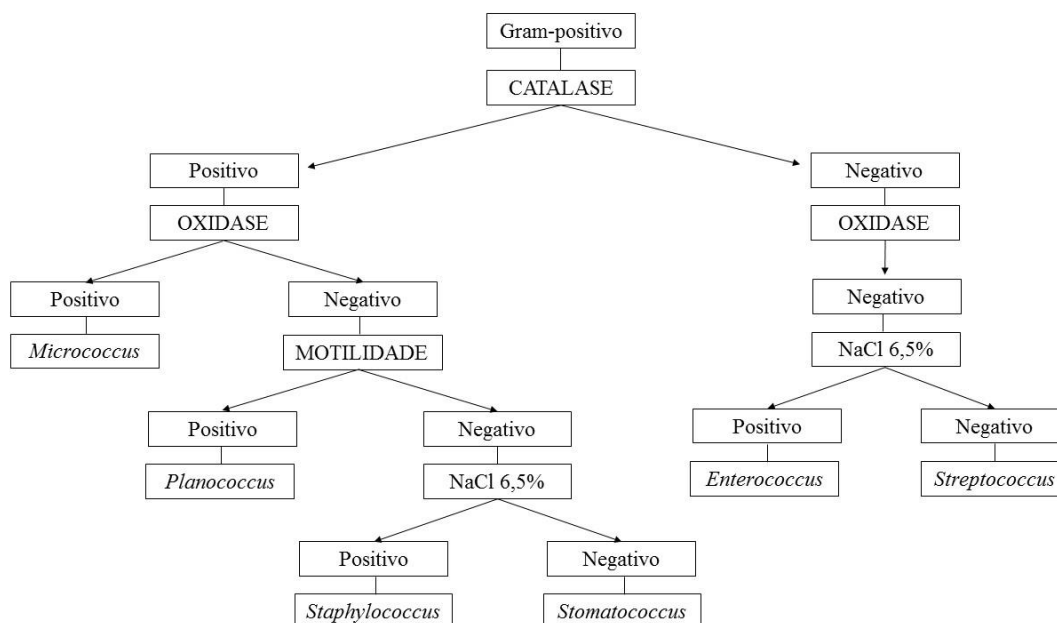


Figura 3. Fluxograma representativo das provas empregadas e respectivos resultados para classificação dos isolados de bactérias Gram-positivas obtidas neste trabalho.

5. RESULTADOS

5.1. Anatomopatologia

Os 203 filhotes eram provenientes de 89 ninhadas: 82 ninhadas a termo, três ninhadas prematuras, e quatro ninhadas abortadas entre 40-48 dias de gestação. Nove neonatos de um mesmo canil foram encaminhados sem identificação da ninhada e da idade, mas apresentavam expansão pulmonar e cicatrização umbilical incipiente, o que os caracterizou como neonatos.

Quanto à idade, os filhotes amostrados foram: oito fetos abortados entre 40-48 dias de idade gestacional, 57 natimortos (sendo três fetos mumificados) e 138 neonatos. Dentre os 138 neonatos, 62 morreram com até dois dias de idade, 42 tinham entre 3 e 7 dias, 16 tinham entre 8 e 14 dias, e nove tinham entre 15 e 21 dias. Os nove filhotes que não tiveram a idade informada pelo criador tinham aproximadamente 3 a 7 dias de idade com base em seu desenvolvimento corporal e cicatrização do umbigo (Figura 4).

Dentre os 203 filhotes necropsiados, lesões macro e/ou microscópicas foram observadas em 188 animais. O avançado grau de autólise cadavérica associado ao congelamento ($n = 12$) ou a mumificação fetal ($n = 3$) impediram a avaliação macro e microscópica em 15 animais. Em 27 filhotes, foi possível realizar apenas o exame macroscópico devido a autólise tecidual, que ocorreu com maior frequência entre os natimortos (25/27), por autólise intrauterina e congelamento. Portanto, a avaliação histopatológica, de pelo menos um tecido, foi realizada em 161 filhotes.

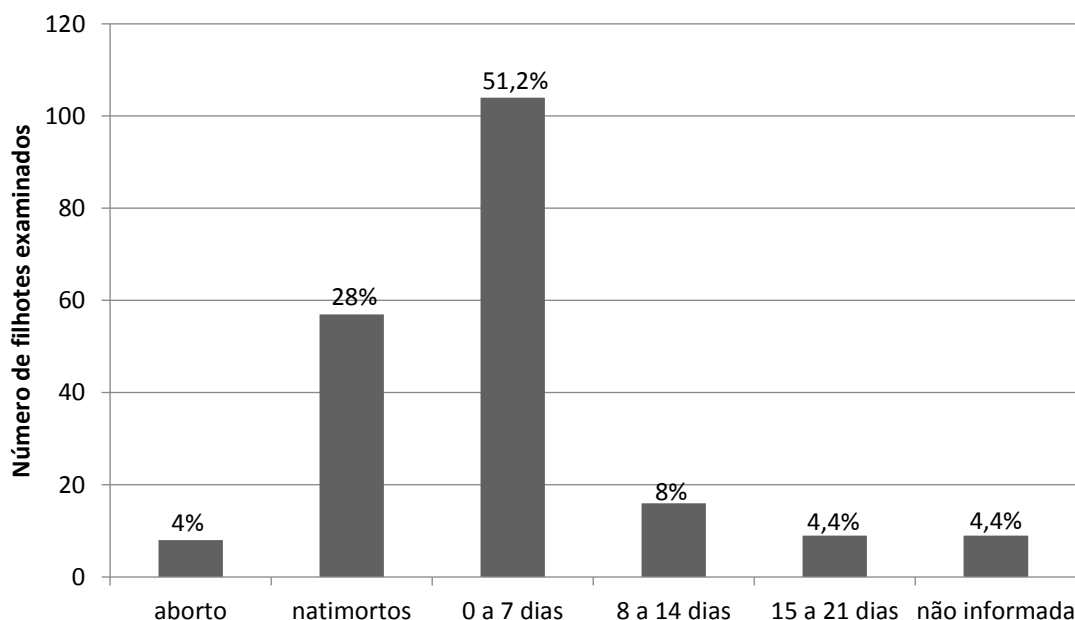


Figura 4. Número e frequência de fetos, natimortos e neonatos examinados nas diferentes faixas de idade, totalizando 203 indivíduos.

As lesões inflamatórias foram as mais comumente descritas, sendo as alterações mais frequentes: pneumonia (85,43%, 129/151), onfalite (56,25%, 54/96), hepatite (47,21%, 76/161), epicardite (38,51%, 62/161), glossite (21,12%, 34/161), miocardite (17,39%, 28/161) e endocardite (16,77%, 27/161). As lesões inflamatórias serão detalhadas a seguir em cada sistema orgânico. Malformações congênitas foram verificadas em 15 filhotes, sendo que seis filhotes apresentaram mais de uma malformação (Tabela 4).

5.1.1. Sistema respiratório

Ao exame macroscópico (n = 188), todos os pulmões apresentaram alterações. Em três natimortos, havia hipoplasia pulmonar grave. Hiperemia estava presente em 186 casos. O padrão e intensidade da hiperemia variaram, frequentemente associada a inflamação, hemorragia e/ou necrose. Os pulmões foram examinados microscopicamente em 151 animais. As pneumonias (Figura 5) foram as lesões mais frequentes nos fetos e neonatos examinados (85,43%, 129/151), representando a lesão principal em 63 filhotes (41,72%). Contudo, infiltrado leucocitário em graus variáveis estava presente nos pulmões de outros 66 dos 151 filhotes.

Tabela 4. Malformações observadas em natimortos e neonatos caninos necropsiados.

Malformações	Raças acometidas	Número de filhotes portadores
Palatosquise	Buldogue Francês (4), Spitz Alemão (2), Chihuahua (1), Whippet (1), Collie (1)	9
Anoftalmia/microftalmia	Poodle	3
Queilosquise	Poodle	2
Comunicação interventricular	Poodle, Spitz Alemão	2
Pectus excavatum	Buldogue Francês	2
Hipoplasia pulmonar	Spitz Alemão, Buldogue Francês, Shitzu	3
Comunicação interatrial	Buldogue Inglês	1
Persistência do ducto arterioso	Collie	1
Atresia anal com fístula reto-vaginal	Poodle	1
Onfalocele	Buldogue Francês	1
Hérnia diafragmática congênita	Shitzu	1
Hérnia peritônio-pericárdica	Maltês	1

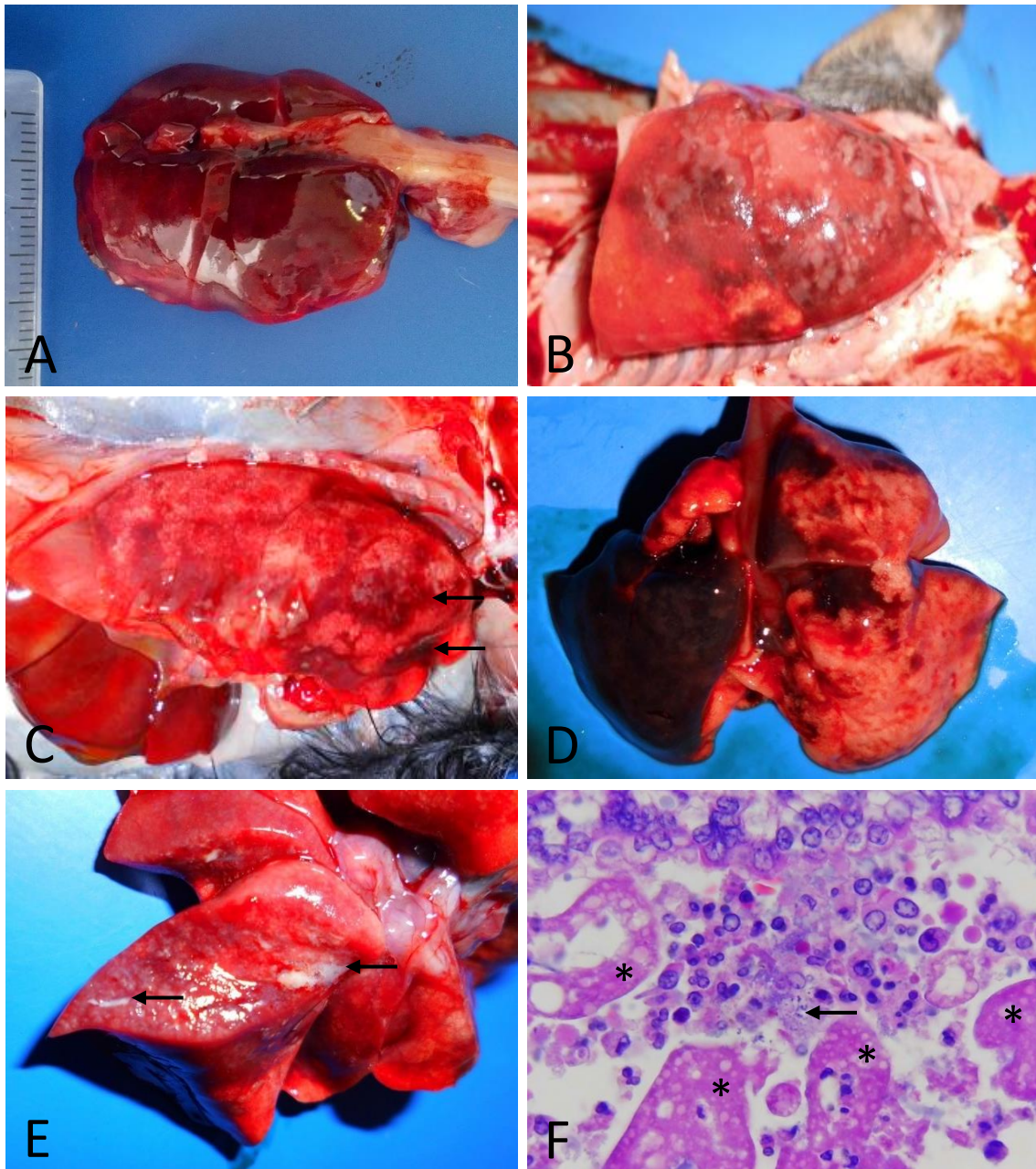


Figura 5. Pneumonias. A. Neonato com dois dias de idade: pneumonia intersticial necro-hemorrágica. Pulmão armado, vermelho intenso e brilhante. B. Neonato com cinco dias de idade: pneumonia broncointersticial e necrosante. C. Neonato com 21 dias de idade: broncopneumonia, mais intensa na região crânio-ventral. D. Neonato com quatro dias de idade: pneumonia broncointersticial com infarto do lobo diafragmático esquerdo. E. Neonato com quatro dias de idade: broncopneumonia aspirativa. O pulmão apresentava-se armado, com aumento da consistência e com leite nos espaços aéreos (setas). F. Microscopia do pulmão visto em E, evidenciando glóbulos eosinofílicos de leite (*) associados a infiltrado leucocitário e bactérias (seta). H&E (400X).

As pneumonias ocorreram nos seguintes padrões: pneumonia intersticial (57,36%, 74/129; Figura 5A), broncointersticial (34,88%, 45/129; Figura 5B) e broncopneumonia (7,75%, 10/129; Figura 5C). A intensidade dos processos pneumônicos variou e o infiltrado leucocitário era misto, com macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Atelectasia multifocal em variadas intensidades foi observada em 55 neonatos (42,64%) de diferentes idades, associada a lesões inflamatórias. Infarto pulmonar associado a pneumonia broncointersticial e trombose ocorreu em sete animais (Figura 5D).

Pneumonia intersticial com necrose alveolar massiva e hiperemia difusa intensa (Figura 5A) foi observada em 31,08% (23/74) dos casos de pneumonia intersticial. Nestes pulmões, o infiltrado leucocitário era predominantemente macrofágico, com linfócitos e neutrófilos. Macroscopicamente, estes 23 pulmões caracterizaram-se por coloração vermelha intensa difusa, encontravam-se armados com impressão das costelas, brilhantes, com redução ou ausência de crepitação, e áreas de atelectasia multifocal a coalescente.

Pneumonia por aspiração de leite (Figura 5E) foi observada em oito neonatos (5,30%) que morreram com dois a 18 dias de idade. Todos os filhotes acometidos eram alimentados por aleitamento artificial: seis deles com mamadeira e dois deles via sonda oro-gástrica. Nenhum caso de pneumonia por aspiração foi diagnosticado em neonatos que mamavam diretamente na cadela. O leite aspirado caracterizou-se microscopicamente por glóbulos eosinofílicos no interior de brônquios, bronquíolos e alvéolos associados a exsudato leucocitário de macrófagos e neutrófilos e numerosas colônias de cocos e bacilos (Figura 5F).

Em quatro natimortos com pneumonia intersticial discreta, havia arterite discreta com infiltrado de macrófagos e neutrófilos na parede arterial multifocal. Hemorragia leve perivascular e/ou peribronquial foi observada em outros sete natimortos.

Dentre os três casos de hipoplasia pulmonar (três natimortos), dois eram portadores de malformações múltiplas, e o terceiro apresentava hérnia diafragmática congênita. Nos três casos, havia compressão do parênquima pulmonar, em um deles devido a malformação torácica com cardiomegalia, no outro devido a hidrotórax, e no terceiro devido a presença das alças intestinais na cavidade abdominal. No primeiro, ocorreu também broncopneumonia.

Um caso diagnosticado como pneumopatia urêmica, em um neonato de 13 dias que morreu com desidratação extrema, caracterizou-se por edema pulmonar difuso com necrose e mineralização da parede alveolar multifocal discreta, compatíveis com lesões de uremia. Houve um caso de fibrose intersticial pulmonar associada a persistência do ducto arterioso.

5.1.2. Sistema cardiovascular

Malformações cardíacas foram observadas em quatro animais, sendo verificados dois casos de comunicação interventricular, em um natimorto com anasarca (Figura 6A e B) e em um neonato com 18 dias, ambos com malformações múltiplas combinadas; um caso de comunicação interatrial em um natimorto (Figura 6C) e um caso de persistência do ducto arterioso em um neonato morto com 21 dias, ambos com edema generalizado (hidrotórax, hidropericárdio, ascite, e edema subcutâneo leve). A comunicação interatrial caracterizou-se por uma falha da parede atrial com 0,4 cm de diâmetro, e dilatação das quatro câmaras cardíacas, em um natimorto da raça Buldogue Inglês. Todos os outros neonatos examinados nesta pesquisa apresentavam o forame oval já fechado, sendo evidente a sua distinção do caso de comunicação interatrial descrito.

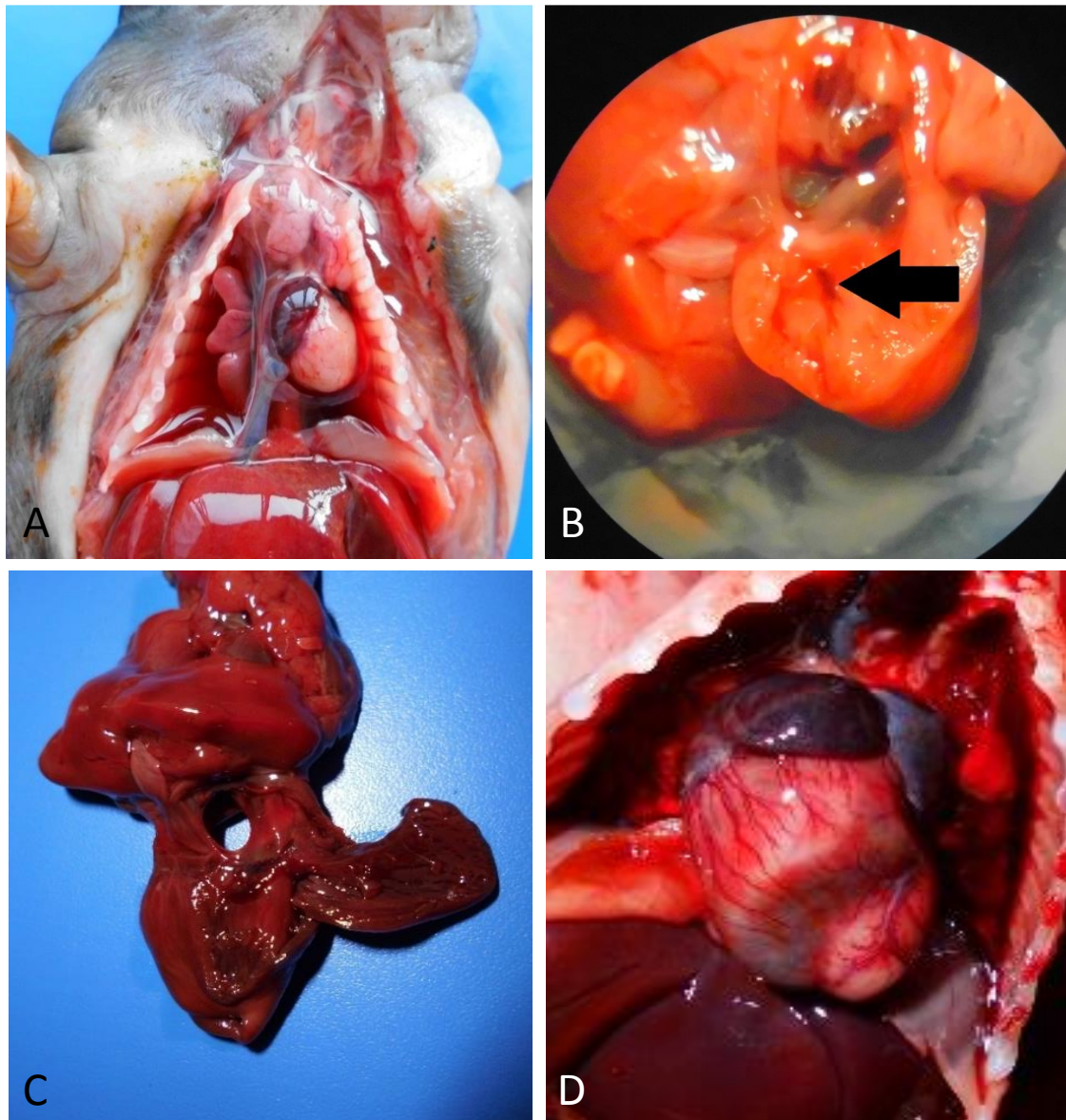


Figura 6. Lesões cardiocirculatórias. A. Spitz Alemão, natimorto: coração globoso, hipoplasia pulmonar e anasarca, caracterizada por hidrotórax e edema subcutâneo intenso. B. Spitz Alemão, natimorto, ilustrado na figura A. Coração, ventrículo direito: defeito no septo interventricular adjacente à válvula átrio-ventricular direita, possibilitando uma comunicação interventricular (seta). Na parede atrial nota-se o forame oval já ocluído. C. Buldogue Inglês, natimorto. Coração: orifício de 0,4 cm de diâmetro na parede atrial diagnosticado como comunicação interatrial associada a insuficiência cardíaca congestiva com edema generalizado. D. Spitz Alemão, 13 dias de idade: marcante hiperemia do epicárdio, com dilatação intensa do ventrículo direito e aurículas. Microscopicamente, havia epicardite e miocardite multifocal leve. Este neonato foi positivo na PCR para *Brucella* spp.

O ducto arterioso encontrava-se contraído ao nascimento, com discreta comunicação entre artéria pulmonar e aorta nos natimortos, e totalmente ocluído a partir de um dia de vida. Por outro lado, em um caso de persistência do ducto arterioso observada aos 21 dias de idade, além da patência do canal de comunicação interarterial, havia uma válvula na abertura do ducto.

Pericardite e epicardite estavam presentes em grande número de natimortos e neonatos examinados macroscopicamente (43,62%; 82/188), com hiperemia intensa e exsudato seroso no saco pericárdico. Microscopicamente, infiltrado linfocítico e macrófágico estava presente no epicárdio (38,51%; 62/161), especialmente na região perivascular no sulco coronário e no tecido conjuntivo adjacente ao nodo sinoatrial. Em quatro filhotes, havia ganglioneurite com necrose e perda de neurônios.

Miocardite (Figura 6D) foi observada em 28 filhotes, sendo um feto abortado, nove natimortos, dez neonatos com até uma semana de vida, sete neonatos com oito a 14 dias de vida, e um neonato com 21 dias de vida. Na macroscopia, havia hiperemia e dilatação das câmaras cardíacas, e, na microscopia, infiltrado leucocitário discreto a leve, frequentemente perivascular, em variáveis proporções de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Em um neonato com 11 dias de vida havia plasmócitos imaturos, associados a linfócitos, macrófagos e neutrófilos, o único caso dentre os 161 filhotes analisados histopatologicamente no qual havia plasmócitos.

Endocardite ocorreu em 27 animais (um feto abortado, nove natimortos, dez neonatos com até uma semana de vida e sete neonatos com oito a 14 dias de vida), em quatro deles encontrava-se associada a trombose, e havia colônias bacterianas em três deles. O infiltrado inflamatório era linfocítico e macrófágico na maioria dos animais, associado a neutrófilos em apenas quatro indivíduos, e exclusivamente linfocitário em três casos.

5.1.3. Sistema digestório

Macroscopicamente, lesões gastrointestinais foram raramente detectadas. Dois natimortos apresentaram úlceras na língua, e em dois natimortos e três neonatos com nove dias de idade, a língua estava com a borda vermelha, devido a hemorragia (Figura 7A). Em apenas dois animais, petéquias foram observadas no estômago (Figura 7E), tanto na superfície mucosa, quanto na superfície serosa. Havia equimoses multifocais na serosa intestinal em um neonato e hemorragia difusa e edema da parede intestinal em dois filhotes portadores de peritonite. Hiperemia difusa discreta na serosa intestinal foi percebida em 19 filhotes. Em três neonatos, dois com nove dias e um com 20 dias de idade, *Toxocara canis* foi encontrado no lúmen intestinal, e, no neonato com 20 dias de idade, havia também *Ancylostoma caninum*. Fezes pastosas ou liquefeitas indicativas de diarreia estavam presentes nos pelos da região perianal (Figura 7F) em 47 neonatos, e um natimorto tinha o mecônio tingido de sangue.

Ao exame microscópico, a lesão mais frequente no sistema digestório foram inclusões observadas na mucosa lingual (34,78%, 56/161), exclusivamente em neonatos a partir de um dia de idade. A lesão se caracterizou pela formação de inclusões basofílicas a anfofílicas, raramente eosinofílicas, nas células epiteliais basais e parabasais, raramente estendendo-se às camadas mais superficiais do epitélio. As inclusões eram circundadas por um halo claro e localizavam-se no interior do núcleo, ou, aparentemente, no citoplasma (Figura 7B), com morfologia sugestiva de infecção viral. Foram mais abundantes no epitélio da região dorso-lateral da língua, porém, em alguns casos, estendiam-se ao longo de toda a superfície da mucosa, inclusive na região ventral.

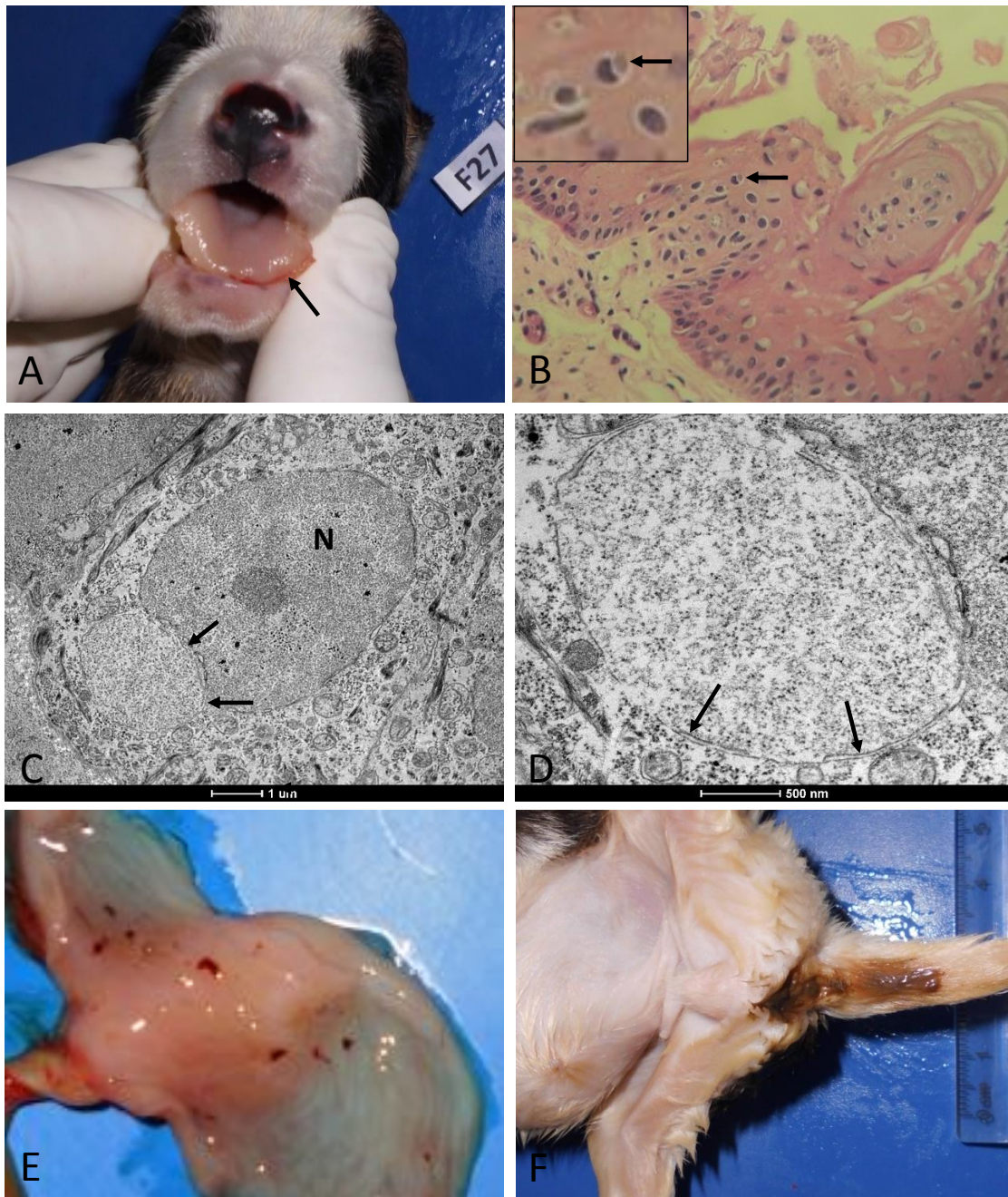


Figura 7. Sistema digestório. A. Neonato com nove dias de idade: borda da língua hemorrágica (seta). B. Neonato com 10 dias de idade, língua, histopatologia: glossite com necrose, hiperqueratose e corpúsculo de inclusão pseudocitoplasmático (seta). H&E (400X). C. Ultraestrutura do epitélio da língua de neonato canino com 10 dias de idade: célula epitelial contendo corpúsculo de inclusão pseudocitoplasmático (setas) adjacente ao núcleo (N). D. Corpúsculo de inclusão contendo numerosas partículas virais, delimitado por membrana dupla (setas), o que evidencia sua origem nuclear. E. Gastrite com necrose e hemorragia multifocal. F. Neonato com nove dias de idade: fezes amolecidas na região perianal, indicativo de diarreia.

As inclusões no epitélio da língua de um neonato, analisadas por microscopia eletrônica, localizavam-se adjacentes ao núcleo, aparentemente no citoplasma, mas eram envoltas por membrana dupla, o que demonstrou sua origem nuclear e as caracterizou como inclusões pseudocitoplasmáticas. Em seu interior, havia numerosas estruturas esféricas eletrodensas com morfologia compatível com partículas virais (Figuras 7C e D).

Em 20 neonatos, glossite ocorreu concomitantemente às inclusões, com necrose do epitélio e inflamação, caracterizada por infiltrado linfocítico e macrofágico discreto a leve em lâmina própria da mucosa, raramente com exocitose leucocitária. Em cinco indivíduos, ocorreu também necrose da musculatura esquelética e/ou lâmina própria subjacente ao epitélio, e, em quatro deles, havia neutrófilos além de linfócitos e macrófagos. Em 14 casos de glossite, não foram detectadas inclusões, embora em irmãos de ninhada de sete destes filhotes as inclusões tenham sido detectadas. Ao todo, glossite foi observada em 34 animais.

Glossite ocorreu em natimortos e neonatos, enquanto as inclusões foram observadas exclusivamente em neonatos com um dia de idade ou mais. Por exemplo, na ninhada 30, foram examinados dois natimortos e dois neonatos, um morto aos dois dias de vida e o outro aos quatro dias de vida. Um dos dois natimortos apresentou glossite com vasculite macrofágica, com linfócitos e raros neutrófilos, além de trombose em vasos linfáticos e vênulas, necrose e regeneração de fibras musculares, porém, sem inclusões no epitélio. Seu irmão de ninhada, morto aos dois dias de vida, apresentou inúmeros corpúsculos intranucleares, necrose do epitélio lingual e inflamação linfocítica e macrofágica discreta. O neonato morto aos quatro dias apresentou raros corpúsculos, e necrose no epitélio da língua multifocal leve.

O estômago de 86 animais foi analisado microscopicamente, devido a autólise no estômago dos outros filhotes. Gastrite foi a lesão mais frequente. Na lâmina própria e submucosa gástrica, havia infiltrado discreto a leve de linfócitos (37,21%; 32/86), macrófagos (30,23%; 26/86), e neutrófilos (23,26%; 20/86) e, menos frequentemente, de eosinófilos (6,98%; 6/86), e hemorragia multifocal discreta a leve em 15 filhotes. Em três natimortos e em um neonato com 11 dias de idade, havia também vasculite linfocítica e macrofágica na parede gástrica.

Gastrite com necrose coagulativa multifocal moderada do epitélio da mucosa (5/9) ou necrose da lâmina própria e/ou túnica muscular (4/9) com hemorragia multifocal discreta foi observada em nove neonatos que morreram com dois a nove dias de idade. Três deles também apresentavam glossite, e em seis havia corpúsculos de inclusão viral na língua.

Os intestinos foram avaliados microscopicamente em 102 animais, devido a autólise nos demais. Eosinófilos na lâmina própria e placas de Peyer foram frequentes (42,16%; 43/102), mas sem que fossem observadas lesões significativas. Necrose de enterócitos da base de vilosidades e do epitélio do domo adjacente a placas de Peyer foi observada em 48 dos 102 animais (47,06%), e necrose de criptas intestinais em quatro deles. Hemorragia multifocal leve na lâmina própria e nas placas de Peyer ocorreu em 15 animais, hemorragia na serosa e túnica muscular em outros dois indivíduos que apresentaram peritonite hemorrágica.

Em um neonato com lesões características e PCR positivo para herpesvírus, havia áreas multifocais de infartos hemorrágicos transmuralis nos intestinos, caracterizado macroscopicamente por equimoses multifocais na serosa intestinal. Hepatite necrosante multifocal a coalescente intensa foi uma lesão que ocorreu exclusivamente neste caso.

No fígado, macroscopicamente, hepatomegalia foi observada em 34,57% (65/188) dos filhotes. Áreas esbranquiçadas multifocais na superfície subcapsular, especialmente na borda dos lobos

hepáticos (7,98%; 15/188), correspondiam, microscopicamente, a áreas extensas de necrose coagulativa associadas à mineralização (5,59%; 9/161) (Figuras 8C e D). Em três animais, com três a cinco dias de idade, estas lesões de necrose encontravam-se delimitadas por células gigantes multinucleadas e fibroplasia, formando granulomas. Nestas lesões, foram detectados antígenos de *Toxocara canis* pela imuno-histoquímica.

Microscopicamente, hematopoese extramedular foi observada em diferentes intensidades em todos os filhotes. Caracterizou-se por megacariócitos (Figura 8A) e pequenos grupos de eritroblastos e promielócitos (Figura 8B), localizados nos espaços de Disse, ao longo dos capilares sinusóides, mais abundantes nos fetos abortados e natimortos, e reduzindo-se ao longo das primeiras semanas de vida. Havia hepatite em 47,20% dos filhotes (76/161). Em 39,75% (64/161), o infiltrado leucocitário inflamatório concentrou-se ao redor de ductos biliares e vasos sanguíneos do espaço porta, em dez animais localizava-se tanto na região portal como no parênquima com distribuição aleatória. Hepatite neutrofílica com formação de microabscessos foi observada em apenas dois animais. Necrose do epitélio biliar (24/64), hiperplasia biliar (47/64) (Figura 8E), exsudato fibrinoso (26/64), necrose fibrinoide da parede vascular (6/64), dilatação de vasos linfáticos (10/64) foram observados em associação a quantidades variáveis de macrófagos (59/64), neutrófilos (54/64), linfócitos (32/64) e eosinófilos (31/64) caracterizando hepatite portal. A localização destas lesões coincide com as áreas onde houve imunodeteção pela imuno-histoquímica de antígenos de *T. canis* em 100% e *B. canis* em 60% de 10 filhotes testados.

Degeneração vacuolar hepática difusa moderada a intensa, com padrão morfológico sugestivo de degeneração hidrópica, associada a hiperemia difusa moderada a intensa, foi observada em 49/161 filhotes, 20 natimortos e 29 neonatos, possivelmente em decorrência de hipóxia (Figura 8F).

5.1.4. Sistema tegumentar

Macroscopicamente, lesões cutâneas foram observadas em 67 animais, e incluíam onfalite (20,21%; 38/188) (Figura 9A), infartos cutâneos em dígitos (6,38%; 12/188) (Figura 9B), dermatite ulcerativa (5,85%; 11/188) (Figura 9C), piodermite pustular (3,19%, 6/188) (Figura 9D), piodermite vesicular (2,13%; 4/188) e infecção de feridas cirúrgicas (1,06%; 2/188).

O cordão umbilical e a pele adjacente foram examinados histopatologicamente em 96 filhotes. Onfalite foi observada com frequência (56,25%; 54/96) e foi caracterizada por exsudato inflamatório macrofágico e neutrofílico, necrose, hemorragia, frequentemente com exsudato fibrinoso, adjacentes à artéria umbilical e ao úraco. Colônias bacterianas com numerosos cocos (25/96) e bacilos (11/96) foram observados nas áreas de necrose e ulceração da epiderme adjacente à inserção do cordão umbilical e na derme. Em um neonato, a onfalite estendeu-se ao úraco e bexiga, com a ocorrência de cistite bacteriana necrótica, e, em dois neonatos, atingiu a cavidade abdominal com peritonite.

Ocorreram dois casos de infecção bacteriana de ferida cirúrgica cutânea, onde foram visualizadas bactérias intralesionais. Em um caso de infecção após caudectomia, havia colônias de cocos bacterianos na pele e no interior do tecido ósseo das vértebras caudais. Em outro neonato, submetido a reparação cirúrgica de onfalocele, foram observados inflamação e inúmeros bacilos na derme e musculatura abdominal adjacentes à sutura associados a peritonite.

Em 17 neonatos, inclusões intranucleares ou citoplasmáticas, idênticas àquelas descritas na língua, sugestivas de infecção viral, foram observadas nos queratinócitos adjacentes a ulcerações da epiderme e dos folículos pilosos da região abdominal, próximos ao cordão umbilical, além de

vulva e prepúcio (Figura 9E). Estes neonatos eram de 11 ninhadas distintas, provenientes de cinco canis, com 1 a 13 dias de idade. Neles e/ou em seus irmãos de ninhada, havia concomitantemente inclusões sugestivas de infecção viral na língua, descritas anteriormente (5.1.3. Sistema digestório). Em um neonato, corpúsculos de inclusão citoplasmáticos foram observados também no epitélio do úraco.

Em oito, dentre os 17 neonatos que tinham os corpúsculos de inclusão intraepiteliais descritos acima, havia dermatite necrótica e/ou ulcerativa multifocal em dígitos, face, e região periumbilical e perigenital (Figura 9F). Eles pertenciam a cinco ninhadas, de quatro canis, com idades entre 1 e 13 dias. As lesões foram caracterizadas microscopicamente por piodermite com pústulas neutrofílicas intraepiteliais, com atrofia da epiderme adjacente, ocasionalmente hiperplasia, paraqueratose, e necrose com ulceração multifocal, frequentemente com infecção bacteriana secundária e numerosos cocos intralesionais.

5.1.5. Sistema linfo-hematopoético

Lesões em órgãos do sistema linfo-hematopoético foram frequentes. Ao exame macroscópico (n = 188), verificou-se que o timo apresentava tamanho menor que o normal (Figura 10A) em 34 filhotes, 19 natimortos e 15 neonatos, não sendo possível distinguir hipoplasia de atrofia nestes casos. Hemorragias multifocais no parênquima tímico (Figura 10B) foram observadas macroscopicamente em nove natimortos e quatro neonatos.

Ao exame microscópico (n = 149), linfólise na região cortical do timo foi frequente (48/149). Na região medular havia hemorragia (45/149) e necrose (20/149) (Figura 10C). Em muitos casos, hipoplasia do córtex tímico (18/149) e, mais raramente, depleção linfoide (3/149) ocorreram associadas a hemorragia e necrose. Infiltrado neutrofílico foi observado no timo de 11 animais.

Esplenomegalia foi documentada em 23 filhotes e linfadenomegalia em 16 filhotes. Hemorragias multifocais no baço foram observadas em seis filhotes. Esplenomegalia intensa ocorreu em um neonato de 15 dias associada a protozoários intravasculares, icterícia, anemia e hemoglobinúria, com evolução aguda e óbito em menos de 48 horas após o início dos sinais clínicos.

Hematopoese extramedular com intensidade variável foi observada em todos os baços analisados (149/149), caracterizada por megacariócitos, células da linhagem eritroide e mielóide. Hipoplasia linfoide (41/149) e depleção linfoide (40/149) ocorreram com grande frequência, acompanhadas por hiperplasia retículo-endotelial em 18 filhotes.

Figura 8. (Página ao lado.) Fígado. A. Neonato, dois dias de idade: hematopoese extramedular: megacariócitos distribuídos pelo parênquima hepático (setas). H&E (400X). B. Hematopoese extramedular: metarrubricitos (setas) e promielócitos (cabeças de seta), localizados nos espaços de Disse. H&E (1000X). C. Neonato, quatro dias de idade, fígado: lesões esbranquiçadas multifocais a coalescentes subcapsulares nas bordas de lobos hepáticos (setas). D. Mesmo animal de C, áreas de necrose e mineralização que correspondem às lesões esbranquiçadas vistas em C. H&E (200X). E. Neonato com dois dias de idade: hepatite portal leve com necrose e hiperplasia do epitélio biliar (setas), associada a infiltrado linfocítico e eosinofílico, com raros macrófagos e hemorragia multifocal discreta. H&E (400X). F. Natimorto: hepatomegalia e leve palidez difusa do fígado, que, na microscopia, correspondeu a degeneração vacuolar associada a hiperemia.

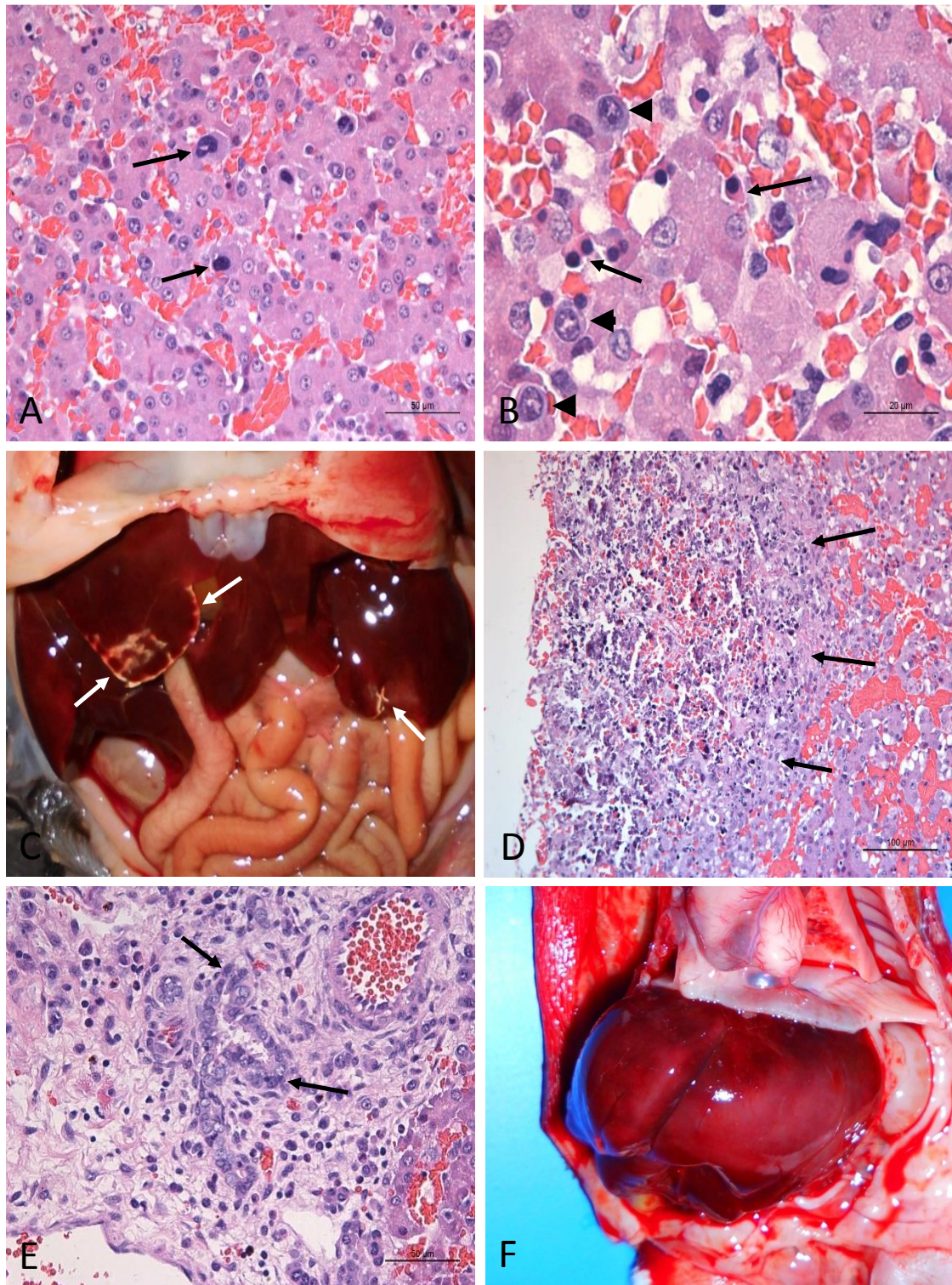


Figura 8. Fígado. Legenda na página anterior.

Linfólise esplênica foi observada em 19 filhotes e, em um deles, acompanhada por necrose de megacariócitos. Necrose multifocal do parênquima e estroma esplênico ocorreu em 20 filhotes, enquanto hemorragia multifocal foi observada microscopicamente em cinco filhotes, e, em um natimorto, esplenite granulomatosa (Figura 10D).

Linfonodos de 127 filhotes foram analisados microscopicamente. Hipoplasia linfoide (38/127), depleção linfoide (23/127) e linfólise (20/127) ocorreram associados a macrófagos com citoplasma amplo e eosinofílico que preenchem os seios medulares (14/127) ou a hiperplasia das células do sistema retículo-endotelial (7/127). Drenagem de hemorragia (37/127), de neutrófilos (35/127) e de eosinófilos (15/127) foram frequentes em seios subcapsulares e medulares, assim como bactérias na forma de cocos (6/127) e bacilos (4/127) em alguns animais, possivelmente oriundos de lesões nos territórios de drenagem dos linfonodos (Figura 11).

5.1.6. Sistema urinário

Ao exame macroscópico, poucas lesões foram visualizadas em rins e bexiga. Hemorragias renais ocorreram em nove neonatos (9/188) como equimoses coalescentes em um filhote positivo para herpesvírus ou na forma de petéquias multifocais (8/9). Outros dois neonatos herpesvírus-positivos na PCR não apresentaram hemorragia renal.

Em um natimorto da raça Dálmata, cristalúria intensa foi observada nos túbulos da medular renal e na bexiga, caracterizada macroscopicamente como estriações radiais douradas na medula e precipitação de aspecto arenoso na urina (Figura 12A). No neonato com anemia hemolítica, descrito no item anterior, havia nefrose pigmentar. Em um neonato da raça Yorkshire, os rins tinham o córtex e a região medular hipoplásicos e a pelve mais ampla que o normal, compatível com displasia renal.

Microscopicamente, a alteração mais frequente nos rins foi a hiperemia (73/147), associada a hemorragia multifocal em córtex, medula e/ou hilo renal em alguns casos (25/147). Outras lesões observadas foram: nefrose (degeneração vacuolar e necrose tubular difusa moderada a intensa) (26/147), fibroplasia medular (15/147), mineralização de túbulos corticais multifocal discreta a leve (14/147), nefrite (6/147), pielonefrite (5/147), e fibrose (5/147). Embolia bacteriana em capilares peritubulares ou em glomérulos foi visualizada em cinco neonatos que morreram entre 16 horas e dois dias após o nascimento, e no interior de túbulos coletores em um neonato de 13 dias.

Em 27 neonatos havia ectasia de túbulos da região cortical e/ou medular, associada a perda de túbulos na junção cortico-medular e graus variados de fibroplasia e fibrose (14/27). Destes, oito filhotes (três natimortos e cinco neonatos entre um e quatro dias), inclusive o Yorkshire com alterações renais macroscópicas, apresentaram ectasia tubular moderada a intensa, rarefação do número de glomérulos (hipoplasia glomerular), perda de túbulos e fibroplasia intersticial, característicos de displasia renal (Figuras 12E e F).

Na bexiga, infiltrado discreto de macrófagos, linfócitos e raros neutrófilos estava presente na lâmina própria da mucosa em nove filhotes (9/152), hemorragia multifocal discreta ocorreu em dez filhotes e em um filhote havia cistite necrótica bacteriana intensa, com cocos bacterianos intralésionais.



Figura 9. Sistema tegumentar. A. Neonato com três dias de idade: onfalite, com eritema ao redor do coto umbilical, e postite ulcerativa. *K. pneumoniae* foi isolada em cultura pura de sangue, pulmão, fígado, baço e rim. B. Neonato com três dias de idade, infarto cutâneo em dígito (seta). *E. coli* foi isolada em cultura pura de sangue, pulmão, fígado, baço e rim. C. Neonato com nove dias de idade: pododermatite ulcerativa (seta), associada a corpúsculos de inclusão sugestivos de infecção viral ao exame microscópico. D. Neonato com seis dias de idade: pústula na pele da região abdominal (seta). E. Neonato ilustrado em C. Pele, aspecto microscópico da lesão observada em C: Inclusões sugestivas de infecção viral em queratinócitos de folículos pilosos adjacentes às áreas de ulceração (setas) H&E (400X). F. Neonato ilustrado em C: dermatite com erosão epitelial no focinho, associada a corpúsculos de inclusão sugestivos de infecção viral na microscopia.

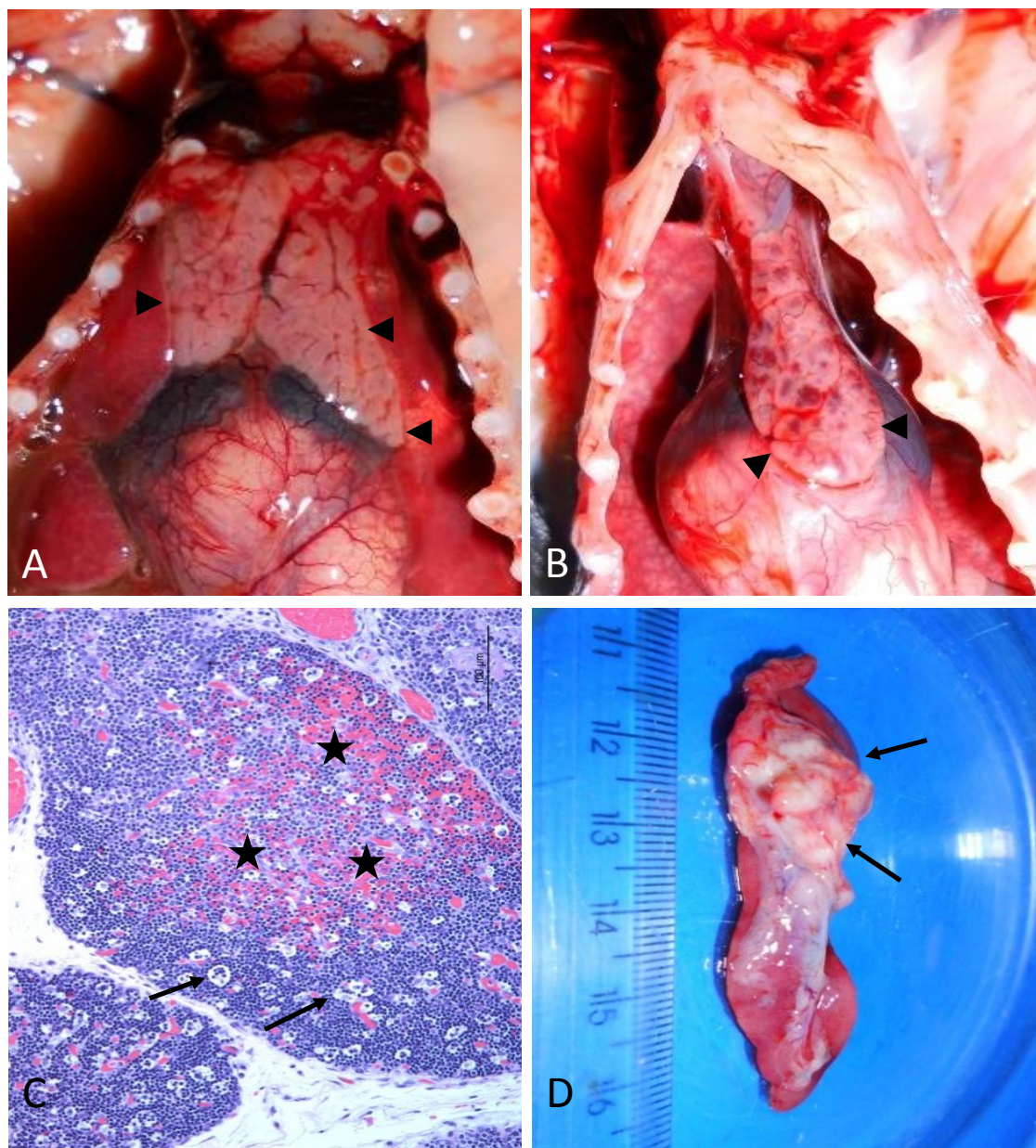


Figura 10. Sistema linfo-hematopoético (timo e baço). A. Neonato com três dias de idade: timo de tamanho normal. Pode-se notar também intensa pericardite. B. Natimorto: timo menor que o normal com hemorragias multifocais. C. Neonato com dois dias de idade, PCR positivo para *Brucella* sp. com isolamento de *E. coli* em cultura pura de todas as amostras. Timo: aspecto microscópico da hemorragia (estrelas) associada a moderada linfólise (setas). H&E (200X). D. Natimorto: baço com múltiplos nódulos brancos coalescentes (setas), diagnosticado como esplenite granulomatosa ao microscópio. *Staphylococcus* sp. foi isolado do baço deste filhote. Este neonato foi positivo na imuno-histoquímica para detecção de antígenos de *Toxocara canis* no fígado.

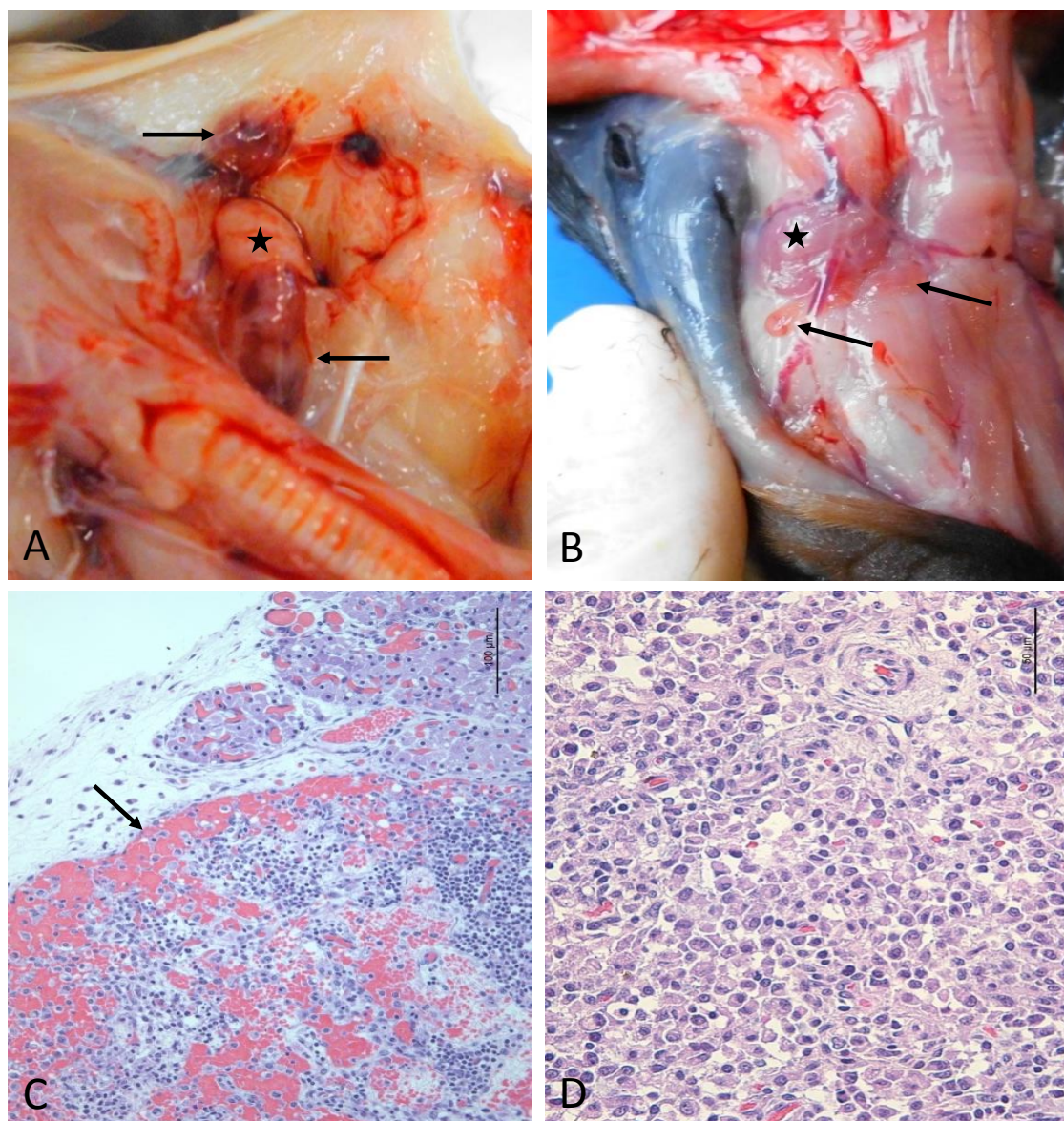


Figura 11. Sistema linfo-hematopoético (linfonodos). A. Neonato com 13 dias de idade, acometido pela forma generalizada da infecção por herpesvírus canino, confirmada pelo resultado positivo na PCR. Linfonodos aumentados de volume e vermelhos devido a drenagem de hemorragia (setas). Glândula salivar (estrela). B. Neonato com dois dias de idade, portador de inclusões sugestivas de infecção viral na língua: linfonodos hipoplásicos (setas). Glândula salivar (estrela). C. Neonato com dois dias de idade, PCR positivo para *Brucella* sp. com isolamento de *E. coli* em cultura pura de sangue, pulmão, fígado, baço e rim (mesmo filhote ilustrado em 10C): hipoplasia linfoide e drenagem de hemorragia no linfonodo adjacente ao timo, o qual encontrava-se com hemorragia e linfólise. H&E (200X). D. Neonato com dois dias de idade, o mesmo ilustrado em 10C e 11C: linfonodo submandibular com depleção linfoide e preenchimento dos seios linfáticos por macrófagos com citoplasma eosinofílico abundante. H&E, (400X).

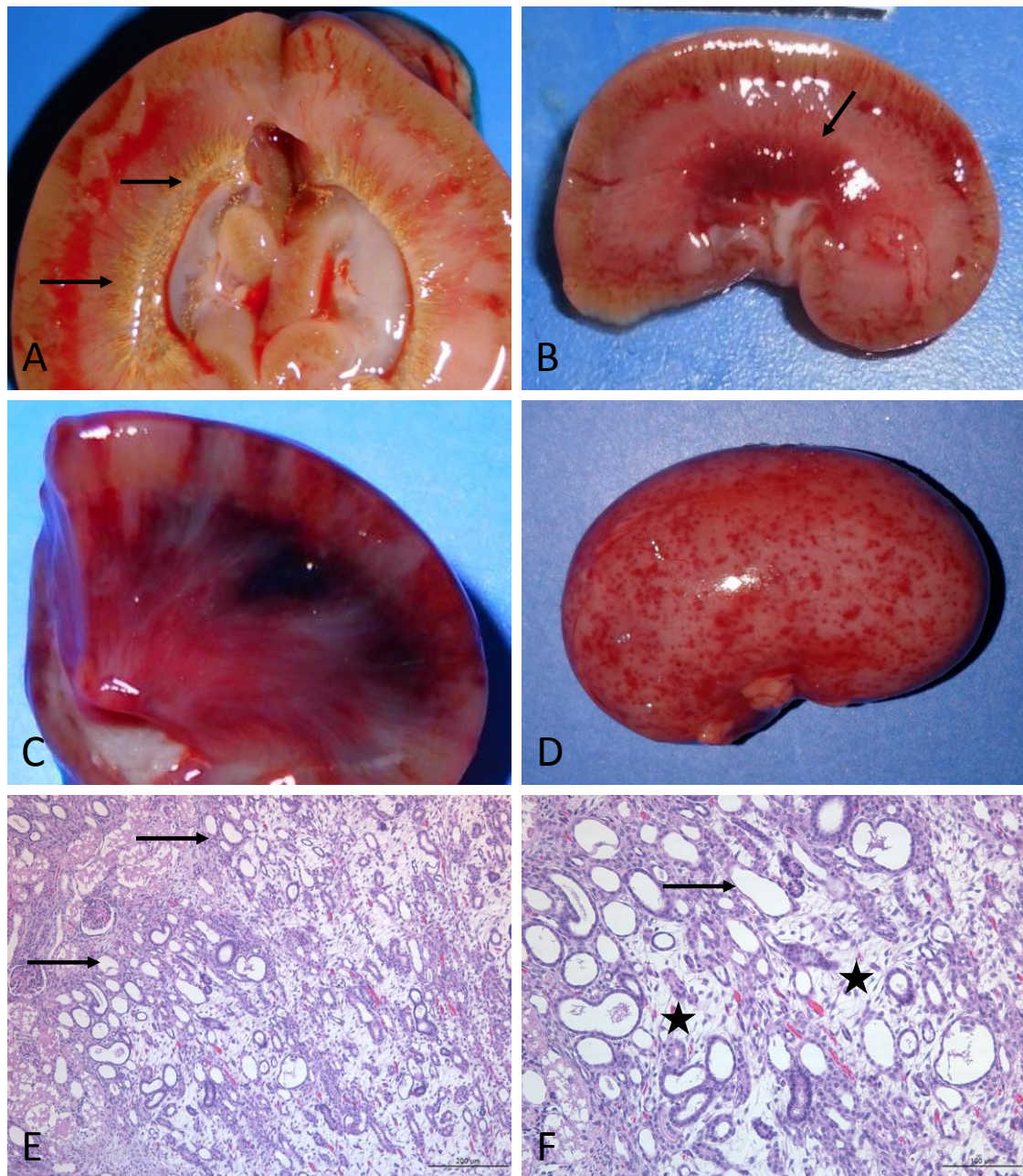


Figura 12. Rins. A. Natimorto, Dálmata: cristais dourados em túbulos renais (setas). B. Neonato com nove dias de idade: hemorragia em medula renal (seta). Neonato portador de corpúsculos de inclusão em língua e pele, do qual foram isolados quatro gêneros bacterianos: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus* sp. e *E. cloacae*. C. Neonato com 13 dias de idade, acometido pela forma generalizada de herpesvirose neonatal: infartos hemorrágicos multifocais em córtex e medula renais. D. Neonato com três dias de idade, *Brucella*-positivo em PCR: petéquias multifocais a coalescentes em rim. E e F. Neonato com 2 dias de idade, rim: aspecto microscópico de um caso de displasia renal moderada, com ectasia tubular multifocal (setas) e fibroplasia multifocal a coalescente (estrelas) associadas a perda de túbulos, mais acentuada na região medular. H&E (E:200X; F:400X).

5.1.7. Sistema reprodutor

Nos órgãos do sistema reprodutor, alterações macroscópicas foram raras e discretas. Postite (1/188) ulcerativa (Figura 9A) e vulvite (2/188) ocorreram em três neonatos. Hemorragia difusa intensa no plexo pampiniforme foi observada em um outro neonato.

Avaliação histopatológica foi realizada em órgãos do sistema reprodutor de 74 filhotes, 48 machos e 26 fêmeas. Alterações inflamatórias ocorreram com predomínio de infiltrado neutrofílico e macrófagico, geralmente discreto. Epididimite (7/48) caracterizou-se por infiltrado de macrófagos, neutrófilos e linfócitos discreto ao redor do túbulo epididimário. Em dois animais, havia exsudato fibrinoso intratubular focal e necrose segmentar epitelial. Orquite (5/48), ooforite (2/25) foram também observadas, caracterizadas por raros neutrófilos ou linfócitos dispersos de forma multifocal no estroma gonadal. Prostatite foi observada em nove neonatos, com infiltrado leucocitário com linfócitos, macrófagos e neutrófilos, que variou de discreto a moderado entre os animais, em um deles com necrose dos ninhos de células epiteliais.

Em nove neonatos, inclusões intranucleares e citoplasmáticas sugestivas de infecção viral foram visualizadas na pele e mucosa da vulva (3) e do prepúcio (6), associadas a necrose de queratinócitos multifocal discreta e infiltrado de raros linfócitos e neutrófilos na derme adjacente.

Em dois neonatos, havia exocitose neutrofílica difusa leve na mucosa peniana e prepucial, com acúmulo de neutrófilos na cavidade prepucial e formação de pústula intraepitelial em um deles, caracterizando balanopostite neutrofílica. Corpúsculos de inclusão sugestivos de infecção viral foram observados na mucosa prepucial de um animal.

Em uma fêmea de dois dias de idade, havia vulvite com exocitose neutrofílica e formação de pústulas intraepiteliais, associadas a corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos grandes no epitélio da mucosa vulvar, morfologicamente sugestivos de infecção por herpesvírus canino, distintos daqueles corpúsculos descritos anteriormente na língua, na pele e na mucosa genital (Figura 13).

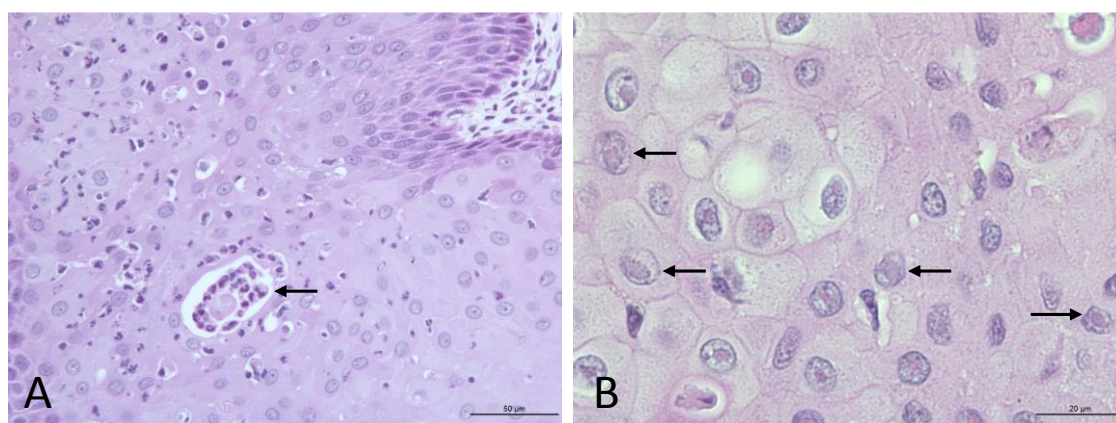


Figura 13. Sistema reprodutor. Neonato fêmea, dois dias de idade, portadora de displasia renal, ilustrada nas figuras 12E e F. Vulva. A. Exocitose neutrofílica e pústula intraepitelial (seta). B. Inclusões intranucleares grandes e eosinofílicas no epitélio da mucosa vulvar (setas). Este filhote apresentou inclusões intracelulares na língua e PCR negativo para detecção de herpesvírus de amostras de rim, pulmão, fígado, baço e miocárdio.

5.1.8. Sistema nervoso

A avaliação macro e microscópica do sistema nervoso foi prejudicada em um grande número de animais devido a consistência gelatinosa do encéfalo mesmo nos filhotes frescos. Com a autólise, mesmo leve, o encéfalo apresentava-se liquefeito. Foram avaliados macroscopicamente 28 encéfalos. Hiperemia difusa intensa nas leptomeninges foi observada em 12 animais. Hemorragia em leptomeninges e na dura-máter ocorreu em nove animais. Achatamento dos giros associado a edema cerebral foi verificado em três animais.

O processamento histológico de rotina foi muito prejudicado devido a consistência friável dos encéfalos, a despeito de variações nos tempos de fixação e desidratação. Microscopicamente, foram analisados 15 animais, e verificadas alterações inflamatórias discretas caracterizadas como meningite (4/15), periventriculite neutrofílica (1/15), encefalite neutrofílica (1/15), coroidite fibrinosa associada a meningite (2/15), além de hiperemia moderada (3/15) e hemorragia cerebelar multifocal discreta (2/15).

Observou-se marcante variação no desenvolvimento dos giros do córtex cerebral entre os filhotes examinados. O subdesenvolvimento dos giros cerebrais foi intenso nos filhotes nascidos de cesariana eletiva. Apesar de não haver informação precisa sobre a idade gestacional, neonatos com fenótipo de prematuros, com pelos subdesenvolvidos nas extremidades, apresentaram giros cerebrais menos desenvolvidos do que natimortos de ninhadas nascidas a termo (Figura 14). A consistência friável ou gelatinosa do encéfalo era mais intensa naqueles com os giros cerebrais menos desenvolvidos.

Ganglioneurite periférica foi observada em quatro animais, três deles no nodo sino-atrial, com infiltrado predominantemente linfocitário, e um deles em um gânglio adjacente à bexiga, com infiltrado neutrofílico e linfocítico.

5.1.9. Sistema músculo-esquelético

Nas raças condrodíplásicas e braquicefálicas (Buldogue, Pug, Shitzu) verificou-se alteração da proporção entre cavidade torácica e cavidade abdominal, quando comparadas às raças que apresentam desenvolvimento esquelético proporcional normal (Doberman, Pinscher, Rottweiler, Whippet, dentre outras), com menor volume e profundidade do tórax associado a marcante redução do recesso diafragmático (Figura 15A e B).

Dentre as malformações ósseas, a mais comum foi a palatosquise, com nove casos em filhotes de sete raças distintas, sendo quatro deles buldogues franceses.

Dois casos de *pectus excavatum* ocorreram em neonatos da raça Buldogue Francês, e caracterizaram-se por depressão do esterno e achatamento ventro-dorsal da parede torácica (Figura 15E), associado a comprometimento cardio-circulatório com dilatação de átrios e ventrículo direito e congestão venosa.

Falha no desenvolvimento do diafragma foi observada em dois animais. Em um deles, um neonato de quatro dias, ocorreu o deslocamento de alças intestinais do abdômen para a cavidade pleural, caracterizando hérnia diafragmática congênita (Figura 15F). Em um natimorto, a falha no diafragma comunicava a cavidade abdominal diretamente com o saco pericárdico, com o deslocamento do fígado que comprimia o coração, caracterizando uma hérnia peritônio-pericárdica. Hipotrofia muscular (sarcopenia) foi observada em 38 filhotes, sendo 15 deles natimortos (Figura 15A).

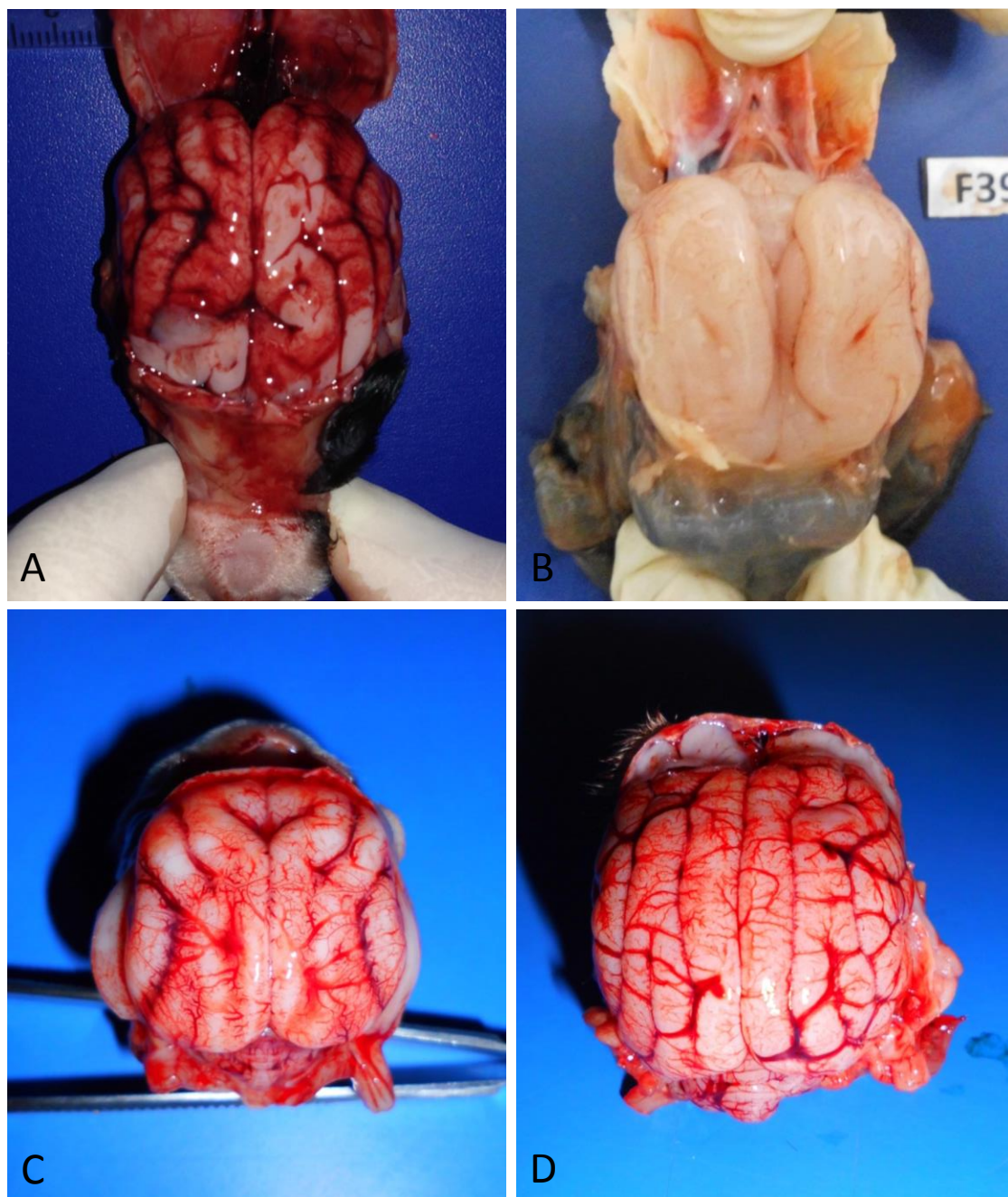


Figura 14. Sistema Nervoso. A. Natimorto, *Brucella*-positivo, ninhada a termo: giros cerebrais desenvolvidos. Hiperemia intensa e hemorragia de meninge. B. Neonato, com quatro dias de idade, ninhada prematura, nascido em cesariana de emergência devido a morte de cinco fetos e sepse da cadela: ausência de giros cerebrais. C. Neonato, morto três horas após a cesariana: giros cerebrais hipoplásicos em relação ao observado em A. D. Neonato, morto 11 dias após a cesariana: notam-se giros cerebrais mais desenvolvidos do que em A.

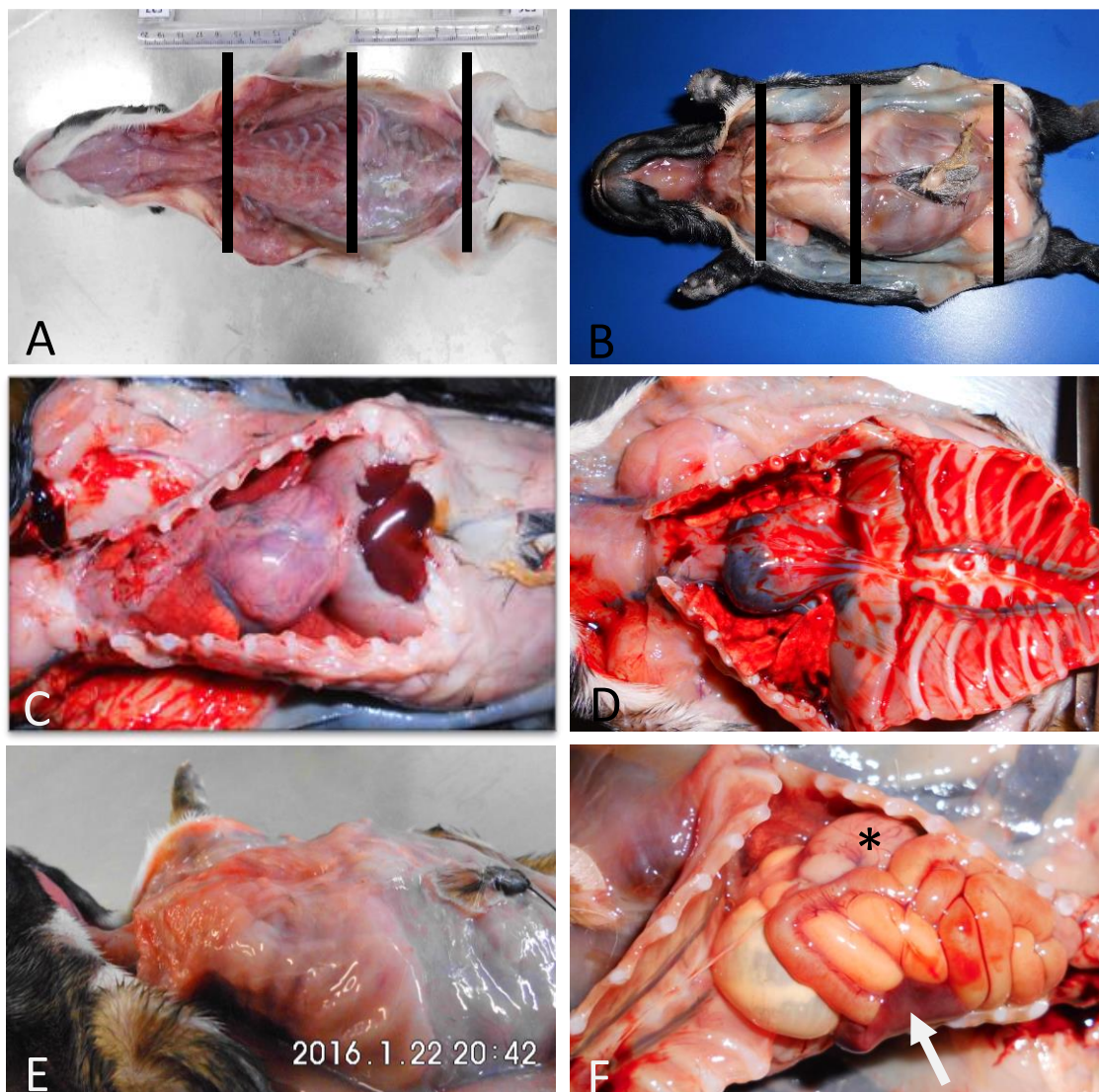


Figura 15. Sistema músculo-esquelético. A. Natimorto da raça Whippet. Tórax longo e profundo com costelas bem arqueadas. B. Natimorto da raça Buldogue Francês. Tórax curto e achatado ventro-dorsalmente. Em A e B as barras transversais delimitam as cavidades torácica e abdominal. C e D. Aspecto da cavidade torácica e do recesso diafragmático em um neonato da raça Rottweiler (C) e em um neonato da raça Buldogue Francês (D), com zero e dois dias de idade respectivamente. E. Neonato da raça Buldogue Francês com *pectus excavatum*, dois dias de idade. Há uma depressão na porção média-caudal do esterno com acentuado achatamento ventro-dorsal do tórax. F. Neonato com hérnia diafragmática congênita, quatro dias de idade. Alças intestinais e baço (seta) no interior da cavidade torácica, deslocam o coração (estrela) para o hemisfério torácico direito. Havia hipoplasia pulmonar intensa neste neonato.

5.2. Isolamento e identificação bacteriana

Do total de 849 amostras cultivadas, foram obtidos 1128 isolados bacterianos de 174 filhotes. Não houve crescimento bacteriano em 181 amostras, e todas as amostras de 19 filhotes foram negativas. Com base no aspecto macroscópico das colônias isoladas (Figura 16) e morfologia na coloração de Gram, os 1128 isolados foram classificados como: 471 cocos Gram-positivos, 324 cocobacilos Gram-negativos, 253 bacilos Gram-negativos, 34 bacilos Gram-positivos, 27 cocos Gram-negativos e 19 cocobacilos Gram-positivos. As provas bioquímicas empregadas não permitiram a identificação de quatro isolados de bacilos Gram-positivo, quatro cocobacilos Gram-negativo, três bacilos Gram-negativos, dois cocos Gram-negativo e dois cocobacilos Gram-positivo.

Os métodos microbiológicos empregados permitiam a identificação de *Staphylococcus* sp. em 109 filhotes, *Escherichia coli* em 63 filhotes, *Klebsiella pneumoniae* em 31 filhotes, *Enterococcus* sp. em 17 filhotes, *Bacillus* sp. em 11 filhotes, *Proteus mirabilis* em 10 filhotes, *Streptococcus* sp. em nove filhotes, *Enterobacter cloacae* em seis filhotes, *Pseudomonas* sp. em seis filhotes, *Micrococcus* sp. em quatro filhotes, *Acinetobacter baumannii* em dois filhotes, *Kluyvera ascorbata* em um filhote (Tabela 5). Dentre os filhotes com resultados positivos no isolamento bacteriano, de 58 foi isolado apenas um gênero bacteriano, de 74 foram isolados dois gêneros bacterianos, de 18 foram isolados três gêneros bacterianos e de cinco animais foram isolados quatro gêneros bacterianos.

Tabela 5. Bactérias isoladas e identificadas em amostras de fetos e neonatos caninos.

Bactérias identificadas	Número de filhotes portadores
<i>Staphylococcus</i> sp.	109
<i>Escherichia coli</i>	63
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .	31
<i>Enterococcus</i> sp.	17
<i>Bacillus</i> sp.	11
<i>Proteus mirabilis</i>	10
<i>Streptococcus</i> sp.	9
<i>Enterobacter cloacae</i>	6
<i>Pseudomonas</i> sp.	6
<i>Micrococcus</i> sp.	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1

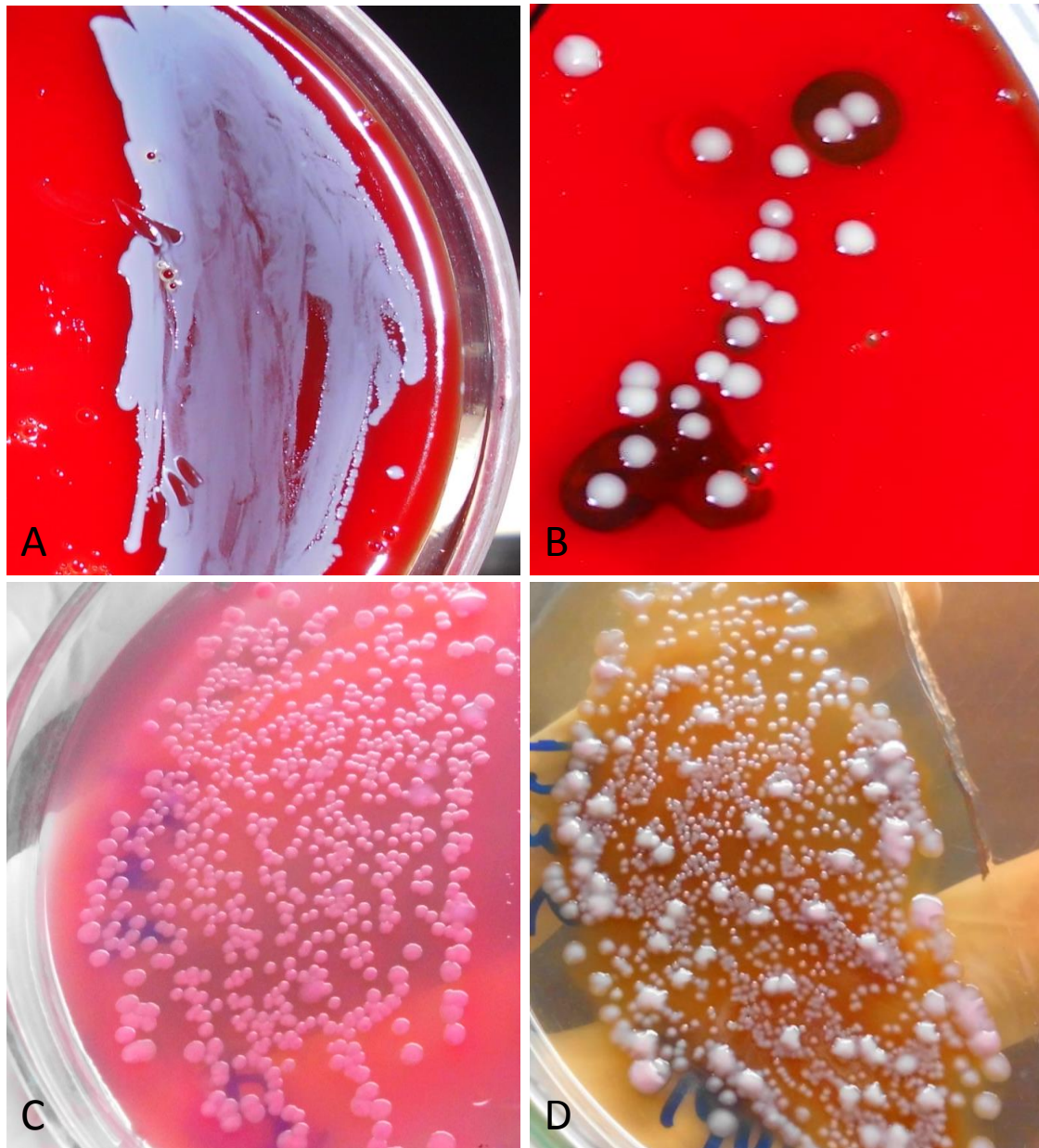


Figura 16. Morfologia de colônias bacterianas representativas dos gêneros mais frequentes neste estudo. A. *Staphylococcus* sp. isolado em cultura pura do baço de um feto abortado. Ágar sangue. B. *Enterococcus* β -hemolítico isolado em cultura pura do rim de um neonato de 13 dias. Ágar sangue. C. *Escherichia coli* isolada em cultura pura do pulmão de um neonato de quatro dias com pneumonia. MacConkey. D. Cultura mista de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* isolados do sangue cardíaco de um neonato com enterite e pneumonia por aspiração.

5.3. Análises moleculares

5.3.1. Controle interno – Actina- β

Amostras dos 203 neonatos foram submetidas à reação de PCR para detecção do gene canino da actina- β com o objetivo de avaliar a integridade do DNA da amostra, sendo 200 amostras positivas e três amostras negativas, as quais foram excluídas das demais reações de PCR.

5.3.2. *Brucella*

Brucella sp. foi detectada por PCR em mistura de DNA de órgãos de 42 filhotes dentre 200 filhotes testados (21,0%), provenientes de 31 das 89 ninhadas (Tabela 6). Dos 32 canis amostrados, 16 (50%) apresentaram pelo menos um filhote positivo. Os filhotes oriundos de ninhadas positivas totalizaram 95 dos 203 filhotes coletados.

A brucelose em fetos e neonatos caninos ocorreu em filhotes de todas as categorias de idade. Dentre os 42 filhotes positivos, dois eram fetos abortados, doze eram natimortos, 16 tinham até dois dias de idade, oito tinham entre três e sete dias, dois tinham entre 8 e 14 dias, 1 tinha 20 dias e um neonato positivo não teve a idade informada (Figura 17).

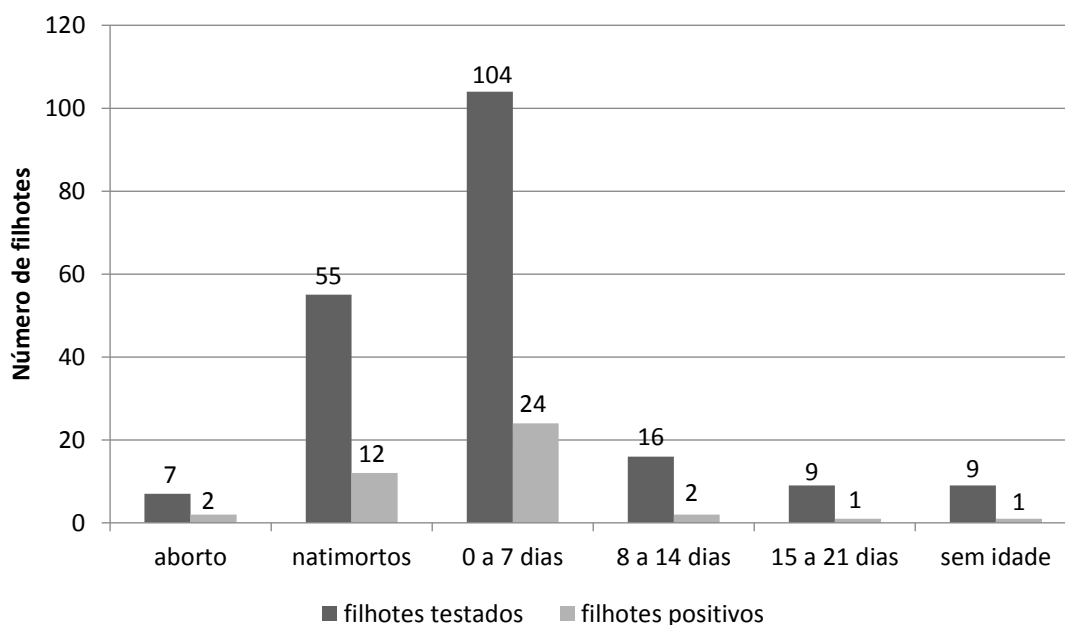


Figura 17. Número de filhotes positivos na PCR para *Brucella* spp. distribuídos de acordo com a idade, totalizando 200 filhotes.

Tabela 6. Número de filhotes e ninhadas positivos para *Brucella* spp. pela PCR, separados em seus respectivos canis, em ordem decrescente de número de filhotes testados.

Canil	Filhotes testados	Filhotes positivos	% de positividade	Ninhadas testadas	Ninhadas positivas	% de positividade
1	50	14	28,0	19	10	52,6
2	25	6	24,0	16	5	31,3
3	23	3	13,0	7	3	42,9
4	15	2	13,3	4	1	25,0
5	12	2	16,7	1	1	100,0
6	6	0	0,0	2	0	0,0
7	6	0	0,0	3	0	0,0
8	6	2	33,3	1	1	100,0
9	5	0	0,0	4	0	0,0
10	5	3	60,0	1	1	100,0
11	5	1	20,0	1	1	100,0
12	4	2	50,0	3	1	33,3
13	4	0	0,0	2	0	0,0
14	3	0	0,0	3	0	0,0
15	3	1	33,3	2	1	50,0
16	3	1	33,3	1	1	100,0
17	3	0	0,0	1	0	0,0
18	2	1	50,0	2	1	50,0
19	2	1	50,0	2	1	50,0
20	2	0	0,0	1	0	0,0
21	2	1	50,0	2	1	50,0
22	2	0	0,0	2	0	0,0
23	2	1	50,0	1	1	100,0
24	2	1	50,0	1	1	100,0
25	1	0	0,0	1	0	0,0
26	1	0	0,0	1	0	0,0
27	1	0	0,0	1	0	0,0
28	1	0	0,0	1	0	0,0
29	1	0	0,0	1	0	0,0
30	1	0	0,0	1	0	0,0
31	1	0	0,0	1	0	0,0
32	1	0	0,0	1	0	0,0
Total	200	42	21,0	89	31	34,8

O sequenciamento dos produtos de PCR para *Brucella* spp. de três filhotes positivos, provenientes de três canis diferentes, evidenciou 100% de identidade com *Brucella* sp. (número de acesso no GenBank: M20404.1).

5.3.3. Herpesvírus canino

Três filhotes (3/200; 1,5%) foram positivos na PCR de mistura de órgãos para herpesvírus canino. Os filhotes positivos eram de três canis diferentes, localizados em Guarapari, Vila Velha e Vitória. Os filhotes herpes-positivo morreram aos dois, nove e 14 dias de idade.

5.3.4. Parvovírus canino

Os 200 filhotes testados foram negativos. O controle positivo evidenciou banda positiva em todas as reações.

5.3.5. *Bocaparvovirus*

Os 200 filhotes testados foram negativos. O controle positivo evidenciou banda positiva em todas as reações.

5.3.6. *Leishmania infantum*

Três filhotes (3/200; 1,5%) foram positivos na PCR de mistura de órgãos para *L. infantum*: um neonato morto com dois dias de idade e seu irmão de ninhada morto com 18 dias de idade, de um canil da região serrana, e um natimorto, proveniente de um canil de Vila Velha.

5.3.7. PCR-RFLP e sequenciamento para identificação de Piropasmas

As amostras de fígado, baço, pulmão, rim, coração, e mistura de DNA destes órgãos, do filhote diagnosticado com anemia hemolítica, apresentaram resultado positivo para *Babesia canis vogeli* na reação de PCR-RFLP (Figuras 18 e 19). A amostra extraída do coração do filhote suspeito apresentou baixa concentração de DNA e, conseqüentemente, baixa concentração do produto da reação para ordem Piropasmida, o que resultou em negatividade após a reação com as enzimas de restrição. No sequenciamento, o produto da PCR deste filhote com os iniciadores Bab 33-57 e Bab 432-409 (número de acesso KX505280.1) apresentou identidade de 99% com *Babesia canis vogeli* (números de acesso no GenBank: AY371196.1; DQ297390.1; AB0833374.1).

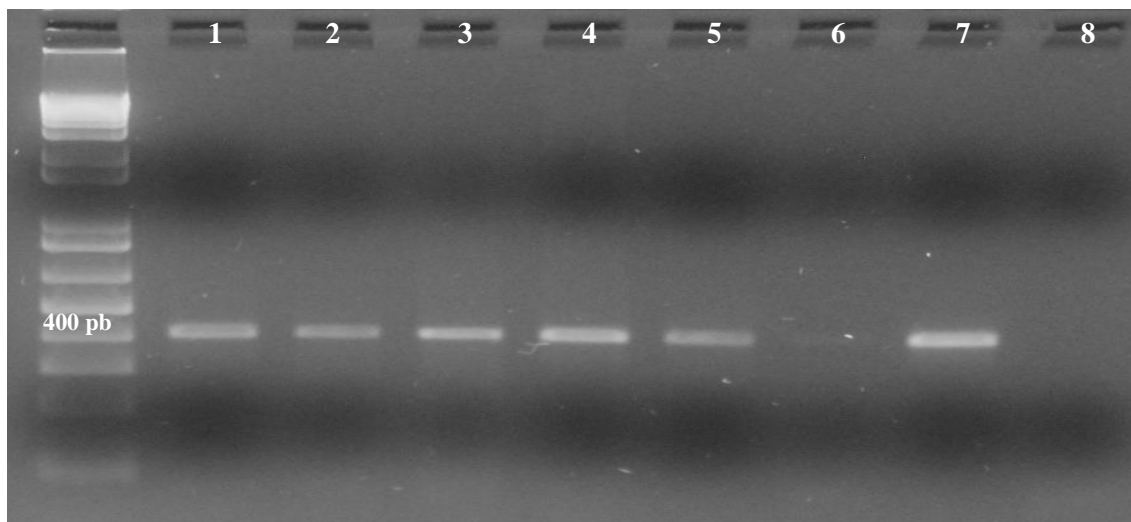


Figura 18. Resultado da PCR para organismos da ordem Piroplasmida com os iniciadores PIRO A e PIRO B, em gel de agarose 1,5% corado por SYBR®Safe DNA Gel Stain. Produtos com 407 pb, característicos de *Babesia canis*. Amostras: mistura de DNA (1), fígado (2), baço (3), pulmão (4), rim (5), coração (6) do filhote suspeito. Controle positivo: amostra clínica de *Babesia canis* (7), controle negativo (8).

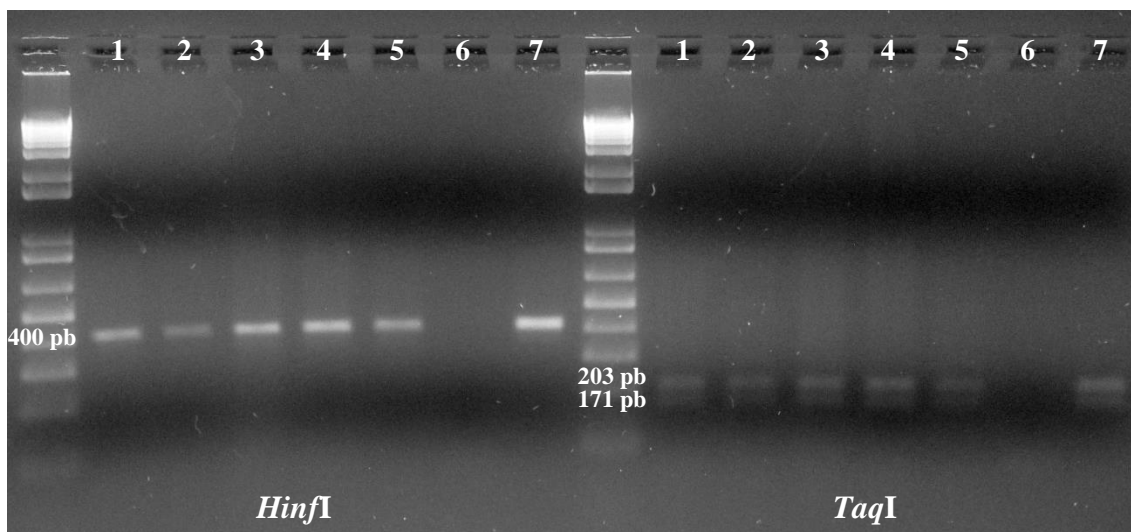


Figura 19. Análise dos produtos da digestão pelas enzimas *HinfI* e *TaqI*, em gel de agarose 1,5% corado por SYBR®Safe DNA Gel Stain. Produtos da digestão com as enzimas *HinfI* e *TaqI*, com 400 pb e 203pb/171pb, respectivamente, característicos de *Babesia canis vogeli*. Mistura de DNA (1), fígado (2), baço (3), pulmão (4), rim (5), coração - amostra negativa (6). Controle positivo: amostra clínica de *Babesia canis* (7).

5.4. Imuno-histoquímica

5.4.1. Detecção de *Brucella* spp.

Dez filhotes PCR positivos para *Brucella*, de diferentes idades, foram submetidos à reação imuno-histoquímica para descrição da distribuição de *Brucella* spp. em diferentes tecidos e sua correlação com as lesões. Todos os filhotes testados apresentaram imuno-marcação positiva. Estruturas cocobacilares com morfologia e tamanho característicos de *Brucella* sp. foram observados marcados no citoplasma de macrófagos e outros tipos celulares em todos os órgãos testados, com frequência variável entre os filhotes (Tabela 7).

Estômago, intestino delgado e intestino grosso apresentaram alta frequência de marcação. Macrófagos com estruturas cocobacilares intracitoplasmáticas foram observados na lâmina própria, submucosa e túnica muscular do estômago e intestinos de todos os filhotes testados (Figura 20A), além do ligamento gastroesplênico e mesentério (10/10). O conteúdo intestinal intraluminal dos natimortos apresentou marcação moderada (++, 4/5).

Macrófagos marcados foram também detectados em pulmão (8/10) (Figura 20B), baço (7/10), fígado (6/10), rim (4/10), cordão umbilical (7/8), coração (4/10) e órgãos do aparelho reprodutor (6/10), especialmente na túnica albugínea dos testículos, adjacente a vasos sanguíneos do plexo pampiniforme (Figura 20C), no miométrio e ligamento largo do útero. Nestes tecidos, macrófagos infectados foram frequentes em meio às células musculares lisas de artérias (pulmonares, coronárias, umbilicais, hepáticas). Eritrócitos com marcação positiva foram observados também de forma disseminada em todos os tecidos analisados (10/10).

Tabela 7. Positividade pela imuno-histoquímica para *Brucella* spp. em tecidos de filhotes de diferentes idades.

Idade do filhote	TGI	Coração	Pulmão	Baço	Fígado	Rim	Genital	Cordão umbilical	SNC	Olho
Natimorto	+++	++	++	+	+++	+	+	+++	NR	NR
Natimorto	++	++	+++	+	+	+	-	+++	NR	NR
Natimorto	++	+++	-	+++	-	++	-	+	++	NR
Natimorto	+	+++	+	-	+	+++	++	+++	NR	++
Natimorto	++	+	+++	+	-	+	-	++	NR	NR
1 dia	++	-	++	++	+	+	+	+++	NR	NR
2 dias	+++	+	++	-	-	-	++	-	++	-
3 dias	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++
10 dias	++	-	++	+	-	++	-	NR	NR	NR
13 dias	++	-	-	-	+	-	++	NR	NR	NR
Positivos	10	6	8	7	6	8	4	7	3	2

TGI: Trato gastrointestinal; NR: não realizado. + = uma marcação positiva a cada 5 campos ou menos; ++ = uma marcação positiva a cada dois campos; +++ = mais de uma marcação positiva em mais de 10 campos de 100x.

Adicionalmente, estruturas cocobacilares marcadas positivamente pela imuno-histoquímica foram observadas intracitoplasmáticas em células musculares lisas de artérias umbilicais (Figura 20D), pulmonares e coronárias. O infiltrado macrófagico e neutrofílico na parede destas artérias, quando presente, era discreto, constituído por células ocasionais e isoladas. Cocobacilos foram marcados também intracitoplasmáticos em cardiomiócitos (6/10), especialmente no miocárdio atrial.

No cordão umbilical, além de cocobacilos marcados em macrófagos dérmicos (++, 7/8), foi frequente a imunodeteção de organismos cocobacilares no extrato córneo (5/8) (Figura 20E) e, menos frequente, em glândulas sudoríparas adjacentes (2/8).

Em cinco filhotes, três natimortos e dois neonatos, cocobacilos marcados foram detectados no citoplasma de células epiteliais de túbulos renais (túbulos contorcidos, coletores e alça de Henle) (Figura 20F), e em um deles também no epitélio glomerular, sempre na ausência de reação inflamatória.

Ocasionalmente, estruturas cocobacilares marcadas ocorreram no citoplasma de adipócitos, especialmente no tecido adiposo mesentérico (+ a +++, 4/10), perirrenal (++, 2/10) e subcutâneo (+, 1/10).

No sistema nervoso central, marcação positiva foi observada nas células epiteliais do plexo coroide (++ a +++, 3/3), epêndima (+ a ++, 2/3) e em macrófagos da meninge (+, 1/3). O globo ocular apresentou marcação discreta em córnea e retina (+, 1/3), enquanto nas pálpebras foram observados numerosos macrófagos marcados (++, 2/3).

5.4.2. Detecção de *Toxocara canis*

Cortes histológicos de fígado e pulmão de 10 filhotes foram selecionados para detecção de antígenos de *T. canis* e sua correlação com lesões. Foram selecionados tecidos bem preservados (sem autólise), de cinco filhotes portadores de necrose e/ou granulomas hepáticos e de cinco filhotes que não apresentavam a lesão. Em todos os 10 filhotes testados evidenciou-se marcação para antígenos de *T. canis* nos tecidos.

No fígado, os antígenos de *T. canis* foram marcados com intensidade variável e distribuição multifocal ao redor de ductos biliares (7/10) e perivascular (3/10) em vasos sanguíneos do espaço porta e veia centrolobular. Imunomarcação foi também observada em áreas de necrose presentes na borda dos lobos hepáticos (2/3), no interior e ao redor de granulomas presentes no fígado (3/3), demonstrando a associação de *T. canis* com estas áreas de lesão.

Nos pulmões, imunomarcação foi observada com localização peribronquial (6/10), perivascular (5/10), na túnica íntima arterial (1/10) e no lúmen alveolar (1/10) (Figura 21).

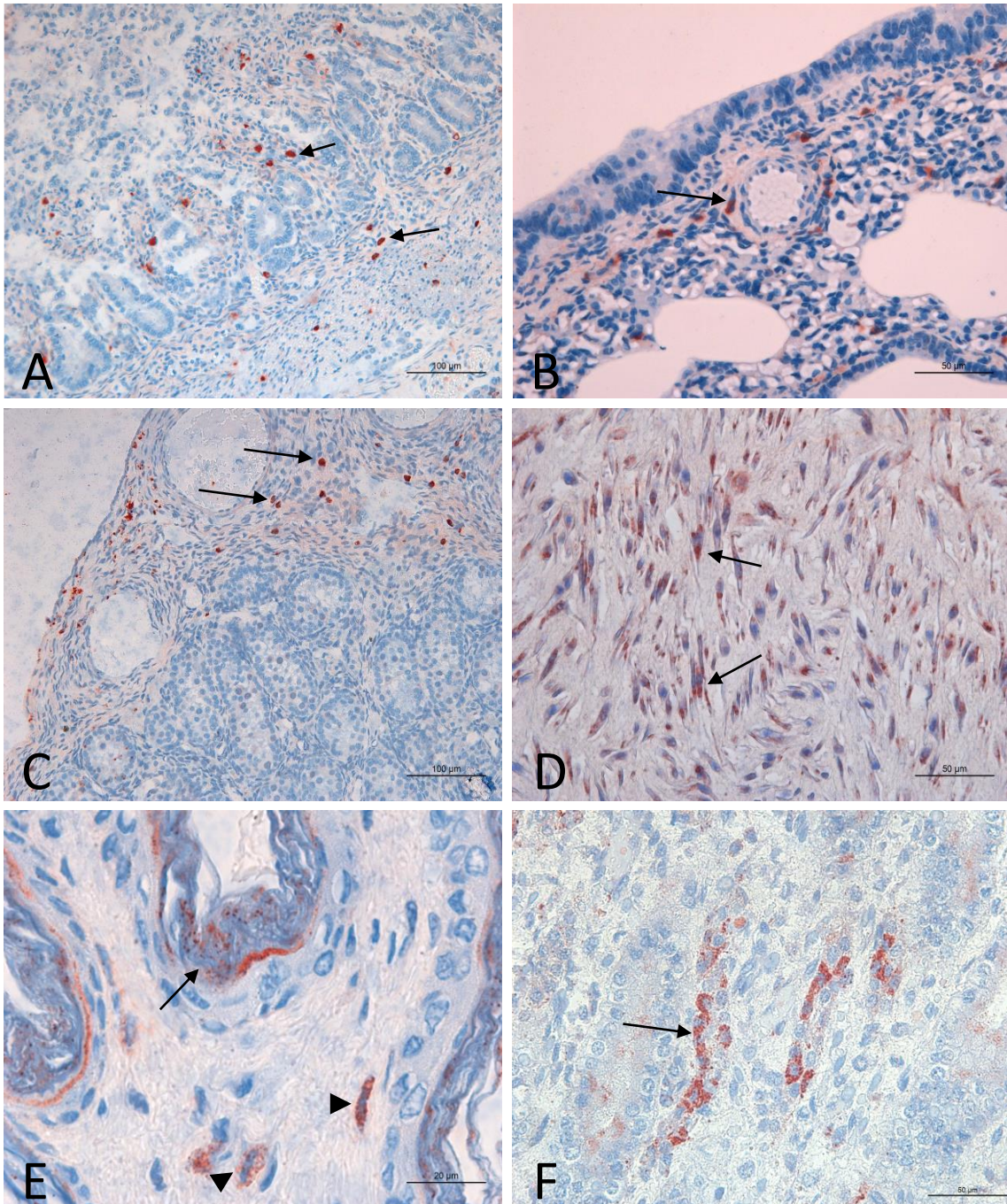


Figura 20. Imuno-histoquímica para detecção de *Brucella* spp. A. Intestino delgado, natimorto: macrófagos positivos em lâmina própria e túnica muscular (setas) (200X). B. Pulmão, neonato, 10 dias de idade: macrófagos positivos no tecido conjuntivo periarterial e peribronquiolar (seta) (400X). C. Testículo, neonato, 13 dias de idade: macrófagos positivos perivascularmente (setas) (200X). D. Artéria umbilical, natimorto: cocobacilos intracitoplasmáticos na túnica muscular arterial (setas) (400X). E. Pele adjacente ao cordão umbilical, natimorto: cocobacilos marcados na epiderme (seta) e no interior de macrófagos na derme (cabeças de seta) (1000X). F. Rim, natimorto: cocobacilos marcados intracitoplasmáticos no epitélio tubular (seta) (400X).

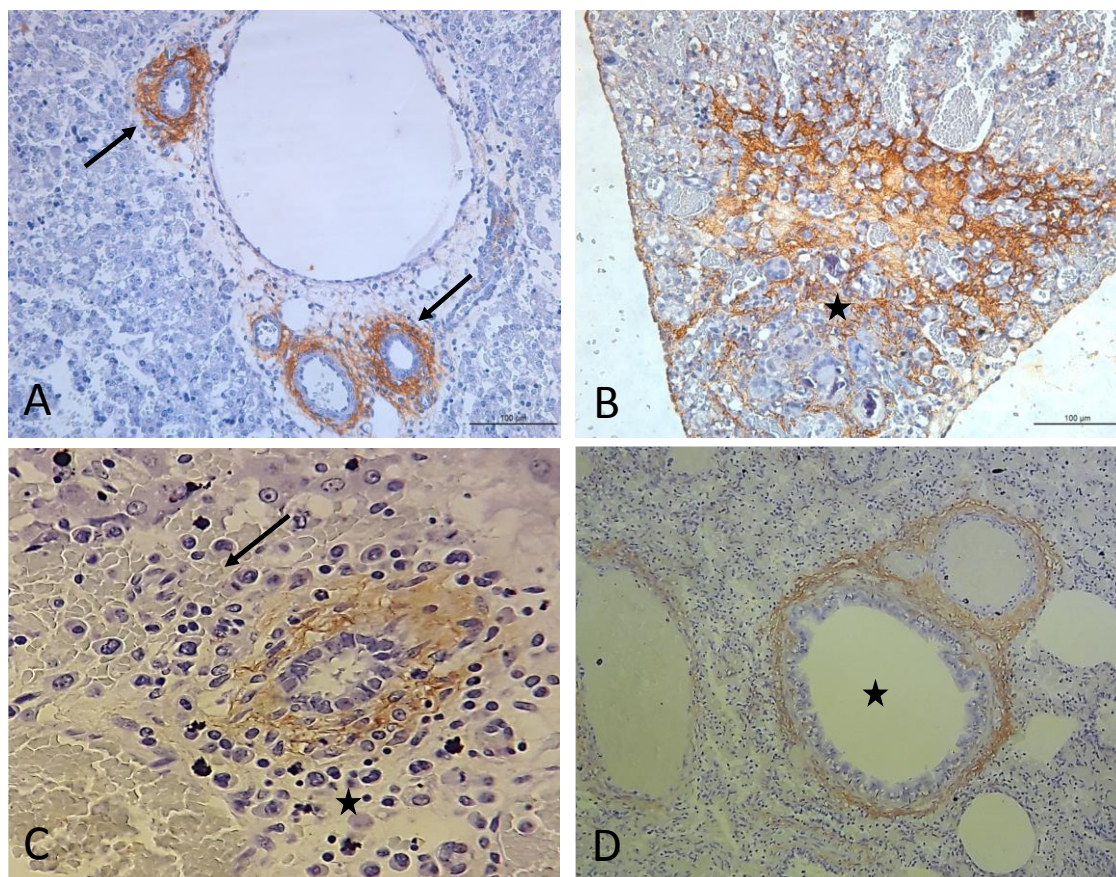


Figura 21. Imuno-histoquímica para detecção de antígenos de *Toxocara canis*. A. Fígado: marcação positiva ao redor de ductos biliares (setas) e arteríola, em espaço porta com inflamação e edema leves (200X). B. Fígado: granuloma com células gigantes em borda de lobo hepático com marcação positiva no interior do granuloma (estrela) e no tecido conjuntivo adjacente (200X). C. Fígado: marcação positiva ao redor de ducto biliar em espaço porta com inflamação, edema e hemorragia (seta) (400X). D. Pulmão: marcação positiva em bronquíolo (estrela) e arteríola, em um pulmão com pneumonia intersticial (100X).

Figura 22. (Página ao lado). Infecção bacteriana neonatal canina. Peritonite. A. Neonato com 12 horas de nascido. Peritonite fibrino-hemorrágica com edema, hemorragia e dilatação de alças intestinais associada a onfalite. Fibrina aderida ao peritônio adjacente ao cordão umbilical (setas). Foram isolados *Acinetobacter baumani*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* de fígado, baço, rim, pulmão e sangue cardíaco deste animal. B. Neonato com três dias de idade, submetido a cirurgia para correção de onfalocele logo após o nascimento, com sutura da parede abdominal. Observa-se peritonite fibrinosa difusa, com dilatação de alças intestinais e petéquias multifociais. *E. coli* foi isolada em cultura pura de fígado, baço, rim e pulmão. Do sangue cardíaco, *E. coli* foi isolada em associação a *Staphylococcus* sp.

5.5. Doenças relacionadas a mortalidade fetal e neonatal canina

A associação dos resultados obtidos possibilitou identificar padrões morfológicos de doenças relacionadas a mortalidade fetal e neonatal canina. Coinfecções foram frequentes e na maioria dos casos não foi possível relacionar a etiologia das lesões a um único agente. A intensidade e alta frequência de lesões morfológicamente compatíveis com infecções bacterianas oportunistas evidenciaram sua importância. Contudo, uma etiologia primária foi diagnosticada na maioria dos casos investigados nesta pesquisa pela associação dos exames anatomopatológicos, microbiológicos e moleculares, como será descrito a seguir.

5.5.1. Infecção bacteriana fetal e neonatal canina

Lesões inflamatórias determinaram a causa de morte da quase totalidade dos animais, predominantemente devido a infecções bacterianas oportunistas em coinfecção com *Brucella*, agentes virais e parasitários. Pneumonia, onfalite, hepatite, dermatite, gastroenterite, endocardite, nefrite, pielonefrite, cistite, embolia bacteriana e peritonite (Figura 22) foram as lesões associadas a infecção bacteriana mais frequentes. O isolamento da mesma espécie bacteriana a partir de amostras de diferentes órgãos com lesões inflamatórias e do sangue cardíaco do mesmo filhote indica o diagnóstico de septicemia, especialmente em casos nos quais cocos e/ou bacilos foram visualizados nas lesões, e evidenciaram a via hematogênica como importante na disseminação dos patógenos em fetos e neonatos caninos.

Portas de entrada para infecção bacteriana puderam ser identificadas em diversos órgãos, como o cordão umbilical nos casos de onfalite, a pele na dermatite ulcerativa ou pustular e nas feridas cirúrgicas, a mucosa intestinal na enterite necrótica, a mucosa respiratória nos casos de aspiração de leite e demais casos de pneumonias.

Infecção bacteriana oportunista por agentes provenientes da microbiota normal seguramente contribuiu de forma importante para as lesões relacionadas a morte dos filhotes examinados neste trabalho e ocorreu com grande frequência nos filhotes positivos para *Brucella* sp., agentes virais e *T. canis*. Infecção bacteriana oportunista foi também a causa das lesões determinantes da morte em nove filhotes portadores de malformações (9/15; 60%).

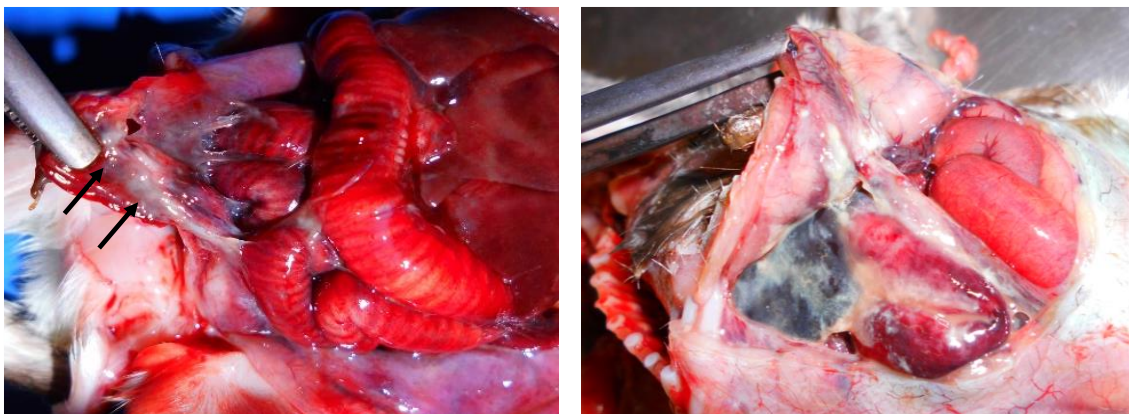


Figura 22. Infecção bacteriana neonatal. Peritonite. Legenda na página anterior.

5.5.2. Brucelose fetal e neonatal canina

Brucella sp. foi detectada por PCR em um número considerável de filhotes (42/200; 21%). Fetos abortados e natimortos *Brucella*-positivos encontravam-se frequentemente com autólise moderada a intensa (8/14; 57%; Figura 23A), com edema e hemorragia na região periumbilical (Figura 23B) e efusão abdominal sero-hemorrágica (Figura 23C). Nos natimortos e neonatos em diferentes idades havia esplenomegalia (Figura 23D), pericardite serosa e epicardite com marcante hiperemia (Figura 23E), pneumonia (Figura 23F), além de hemorragias petequiais na superfície subcapsular dos rins em apenas uma ninhada (Figura 12D). As lesões observadas nos filhotes PCR positivos analisados ao exame histopatológico (n = 35) estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8. Lesões presentes ao exame microscópico de fetos e neonatos caninos positivos para *Brucella* spp. em PCR (n = 35).

Lesões	Número de filhotes acometidos
Pneumonia	26
Hepatite	20
Epicardite	13
Linfólise tímica	10
Onfalite	8
Depleção linfoide	8
Hipoplasia linfoide	7
Enterite	7
Gastrite	6
Miocardite	6
Arterite coronária	4
Trombose	4
Meningite/coroidite	3/2
Ectasia tubular renal	3
Orquite	3
Endometrite	2
Epididimite	2

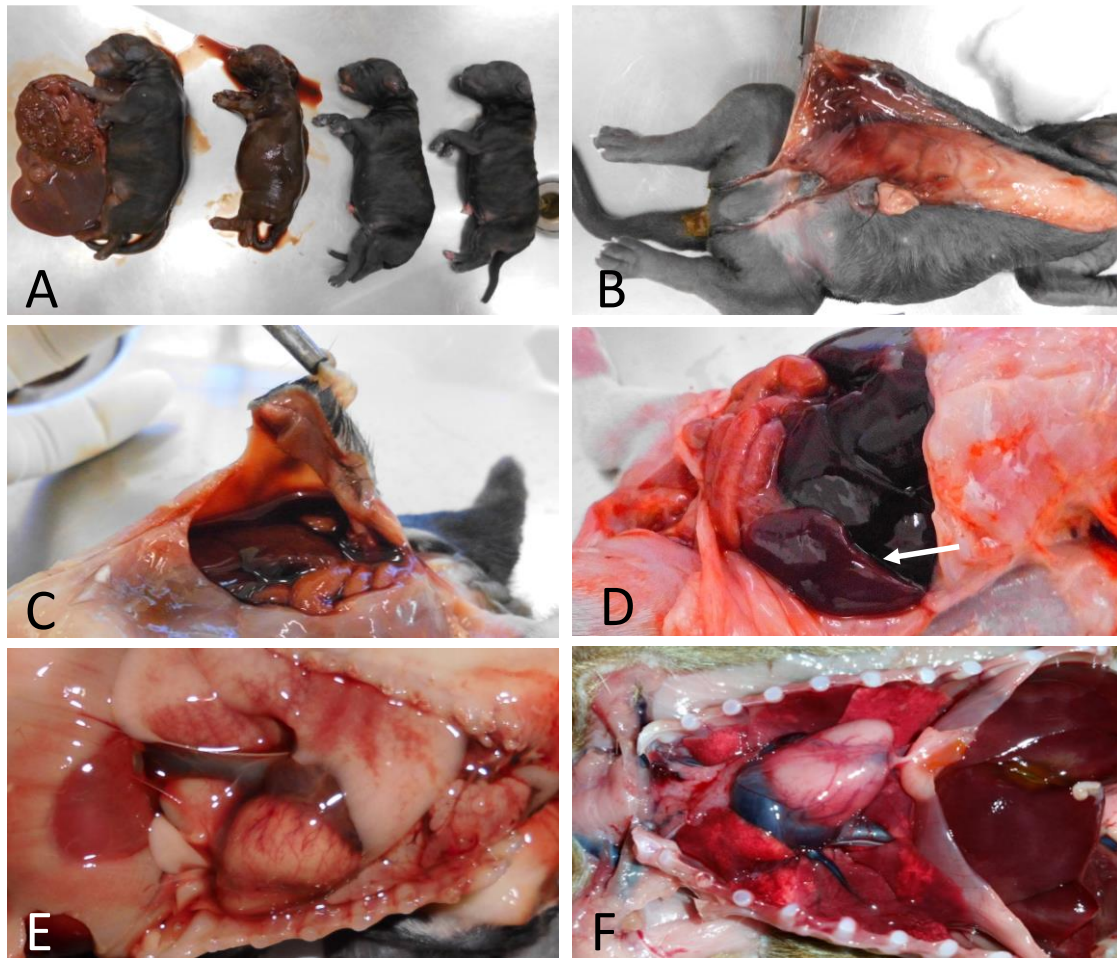


Figura 23. Brucelose fetal e neonatal canina. Lesões observadas em filhotes *Brucella*-positivos em PCR. A. Natimortos prematuros, em diferentes graus de autólise, nascidos em cesariana de emergência devido a morte de cinco fetos e sepse da cadela. Nesta ninhada, *Staphylococcus* sp. foi isolado de pulmões, fígado e placenta de todos os natimortos. B. Natimorto da ninhada ilustrada em A, com edema e hemorragia na região periumbilical. C. Natimorto com efusão abdominal sero-hemorrágica. D. Neonato de dois dias de idade, com esplenomegalia moderada (seta). *E. coli* foi isolada em cultura pura de baço, fígado, e pulmão deste animal. E. Natimorto da ninhada ilustrada em A, com epicardite e pneumonia. F. Neonato de três dias de idade, com pericardite e pneumonia. Dos pulmões deste filhote foram isolados *Staphylococcus* sp. e *E. coli*.

Devido a autólise intensa em sete animais *Brucella*-positivos na PCR, lesões histopatológicas foram descritas em 35 filhotes. As lesões mais frequentes foram: pneumonia (26/35; 74,3%), com os padrões de pneumonia intersticial (19/26; 73,1%), pneumonia broncointersticial (5/26; 19,2%) e broncopneumonia (2/26; 7,7%); hepatite (20/35; 57,1%), com hepatite portal (13/20; 65,0%), em dois casos (10,0%) associada a exsudato fibrinoso; onfalite (8/35; 22,9%), em quadro deles com colônias de cocos bacterianos distintos morfologicamente de *Brucella*. Cocos e/ou bacilos, diferentes de *Brucella* sp., foram visualizados em lesões inflamatórias de 16 destes filhotes.

Gastroenterite discreta difusa, com infiltrado de macrófagos marcados pela imuno-histoquímica na lâmina própria, túnica muscular e túnica serosa, com raros neutrófilos, foi observada em natimortos e neonatos (10/10). Na coloração pela hematoxilina e eosina, o infiltrado macrofágico e neutrofílico foi notado apenas em sete intestinos e seis estômagos.

Devido a autólise avançada, cinco filhotes *Brucella*-positivos não foram submetidos a isolamento microbiológico. Dentre os 37 animais que tiveram amostras inoculadas, apenas três deles resultaram em cultivos negativos. Os agentes isolados com maior frequência destes indivíduos foram: *Staphylococcus* sp. (20/37; 54%) e *E. coli* (15/37; 40,5%).

Em dois fetos abortados de uma mesma ninhada que apresentaram PCR positivo para *Brucella* sp. e isolamento bacteriano negativo, apesar de autólise moderada a intensa, foram demonstrados pela avaliação histopatológica: broncopneumonia, arterite pulmonar e coronária com raros neutrófilos e dermatite histiocítica discreta em um deles; no outro, com autólise mais intensa, miocardite linfocítica multifocal leve.

Dentre os filhotes *Brucella*-positivos, coinfeção com outros agentes foi detectada em 97,6% dos casos (41/42): nove filhotes *Brucella*-positivos apresentavam inclusões sugestivas de infecção viral, dois deles foram positivos na PCR para detecção de *Leishmania*, e agentes bacterianos foram isolados de tecidos de 34 filhotes. Foram isolados um, dois ou três gêneros bacterianos simultaneamente, em 15, 14 e 4 filhotes *Brucella*-positivos, respectivamente.

As lesões dos filhotes *Brucella*-positivos estavam associadas a identificação de diferentes agentes infecciosos, principalmente bacterianos oportunistas, e não puderam ser atribuídas exclusivamente a infecção por *Brucella*.

Através da imuno-histoquímica, evidenciou-se a presença de *Brucella* em diversos tecidos na ausência de lesões inflamatórias ou necróticas significativas, enquanto nas áreas de inflamação moderada a intensa, não ocorreu imunodeteção de *Brucella* sp. Contudo, no miocárdio e na musculatura lisa de artérias, picnose nuclear e cariorexe estavam associados a imunomarcagem de *Brucella* sp. intracitoplasmática (Figura 20D), havia ocasionais macrófagos com cocobacilos positivos pela imuno-histoquímica e raros neutrófilos. No encéfalo de animais positivos, meningite hemorrágica (Figura 14A) e coroidite fibrinosa também foram observadas em associação a imunodeteção de cocobacilos.

5.5.3. Herpesvirose fetal e neonatal

Dentre os neonatos com PCR positivo para herpesvírus canino, apenas um que morreu aos 13 dias de vida apresentou necrose hemorrágica disseminada em fígado, rins e intestinos. Nos pulmões, havia pneumonia intersticial leve, com necrose e fibrina. Na língua, glossite necrótica, com necrose de papilas, também ocorreu neste indivíduo.

Foram isolados *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp. e *Klebsiella pneumoniae* deste animal, possivelmente devido a bacteremia secundária às lesões necróticas em mucosas, pois as lesões observadas eram típicas da infecção por herpesvírus e não de infecção bacteriana (Figura 24).

Em um dos três neonatos positivos para herpesvírus, ectasia tubular renal leve foi observada, mas as lesões mais relevantes foram decorrentes de infecção bacteriana. No terceiro neonato com PCR positivo para herpesvírus não havia lesões compatíveis com este vírus, e a positividade foi interpretada como infecção latente.

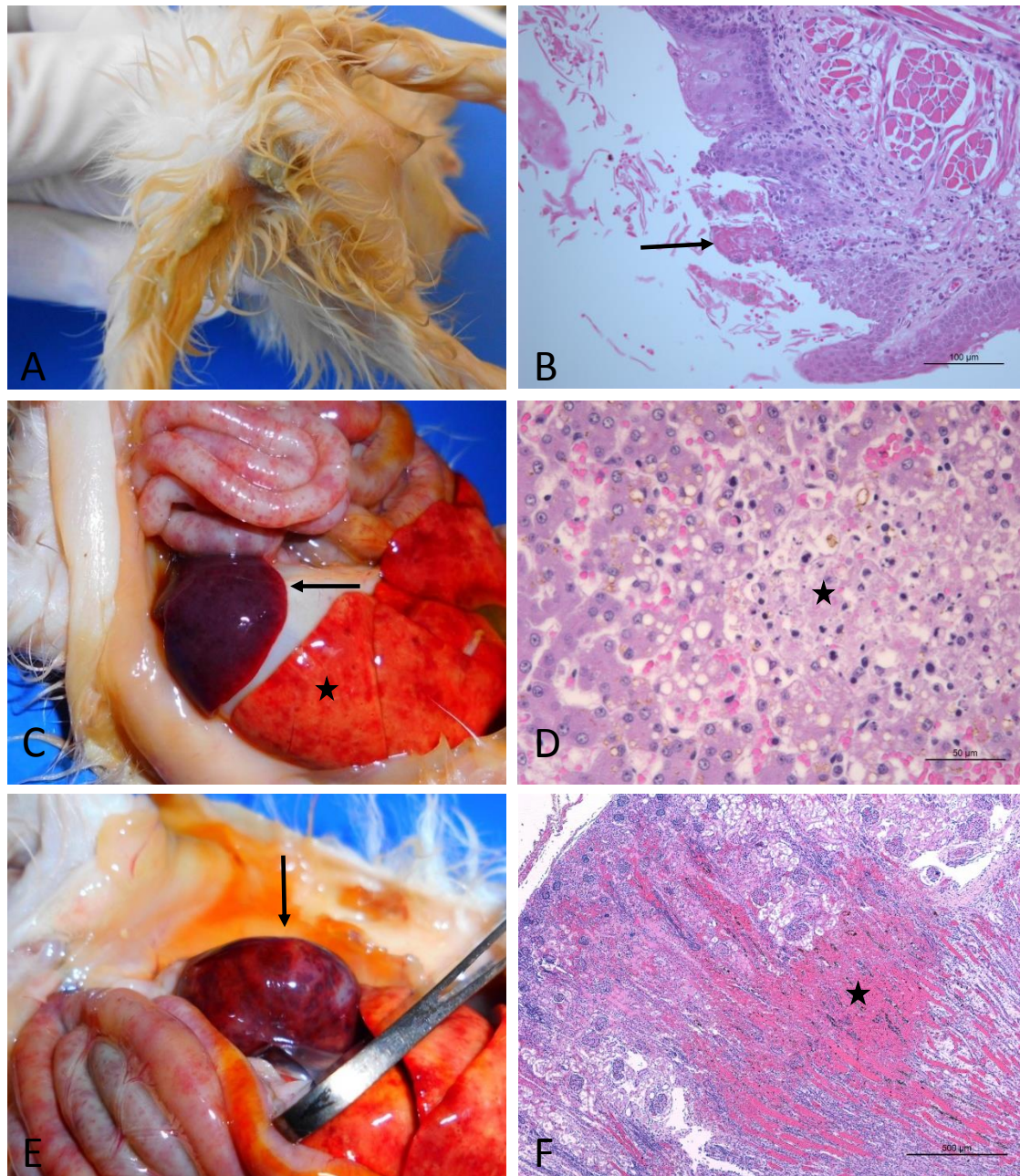


Figura 24. Herpesvirose neonatal canina. Neonato com 13 dias de idade, PCR positivo para herpesvírus canino A. Fezes pastosas acinzentadas nos pelos da região perianal. B. Língua, glossite necrótica: necrose de papilas linguais (seta). H&E (200X). C. Esplenomegalia (seta), intestino com áreas vermelhas multifocais, representativas de infartos hemorrágicos, e fígado (estrela) com pontos vermelhos multifocais e amarelado, devido a hepatite necro-hemorrágica e esteatose. D. Fígado. Área de necrose do parênquima hepático (estrela). H&E (400X). E. Rim: hemorragia difusa na superfície renal (seta). F. Rim: necrose e hemorragia em córtex e medula renais (estrela). H&E (50X).

5.5.4. Glossite-gastroenterite e dermatite sugestivas de infecção viral

Lesões em língua, estômago, intestinos, fígado e órgãos linfoides ocorreram associadas a dermatite e corpúsculos de inclusão sugestivos de infecção viral (Figura 7B), visualizados no epitélio da língua em 56/161 (34,8%) dos filhotes à microscopia óptica. Em quatro destes animais, apenas a língua foi examinada, devido a autólise nos demais órgãos. Neste grupo, foram incluídos quatro animais que apresentavam os corpúsculos de inclusão na pele (Figura 25A) e no cordão umbilical, e não na língua, totalizando 60 animais. Dentre estes neonatos, 20 (35,7%) apresentavam também glossite, por vezes, hemorrágica (Figura 25B). Frequentemente, as inclusões ocorriam em animais que apresentavam dermatite vesicular, pustular (Figura 25C) ou ulcerativa (Figura 25D), pneumonia (Figura 25E e F), hepatite portal, onfalite e enterite. As principais lesões observadas nos animais deste grupo encontram-se reunidas na Tabela 9.

Tabela 9. Lesões relacionadas a glossite-gastroenterite-dermatite e ocorrência de corpúsculos de inclusão intranucleares e citoplasmáticos sugestivos de infecção viral.

Lesões	Número de filhotes acometidos
Corpúsculo de inclusão em epitélio lingual/glossite	56/20
Pneumonia	50
Hepatite/necrose biliar/hepatite fibrinosa	37/27/10
Epicardite/Miocardite	31/18
Onfalite	28
Enterite necrótica	19
Gastrite/gastrite necrótica/hemorragia gástrica	18/10/8
Depleção linfoide/hipoplasia linfoide	17/13
Linfólise tímica	17
Hemorragia/necrose tímica	13/12
Dermatite ulcerativa associada a corpúsculos de inclusão	13
Ectasia tubular renal	12
Mineralização tubular	11
Hemorragia intestinal	6
Fibroplasia/fibrose renal	5/5
Linfólise placa de Peyer	3



Figura 25. Glossite-gastroenterite e dermatite sugestivas de infecção viral. Lesões neonatais associadas a corpúsculo de inclusão sugestivo de infecção viral em língua e/ou pele. A. Neonato com dois dias de idade: dermatite necrótica associada a edema, eritema e vesículas. B. Neonato com um dia de idade: glossite hemorrágica. C. Neonato com quatro dias de idade: dermatite vesicular abdominal e vulvite caracterizada por eritema discreto. À microscopia das lesões apresentadas em A, B, C e D havia corpúsculos sugestivos de infecção viral. D, E, F. Neonato com 9 dias de idade; D: pododermatite ulcerativa (setas); E: pulmões difusamente vermelhos com áreas vermelho-escuras de hemorragia; F: pneumonia broncointersticial com atelectasia e necrose alveolar multifocal a coalescente intensa (estrelas) e infiltrado leucocitário na parede e no lúmen bronquiolar (seta). H&E (200X).

Glossite com corpúsculos de inclusão viral intranucleares e, aparentemente, citoplasmáticos, ocorreu associada a pneumonia intersticial (24/56), broncointersticial (22/56) ou broncopneumonia (4/56), em um desses casos com sobreposição de pneumonia aspirativa. Observou-se necrose alveolar massiva em 18/56 pulmões. Foram observados cocos (14/56) e/ou bacilos (10/56) nos pulmões. Hepatite portal também estava presente com frequência nestes animais (37/56), associada a necrose do epitélio biliar (27/56) e, em alguns casos (4/56), com necrose fibrinoide de arteríolas hepáticas e veias centro-lobulares.

Lesões gastrointestinais também ocorreram nestes animais, mas apenas cortes de 29 intestinos foram considerados nesta descrição, devido a autólise nos demais. Foram observadas necrose coagulativa do epitélio intestinal da base das vilosidades (19/29), necrose segmentar de criptas intestinais em dois casos, e hiperplasia de enterócitos das criptas em oito casos. Bactérias (bacilos, n = 4; cocos, n = 2) foram visualizadas na lâmina própria intestinal adjacente a áreas de necrose.

Onfalite ocorreu em 28/39 animais, com hiperemia, infiltrado de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e exsudato fibrinoso em alguns casos. Nestas lesões, no epitélio da epiderme e folículos pilosos, foram frequentes numerosas colônias bacterianas representadas por cocos (n = 13) ou bacilos (n = 6) e corpúsculos de inclusão semelhantes aos descritos na língua (n = 18).

Dermatite ulcerativa associada a corpúsculos de inclusão viral em queratinócitos foi detectada em 13 filhotes, e em dois deles havia cocos bacterianos em áreas de ulceração da epiderme. As lesões cutâneas eram mais frequentes nas extremidades, como dígitos, coxins, face, além de região abdominal, prepúcio e vulva (Figura 25C).

Lesões em órgãos do sistema linfoide também foram frequentes nestes animais, como depleção e hipoplasia linfoide, linfólise e necrose hemorrágica no timo (Tabela 9).

Os filhotes portadores das inclusões sugestivas de infecção viral desenvolveram infecção bacteriana oportunista, frequentemente múltipla, com cocos e/ou bacilos bacterianos observados com frequência em associação às lesões determinantes da morte destes animais. Amostras de 56 dos 60 animais foram submetidas a isolamento bacteriano. De 16 filhotes isolou-se apenas um gênero bacteriano, de 26 foram isolados dois gêneros, de nove neonatos foram isolados três gêneros e de cinco indivíduos foram isolados quatro gêneros bacterianos, representados por *Staphylococcus* sp. (n = 49), *Escherichia coli* (n = 32), *Klebsiella pneumoniae* (n = 16), *Enterococcus* sp. (n = 8), *Proteus mirabilis* (n = 4), *Enterobacter cloacae* (n = 7), *Streptococcus* sp. (n = 2), e *Pseudomonas* sp. (n = 1).

Todos os animais deste grupo (n = 60) apresentaram resultado negativo na PCR para detecção de parvovírus canino e *Bocaparvovirus*. Dois indivíduos apresentaram resultado positivo para herpesvírus, enquanto os demais foram negativos. Não foi possível determinar a etiologia destas inclusões. Nove animais foram positivos na reação para detecção de *Brucella* spp.

5.5.5. Babesiose neonatal

Infecção por *Babesia canis vogeli* foi diagnosticada em um neonato que morreu aos 15 dias de idade (Figuras 18 e 19). As lesões incluíram esplenomegalia intensa, com o baço medindo 8,0 cm de comprimento, hepatomegalia e palidez generalizada dos tecidos, associada a icterícia e nefrose pigmentar (Figura 26). Segundo informações do histórico, a urina coletada um dia antes da morte apresentava coloração avermelhada e aspecto límpido (Figura 26E), e dois carrapatos haviam sido removidos da pele deste neonato dois dias antes da morte.

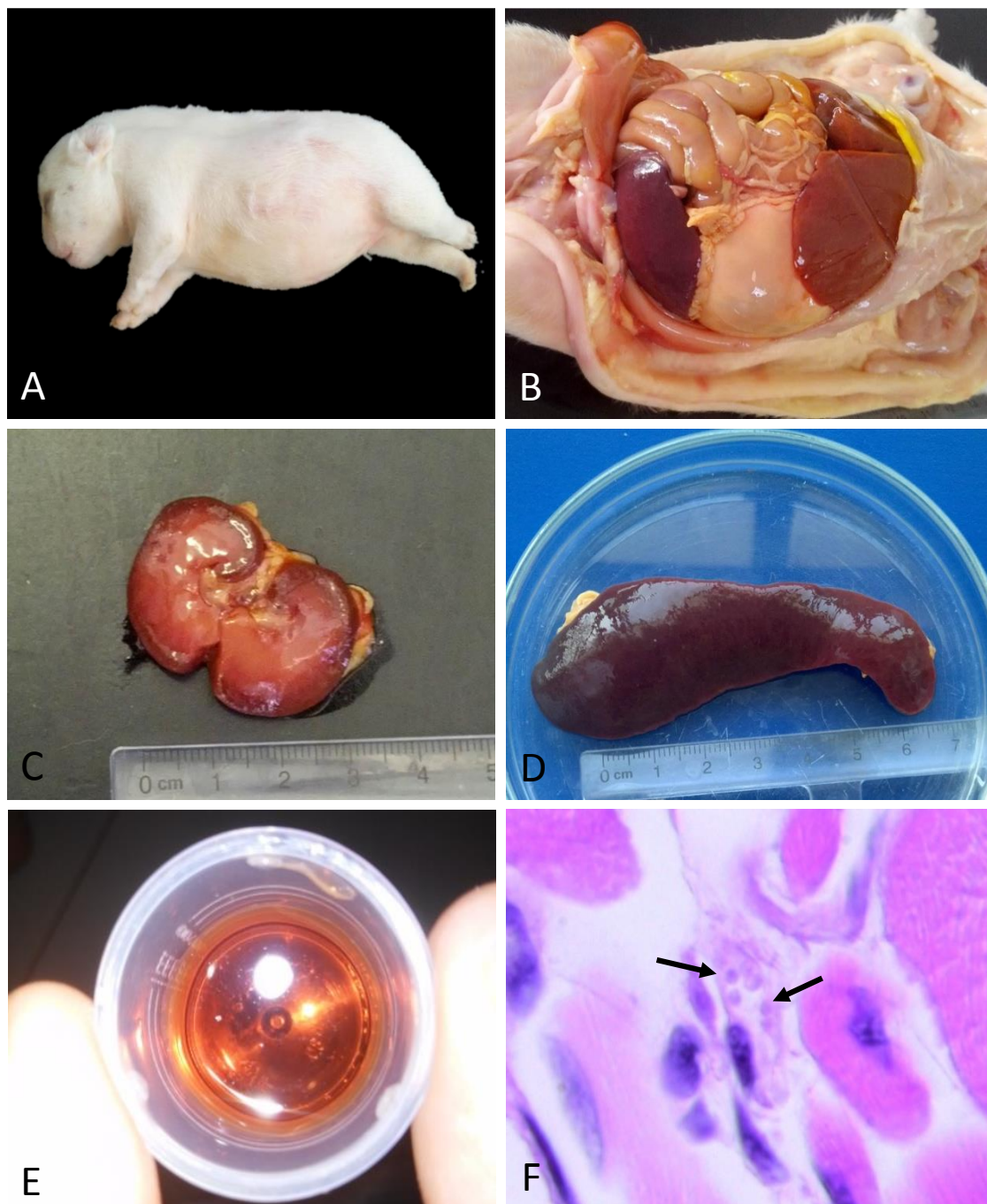


Figura 26. Babesiose neonatal. Neonato com 15 dias de idade. A. Distensão abdominal, icterícia e palidez generalizada. B. Icterícia, hepato e esplenomegalia. Distensão gástrica devido a estase de leite administrado via sonda orogástrica. C. Rins com cortical vermelho escuro devido a pigmentação por hemoglobina. D. Baço vermelho escuro intensamente aumentado de tamanho, medindo 8,0 cm de comprimento. E. Urina alaranjada e límpida, coletada por micção espontânea um dia antes da morte (foto: Juliano Silotti). F. Língua, histopatologia: estruturas esféricas intravasculares em um capilar, com morfologia compatível com *Babesia* sp. (1000X).

5.5.6. Leishmaniose neonatal

Três filhotes foram positivos para *L. infantum* na PCR, provenientes de duas ninhadas e de dois canis distintos, mas neles não foram observadas lesões características da doença, nem amastigotas nos tecidos. Coinfecção com *Brucella* sp. ocorreu associada a *Staphylococcus* sp. em um deles, e *E. coli* e *P. mirabilis* nos outros dois. As infecções bacterianas estavam relacionadas às lesões determinantes da morte destes indivíduos.

5.5.7. Toxocaríase (larva migrans visceral)

Pela imuno-histoquímica foi possível identificar antígenos de *T. canis* em áreas de necrose coagulativa e mineralização hepática subcapsular (Figuras 8C e D) e em granulomas nesta localização (Figura 21B). O antígeno foi também abundante no tecido conjuntivo do espaço porta, ao redor de ductos biliares e vasos sanguíneos (Figura 21A), local frequente de inflamação nestes animais, muitas vezes caracterizada por infiltrado macrofágico, neutrofílico e eosinofílico (Figura 21C). Todavia, a hepatite portal observada pode também ser atribuída a outros agentes infecciosos detectados nestes animais. Os dez filhotes testados apresentaram coinfecção com *Staphylococcus* sp., quatro deles com *Escherichia coli*, e três deles com *Klebsiella pneumoniae*.

Nos pulmões, antígenos de *T. canis* foram marcados no interstício e túnica adventícia de brônquios, bronquíolos e artérias (Figura 21D). A intensidade de inflamação nestas áreas com antígeno de *T. canis* variou, como verificado no fígado. Contudo, eosinófilos foram observados com frequência nas pneumonias, embora em pequena quantidade. Em três neonatos, de duas ninhadas e dois canis diferentes, foram encontrados também indivíduos de *T. canis* no lúmen intestinal.

5.5.8. Hipóxia

Lesões de degeneração hepática e nefrose foram atribuídas a hipóxia em 20 natimortos e 29 neonatos. Padrão morfológico sugestivo de degeneração hidrópica foi frequente em fígado (49/161; 30,4%) e rins (26/147; 17,7%). No fígado, caracterizou-se por hepatomegalia moderada a intensa, com áreas pálidas multifocais a coalescentes, associada com hiperemia moderada a intensa (Figura 8F). Nos rins, microscopicamente, havia degeneração e necrose do epitélio tubular cortical, principalmente proximal, características de nefrose, mas que não foi visualizada na macroscopia.

Nos 20 natimortos portadores de lesões degenerativas e necróticas atribuíveis a hipóxia havia também hipotrofia muscular (sarcopenia) e lesões inflamatórias associadas a detecção de agentes infecciosos por métodos microbiológicos e/ou moleculares. Morfologicamente, essas lesões eram características de processos subagudos a crônicos, indicativos de lesões e doença que ocorreram antes do início do parto. Portanto, a hipóxia fetal nestes casos não pode ser atribuída exclusivamente a distocia. Contudo, não foi possível contextualizar a contribuição da distocia nestes casos, pois a quase totalidade dos criadores participantes da pesquisa não informou sobre como transcorreu o parto de cada ninhada.

Em casos isolados, nos quais o tipo de parto foi informado e pode-se constatar a realização de cesariana eletiva prematuramente (três ninhadas), verificou-se a ocorrência das lesões de hipóxia em natimortos prematuros, o que indica uma causa de hipóxia intrauterina que não a distocia, visto que o parto nem sequer havia se iniciado. Duas destas ninhadas foram positivas em PCR

para *Brucella*, e, do natimorto de outra ninhada, foi isolado *Staphylococcus* sp. Um natimorto proveniente de parto vaginal foi positivo para *Brucella* em PCR e apresentava miocardite, hepatite portal fibrinosa, pneumonia e arterite pulmonar discreta, além da degeneração hepática.

Hemorragia aguda leve peribronquial e/ou perivascular verificada nos pulmões de sete natimortos pode também ter decorrido de hipóxia, assim como a hemorragia cerebelar de dois filhotes. Contudo, também nesses casos, infecções foram detectadas.

Lesões degenerativas decorrentes de hipóxia verificadas no fígado de 29 neonatos ocorreram associadas a casos de pneumonia grave e indicam a relevância da insuficiência respiratória como causa da morte destes filhotes.

6. DISCUSSÃO

Infecções e coinfeções representaram a principal causa de mortalidade neste estudo. As lesões inflamatórias detectadas ao exame anatomopatológico, especialmente pela histopatologia, foram essenciais para indicar a etiologia infecciosa, mesmo nos casos em que não foi possível identificar o agente etiológico. A importância da necropsia e do exame histopatológico para o diagnóstico nos casos de mortalidade fetal e neonatal canina é reconhecida por diversos autores. Contudo, muitas vezes as lesões podem ser inespecíficas, embora direcionadoras do diagnóstico. Por isso, exames auxiliares para identificação do agente etiológico são essenciais (Nielen et al., 1998; Lamm e Njaa, 2012; Young et al., 2015). É igualmente importante a associação entre a detecção de um agente infeccioso e a ocorrência de lesões compatíveis no animal acometido para a realização de um diagnóstico preciso (Larsen et al., 2015), pois os fetos e neonatos podem ser portadores assintomáticos de agentes infecciosos que não tiveram relação com a morte.

Pneumonia intersticial e hepatite portal foram as lesões mais frequentes nos fetos e neonatos caninos examinados. Estas lesões estão associadas a infecções por via hematogena e, nos casos de colangite, também por via ascendente por organismos provenientes do intestino (Caswell e Willians, 2016; Cullen e Stalker, 2016). Diante da alta frequência e intensidade das pneumonias verificadas nos natimortos e neonatos examinados na presente pesquisa, é provável que processos infecciosos representem uma importante etiologia dos casos de angústia respiratória neonatal canina, muito importante nesta faixa etária (Silva et al., 2009b; Vannucchi et al., 2012b).

Pneumonia intersticial e broncointersticial, assim como outras lesões inflamatórias verificadas neste estudo, especialmente hepatite, miocardite, epicardite e endocardite, são lesões inespecíficas, pois podem decorrer de infecção por diversos agentes já documentados em fetos e neonatos caninos, como o vírus diminuto canino (Harrison et al., 1992; Carmichael et al., 1994), o parvovírus canino (Lenghaus et al., 1980), o vírus da cinomose canina (Pandher et al., 2006), *Neospora caninum* (Dubey e Lindsay, 1989; MacAllister et al., 2016; Reis et al., 2016), além de agentes bacterianos como a *Salmonella* (Caswell e Willians, 2016). Portanto, para a definição da etiologia é essencial o emprego de métodos auxiliares para a detecção de agentes bacterianos, virais e parasitários (Lamm e Njaa, 2012).

Infecções bacterianas foram a principal causa de morte nos filhotes examinados, como já constatado por outros autores (Nielen et al., 1998; Münnich, 2008). Em humanos, a sepsé neonatal também é uma importante causa de morbidade e mortalidade (Shah e Padbury, 2014). A faixa

etária representada pelo maior número de filhotes examinados neste trabalho (< 2 dias de idade), coincide com aquela de maior mortalidade perinatal canina documentada por Mila e colaboradores (2014), o que é observado também na sepse neonatal humana, caracterizada como sepse neonatal precoce (Shah e Padbury, 2014).

Em humanos, geralmente a infecção é de origem materna e pode estar relacionada a alterações na microbiota vaginal da mulher gestante, neonato com baixo peso ao nascer, ruptura precoce das membranas fetais e partos prematuros (Shah e Padbury, 2014), mas, no presente estudo, ocorreram predominantemente como infecções oportunistas secundárias associadas a brucelose e infecções virais. O isolamento de organismos pertencentes a gêneros bacterianos já descritos por outros autores em neonatos caninos (Münnich, 2008, Meloni et al., 2014), associado a lesões inflamatórias e à visualização dos organismos nos tecidos em vários casos deste estudo, reforçam a relevância diagnóstica dos resultados obtidos a partir do isolamento bacteriano.

Os agentes mais frequentes nos casos de sepse fetal e neonatal canina deste estudo foram *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* sp., semelhante ao que foi observado por outros autores (Münnich, 2008; Meloni et al., 2014). Contudo, houve também o isolamento de *Acinetobacter baumannii* em dois animais e de *Kluyvera ascorbata* em outro, os três portadores de lesões inflamatórias graves. Esses agentes ainda não haviam sido descritos em casos de sepse neonatal canina, mas, em humanos, *A. baumannii* é considerado um importante patógeno oportunista em infecções nosocomiais (Garcia-Patiño et al., 2017), enquanto *K. ascorbata* é importante em infecções pediátricas (Öncel et al., 2015).

Infecções por bactérias normalmente presentes na microbiota normal da cadela (Groppetti et al., 2012) e também já identificadas em neonatos caninos saudáveis (Saijonmaa-Koulumies e Lloyd, 2002) foram muito frequentes, em muitos casos favorecidas por quebra nas defesas naturais dos filhotes, como áreas de solução de continuidade de epitélios de revestimento observados nas lesões de onfalite, dermatite e necrose do epitélio intestinal associadas a infecção viral e feridas cirúrgicas.

As fontes de infecção das doenças bacterianas, como a cavidade vaginal da cadela, o leite, ou as fezes (Schäfer-Somi et al., 2003; Münnich e Lübke-Becker, 2004; Groppetti et al., 2012) podem diferir das condições de transmissão de agentes virais (Decaro e Buonavoglia, 2012), especialmente ao se considerar a possibilidade de infecção com cepas virais vacinais (Decaro et al., 2007). Portanto, as infecções bacterianas e virais perinatais na espécie canina precisam ser melhor conhecidas, para que os esforços sejam bem direcionados no sentido de reduzir a mortalidade nesta faixa etária.

Os agentes virais são reconhecidos por sua capacidade de comprometer a imunidade e barreiras de defesa do hospedeiro, favorecendo infecções oportunistas. O parvovírus canino (Decaro e Buonavoglia, 2012), o vírus da cinomose canina (Greene e Vandeveld, 2012) e o bocavírus (Bodewes et al., 2014) infectam órgãos linfóides e ocasionam necrose de epitélios de revestimento, lesões estas verificadas em grande número de filhotes examinados neste trabalho.

Possivelmente, as infecções virais e *Brucella* sp. devem ter contribuído de forma significativa para a ocorrência das infecções bacterianas secundárias verificadas neste estudo. Infecções bacterianas são frequentemente diagnosticadas em neonatos caninos (Münnich, 2008; Meloni et al., 2014), contudo, uma etiologia primária pode passar despercebida nos filhotes com lesões características de infecção bacteriana se não forem realizados exame histológico minucioso para a visualização de inclusões virais intracelulares e análises moleculares para detecção de agentes

virais e *Brucella*. A imuno-histoquímica é uma opção muito útil para a investigação de etiologias primárias nesses casos.

Com grande frequência, organismos bacterianos foram isolados dos tecidos que apresentavam lesões inflamatórias, entretanto, nem sempre eram visualizados nos cortes histológicos, o que pode decorrer de distribuição irregular do agente no órgão acometido. Bactérias isoladas a partir de amostras de tecidos coletados em necropsia muitas vezes representam o agente infeccioso patogênico relacionado à lesão e doença do animal, mas podem também representar bactérias que realizaram translocação em um animal enfermo nos momentos que antecedem a morte, ou, ainda, após a morte (Morris et al, 2007).

Os casos de infecção bacteriana diagnosticados neste trabalho caracterizaram-se por eventos vasculares agudos, especialmente hiperemia e hemorragia, semelhante ao que fora descrito por outros autores (Kornblatt et al., 1983). Em muitos casos, havia também edema com fibrina em quantidades variáveis. Exsudato purulento foi observado em apenas 2 indivíduos, embora infiltrado neutrofílico tenha sido descrito microscopicamente em diferentes intensidades. Este fato pode se dever à evolução hiperaguda dos casos de sepsé neonatal canina, complicados pela ocorrência de hipotermia, hipoglicemia e desidratação, com a morte do neonato canino pouco tempo após o início da infecção bacteriana (Münnich e Küchenmeister, 2014), mas pode também dever-se a particularidades da resposta inflamatória e imunológica dos fetos e neonatos caninos. Porém, a imunopatologia fetal e neonatal ainda carece de mais estudos para que esta e outras questões sejam esclarecidas.

A ocorrência de mais de um gênero bacteriano no mesmo animal foi documentada neste estudo em um número significativo de casos, em associação a infecção por *Brucella*, *Toxocara*, *Leishmania* e infecções virais. Coinfecções de gêneros bacterianos oportunistas são relatados em neonatos caninos, todavia, os estudos bacteriológicos realizados não investigaram a possibilidade de coinfecção com agentes infecciosos de difícil isolamento, como a *Brucella*, ou agentes virais e protozoários (Nielen et al., 1998; Münnich, 2008; Meloni et al., 2014). Em humanos, acredita-se que infecções simultâneas possam induzir imunodeficiência em neonatos, o que favorece agentes oportunistas e piora o prognóstico do paciente (Shah e Padbury, 2014).

No período perinatal, a brucelose ocorreu em associação a outras infecções, especialmente por bactérias oportunistas como *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli*, e também com agentes virais e *Leishmania*. A coinfecção experimental de *Brucella* sp. e *Trypanosoma musculi* em camundongos evidenciou a supressão da secreção de interferon gama associada ao aumento na secreção de interleucina 10 (IL-10), em comparação a infecção por um dos dois agentes isoladamente (Lowry et al., 2014). É possível que a ocorrência de infecções múltiplas tenha um efeito aditivo e imunossupressivo, potencializando a patogenicidade dos agentes e agravando o quadro do paciente.

A *Brucella* é reconhecida como um organismo bacteriano de crescimento lento em meios de cultura (Keid et al., 2004) e muitas vezes encontra-se em baixa concentração nos tecidos infectados, como verificado pela imuno-histoquímica realizada neste estudo, o que pode levar a resultados falso-negativos em exames para diagnóstico direto do agente. Nas coinfecções de *Brucella* com bactérias de crescimento rápido ou agentes virais, a detecção de outro agente como causa da morte perinatal pode contribuir muito para o subdiagnóstico da brucelose canina.

Em geral, a brucelose canina continua a ser uma doença pouco conhecida, subdiagnosticada e pouco estudada. Desde a sua primeira descrição em 1966, e na década seguinte, quando diversos artigos sobre a doença foram publicados (Carmichael, 1966; Carmichael e Kenney, 1968;

Carmichael e Kenney, 1970), houve grande lacuna nos anos subsequentes, voltando ao cenário científico apenas a partir de 2000 (Wanke, 2004; Maklosky, 2011).

A imuno-histoquímica foi empregada para o estudo da brucelose em fetos e neonatos caninos pela primeira vez neste trabalho. Esta técnica foi essencial para a localização de *Brucella* nos tecidos dos filhotes de cães examinados, visto que a *Brucella* não é facilmente visualizada na coloração de hematoxilina e eosina (Moore e Kakuk, 1969). Com isso, foi possível observar sua ampla distribuição nos tecidos, aspecto muito importante na compreensão da doença e uma valiosa contribuição deste estudo.

A anatomopatologia de casos naturais de brucelose canina no período perinatal ainda não havia sido descrita, sendo esta uma contribuição deste trabalho. As lesões atribuíveis a *Brucella* nos neonatos analisados foram discretas, como evidenciado pela imuno-histoquímica, com sobreposição das lesões decorrentes de infecções bacterianas secundárias. Contudo, o comprometimento de artérias coronárias e do miocárdio, documentado em fetos nesta pesquisa e por outros autores em casos experimentais (Carmichael e Kenney, 1970), pode ter relevância clínica, e estudos eletrocardiográficos em neonatos caninos portadores de *Brucella* poderiam ser úteis para evidenciar eventuais consequências da infecção na célula cardíaca.

A ausência de exuberante reação inflamatória nos tecidos infectados por *Brucella*, como foi observado neste trabalho, deve estar relacionada a seus mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro (Adams, 2002). Organismos do gênero *Brucella*, especialmente *B. ovis* e *B. canis*, apresentam mecanismos de supressão de resposta inflamatória para sua persistência no organismo (Bagüés et al., 2004). Com isso, podem também comprometer a capacidade de resposta imunológica frente a outros patógenos (Lowry et al., 2014), o que deve ter contribuído para as infecções bacterianas oportunistas documentadas nos filhotes examinados.

Ainda, é possível que a infecção por *Brucella* nos filhotes deste estudo esteja relacionada às lesões observadas em órgãos linfoides, pois apoptose em associação a infecção por *B. abortus* foi documentada em fetos bovinos abortados (Ozkaraka et al., 2016), sendo este outro fator imunossupressor. Portanto, ressaltamos a importância da infecção por *Brucella* sp. na mortalidade fetal e neonatal canina, e alertamos para a dificuldade de realizar seu diagnóstico nestes casos, devido a ausência de lesões que sejam patognômicas da brucelose canina perinatal e diante das frequentes coinfeções por agentes bacterianos oportunistas, que são de fácil detecção e indutores de lesões mais exuberantes.

A intensa imunomarcagem na mucosa gastrointestinal é uma evidência da importância da via oral na infecção fetal e neonatal, possivelmente pela ingestão do líquido amniótico durante a gestação, rico em *B. canis* (Carmichael e Kenney, 1970), ou através do aleitamento materno. A concentração de *Brucella* no leite da cadela é alta, embora sua importância na transmissão da doença seja controversa, pois, em geral, ocorre no útero antes do nascimento (Wanke, 2004). Todavia, a imunomarcagem de *B. canis* na mucosa de neonatos até 13 dias de idade é uma informação relevante diante da possibilidade de coleta de leite de cadelas para bancos de colostro e da prática de troca de filhotes entre matrizes, realizada por muitos criadores.

A imunomarcagem de *Brucella* no epitélio de túbulos renais e no conteúdo intestinal de neonatos caninos demonstra possíveis vias de eliminação da bactéria e potencial transmissão zoonótica. Embora o método empregado no presente trabalho não possa atestar a infectividade, *B. canis* já foi isolada das fezes de cães em baixa concentração bacteriana (Wanke, 2004).

A importância da urina na transmissão da brucelose canina já é conhecida, mas acredita-se que ocorra em animais púberes e esteja relacionada principalmente com a secreção prostática (Maklosky, 2011). Contudo, a transmissão zoonótica a partir de contato com filhotes de cães desmamados já foi documentada (Lucero et al., 2010; Dentringer et al., 2014), mas a forma de infecção das pessoas acometidas naqueles casos não foi determinada.

Outra localização importante de imunomarcção, do ponto de vista zoonótico e de transmissão da doença, foi o extrato córneo, o que possivelmente deve-se ao contato direto da pele do feto com o líquido amniótico, rico em *B. canis* (Carmichael e Kenney, 1970). Embora a viabilidade bacteriana não tenha sido investigada neste trabalho, esta informação reforça a necessidade do cuidado sanitário necessário ao manipular fetos e neonatos caninos. Estudos com isolamento bacteriano a partir de urina, fezes e swabs cutâneos coletados de neonatos caninos poderão contribuir muito para a compreensão das potenciais vias de transmissão zoonótica da doença.

Outro aspecto relevante é a localização de *Brucella* em órgãos do sistema reprodutor dos natimortos e neonatos caninos examinados. O tropismo genital da bactéria é bem conhecido (Moore e Kakuk, 1969; Carmichael e Kenney, 1970), mas não havia sido documentado em animais pré-púberes tão jovens. As lesões descritas neste trabalho podem comprometer o futuro reprodutivo dos filhotes infectados sobreviventes. Infertilidade é uma das principais apresentações clínicas da brucelose canina (Moore e Kakuk, 1969; Wanke, 2004), e uma importante razão para que os criadores busquem a erradicação da doença em seus plantéis.

Nossos resultados demonstraram que a infecção por *Brucella* sp. foi frequente nas ninhadas e disseminada nos plantéis de cães de raça no Espírito Santo, onde 50% dos canis avaliados tiveram pelo menos um filhote positivo. Estudos baseados em isolamento bacteriano a partir de sangue de cães adultos demonstram alta positividade para brucelose em cães reprodutores de canis de São Paulo, no Brasil (Keid et al., 2004; 2017). Um levantamento com natimortos provenientes de partos distócicos no Mato Grosso também indicou alta positividade em PCR (Taqes et al., 2016). Estes resultados evidenciam que a positividade para brucelose canina no Brasil é elevada.

O presente estudo documenta pela primeira vez a positividade para *Brucella* sp. em filhotes provenientes de canis comerciais, especialmente em neonatos, o que sinaliza o risco potencial para as famílias que adquirem filhotes de cães como animais de estimação. Evidencia também a importância de considerar a brucelose como diagnóstico diferencial em casos de mortalidade neonatal, não apenas nos casos de aborto. Aborto ocorreu apenas em 1 dos 16 plantéis de cães *Brucella*-positivos deste estudo, diferente do que é esperado na brucelose canina (Carmichael, 1966; Wanke, 2004; Maklosky, 2011). A inexistência de abortos pode contribuir de forma importante para a falha em incluir a brucelose como diagnóstico diferencial dos casos de natimortalidade e morte neonatal canina e para o subdiagnóstico.

A alta positividade para *Brucella* coincide com a ausência de regras sanitárias para a prevenção e controle da doença e para o trânsito ou comercialização de cães, um reflexo da falta de atenção das autoridades sanitárias nacionais e mundiais com relação à brucelose canina (Angel et al., 2013). A falta de sensibilização dos criadores para a importância da doença, e a baixa capacidade de detecção de animais positivos com os métodos de diagnóstico disponíveis (Holst et al., 2012; Dentringer et al., 2014; Taques et al., 2016) devem ser fatores importantes para a sua ampla distribuição. Tal negligência foi evidenciada pelo fato de que os 32 criadores participantes nesta pesquisa (100%) afirmaram que não realizavam testes periódicos para diagnóstico de brucelose em seus cães. Por conseguinte, consideramos a brucelose canina como uma potencial zoonose urbana emergente.

A negligência quanto à importância da brucelose canina pode também dever-se ao fato de que, por muito tempo, a doença foi considerada uma zoonose de menor importância. Todavia, desde 2010, com o diagnóstico e publicação de novos casos em crianças e adultos (Lucero et al., 2010; Dentringer et al., 2014) e diante de levantamentos soropidemiológicos em humanos (Angel et al., 2013; Krueger et al., 2014), sua importância zoonótica deve ser reconsiderada.

Depois das infecções bacterianas, o diagnóstico mais frequente nos animais estudados foi de infecções virais. Lesões na mucosa lingual associadas a inclusões características de infecção viral ocorreram em 56 animais. Não foi possível identificar a etiologia destas inclusões com os métodos utilizados neste trabalho, embora sua morfologia seja idêntica àquela descrita em casos de infecção pelo parvovírus canino (Matsui et al., 1993; Hullinger et al., 1998). As lesões observadas em pulmão, fígado, coração e órgãos linfoides são compatíveis com a infecção pelo parvovírus canino na fase perinatal, e, embora inespecíficas (Carpenter et al., 1980; Lenghaus e Studdert, 1982), sugerem ser esta a etiologia das lesões documentadas. Entretanto, as lesões cutâneas atribuídas ao parvovírus canino (Favrot et al., 2000; Woldemeskelet al., 2011) diferiram morfológicamente daquelas observadas neste estudo.

As lesões sugestivas da infecção pelo parvovírus na fase perinatal podem ser inespecíficas (Carpenter et al., 1980; Lenghaus e Studdert, 1982), entretanto, no caso de visualização de corpúsculos de inclusão no coração (Carpenter et al., 1980) e na língua (Matsui et al., 1993; Hullinger et al., 1998) deve-se suspeitar deste agente. Contudo, as lesões decorrentes das infecções bacterianas oportunistas ou coinfeções podem se sobrepor e confundir o diagnóstico.

Porém, nas amostras de todos os filhotes acometidos, assim como naquelas de todos os demais filhotes analisados, não foi possível detectar o DNA de parvovírus canino ou de bocavírus canino. Todos os animais testados apresentaram resultado negativo na PCR para estes agentes, embora os controles positivos tenham funcionado em todas as reações. Este fato impede a confirmação de que as lesões observadas se deveram a infecção por algum destes vírus. Todavia, o método de extração empregado foi desenvolvido para extração de DNA de colônias bacterianas (Pitcher et al., 1989), que apresentam parede celular com composição distinta do capsídeo viral e tamanho celular muito superior ao dos vírus.

Entretanto, a associação entre os corpúsculos de inclusão na mucosa lingual e a infecção pelo parvovírus canino é aceita por outros autores como direcionadora do diagnóstico (Greene e Decaro, 2012; Uzal et al., 2016), embora ainda não tenha sido investigada a possibilidade de outros agentes produzirem corpúsculos semelhantes no epitélio da língua de cães, como o vírus da cinomose canina, os bocavírus e o herpesvírus. A dificuldade de isolamento das estirpes de bocavírus pode ser um fator limitante para este diagnóstico (Decaro et al., 2012b).

Krakowka e colaboradores (1977) relataram corpúsculos de inclusão em células epiteliais e linfoides relacionados a infecção pelo vírus da cinomose em neonatos caninos com atrofia tímica, depleção e/ou necrose linfoide, lesões estas semelhantes às observadas nesta pesquisa. Porém, nos neonatos do Espírito Santo, não foram observados corpúsculos em células linfoides, e os corpúsculos em células epiteliais eram distintos morfológicamente daqueles observados em casos de cinomose, o que sugere tratar-se de outra etiologia.

Diante da grande frequência dos corpúsculos de inclusão no epitélio da língua verificada nesta pesquisa, e da limitação de conhecimento sobre sua etiologia e significado, mais estudos são necessários. Todavia, recomenda-se que a língua seja sempre coletada e analisada histopatologicamente em casos de mortalidade fetal e neonatal canina. É interessante acrescentar que mesmo em animais com todos os tecidos autolisados ainda foi possível visualizar os

corpúsculos de inclusão na língua, fato também documentado por outros autores (Matsui et al., 1993).

A parvovirose raramente é citada como causa de mortalidade na fase perinatal na espécie canina (Nielen et al., 1998; Young et al., 2015), e depois das primeiras descrições na década de 80 (Carpenter et al., 1980; Lenghaus e Studdert, 1982), e de alguns estudos com relação a forma cardíaca da doença em filhotes mais velhos (Lenghaus et al., 1980; Robinson et al., 1980), a doença não tem sido considerada dentre os diagnósticos diferenciais de mortalidade de fetos e neonatos caninos (Verstegen et al., 2008; Decaro et al., 2012a). Portanto, é importante que estudos sejam desenvolvidos com o intuito de investigar a frequência da infecção perinatal por parvovírus canino e sua real patogenicidade nesta faixa etária.

Enquanto os filhotes portadores das inclusões epiteliais em língua e pele sugestivas de infecção viral (60/161; 37,3%) representaram um número significativo de casos neste trabalho, a forma clássica da herpesvirose neonatal (Oliveira et al., 2009), considerada uma causa importante de mortalidade nesta faixa etária (Greene, 2012a) foi diagnosticada em apenas um indivíduo. Este fato revela a necessidade de mais estudos em patologia perinatal canina para a identificação de doenças e padrões morfológicos ainda pouco conhecidos, assim como para o desenvolvimento de métodos de prevenção destas doenças nos planteis.

A detecção de DNA de herpesvírus canino nas amostras de apenas três filhotes analisados nesta pesquisa foi inferior àquela de 21% relatada em um estudo realizado na Dinamarca (Larsen et al., 2015). As lesões associadas à infecção por herpesvírus no filhote do presente trabalho foram idênticas àquelas citadas por outros autores, caracterizadas por necrose e hemorragia em fígado, rins, intestinos e pulmão. Corpúsculos de inclusão intranucleares não foram visualizados em hepatócitos, e são considerados raros na herpesvirose canina (Oliveira et al., 2009; Larsen et al., 2015).

O único filhote, dentre os 203 analisados, que apresentou lesões macro e microscópicas características da forma generalizada da herpesvirose neonatal (Oliveira et al., 2009; Larsen et al., 2015) foi positivo na reação de PCR para este agente, o que indica a alta correlação destas lesões com a infecção ativa por herpesvírus no período neonatal. Este neonato apresentou raros corpúsculos de inclusão na língua, o que pode representar uma coinfeção ou pode indicar que o herpesvírus também seja capaz de produzir esta lesão, além do parvovírus. Necrose de papilas linguais ocorreu nesse neonato, lesão nunca antes descrita em neonatos caninos com herpesvírus, mas reconhecida em casos de infecção por herpesvírus em bovinos (Uzal et al., 2016).

Infecção bacteriana oportunista também ocorreu associada à infecção por herpesvírus neste neonato, e pode estar relacionada a imunodeficiência e/ou quebra da integridade do epitélio intestinal. O herpesvírus geralmente se comporta como um agente oportunista, não se manifestando em indivíduos imunocompetentes (Greene, 2012a). Algum fator imunossupressor pode ter favorecido a ocorrência da herpesvirose neonatal neste indivíduo, como a falha da transferência de imunidade passiva, mas não foi possível determinar se houve a ingestão de colostro por este filhote.

Um dos outros dois filhotes positivos na PCR para herpesvírus não apresentou lesões macro ou microscópicas sugestivas de replicação ativa, e, portanto, foi considerado como um caso de latência (Larsen et al., 2015).

No terceiro neonato positivo na PCR para herpesvírus, a lesão principal foi pleurite fibrinosa com pneumonia broncointersticial, de onde foram isolados *Staphylococcus* e *E. coli*. Nos rins, este

neonato tinha ectasia tubular associada a perda de túbulos na região medular e fibroplasia, uma lesão descrita como displasia renal por Percy e colaboradores (1971) em filhotes de cães que sobreviveram a infecção fetal/neonatal por herpesvírus.

Entretanto, houve um caso de vulvite associada a corpúsculos de inclusão com morfologia compatível com herpesvírus (Decaro et al., 2012a) o qual também tinha ectasia tubular renal, mas que apresentou resultado negativo na PCR para herpesvírus. Neste caso, a negatividade pode ter decorrido da ausência do agente nos órgãos analisados, visto que as inclusões se localizavam na vulva e a lesão renal descrita por Percy e colaboradores (1971) ocorreu após a resolução da infecção ativa.

Por outro lado, ectasia de túbulos renais associada a proliferação mesenquimatosa intersticial, compatível com displasia renal (Percy et al., 1971), ocorreu em 27 filhotes neste estudo, e apenas um deles foi positivo na PCR para herpesvírus. Este fato pode se dever à fase de latência da infecção, quando o vírus é detectado apenas em neurônios do sistema nervoso central ou em neurônios ganglionares (Miyoshi et al., 1999). Contudo, na lesão descrita por Percy et al. (1971), imunomarcagem positiva para herpesvírus foi detectada no interior do núcleo de células epiteliais renais, indicando a presença de antígenos do vírus no momento do diagnóstico da displasia renal. Portanto, a ectasia tubular observada neste estudo pode ser decorrente de outra etiologia.

Tais lesões observadas nos rins dos fetos e neonatos deste trabalho assemelham-se também às descritas em um estudo retrospectivo com 45 cães diagnosticados com displasia renal, embora os autores não tenham indicado uma possível etiologia (Picut e Lewis, 1987).

Alterações inflamatórias e degenerativas foram frequentes em cães com displasia renal que morreram entre um mês e cinco anos de idade (Picut e Lewis, 1987), o que pode indicar um componente infeccioso na patogênese da lesão. A displasia renal descrita por Percy e colaboradores (1971) decorreu da necrose de células glomerulares e tubulares devido a infecção pelo herpesvírus. Como herpesvírus foi raro dentre os filhotes examinados neste trabalho, é possível que outros agentes infecciosos capazes de infectar células epiteliais tubulares e glomerulares também possam ocasionar necrose destas estruturas, com consequente dilatação dos segmentos tubulares adjacentes e fibroplasia reacional.

Outras infecções por agentes epiteliotrópicos, como o parvovírus canino na fase neonatal, foram relacionados a necrose de estruturas dos nefrons em desenvolvimento (Carpenter et al., 1980; Lenghaus e Studdert, 1982). Doze neonatos portadores de ectasia tubular no presente trabalho tinham também as inclusões intraepiteliais em língua e pele sugestivas de infecção viral. Necrose e hemorragia renal foram observadas em quatro filhotes de uma ninhada portadores das inclusões na língua.

No presente estudo, *Brucella* sp. foi detectada intracitoplasmática em células do epitélio tubular pela imuno-histoquímica, inclusive associada a necrose segmentar tubular na região medular em alguns indivíduos. Três neonatos positivos para *Brucella* apresentaram ectasia tubular renal, e apenas um deles era portador de inclusões intraepiteliais na língua. Todavia, a displasia renal nunca fora associada a brucelose canina (Carmichael e Kenney, 1970; Olsen e Palmer, 2014).

Outra possível etiologia a ser considerada para a displasia renal observada nos animais deste estudo é uma alteração genética. A displasia renal é bem caracterizada do ponto de vista genético e morfológico em humanos (Phua e Ho, 2016; Capone et al., 2017). Porém, nos cães, os critérios morfológicos empregados para o diagnóstico da displasia renal são menos específicos do que

aqueles empregados em humanos (Picut e Lewis, 1987). Os aspectos genéticos ainda não foram claramente definidos em cães, e o modo de herança gênica é variável entre as raças (Greco, 2001).

A displasia renal é mais frequente em algumas raças e linhagens de cães. Dentre as 35 raças citadas em casos de displasia renal familiar (Greco, 2001), Collie, Yorkshire Terrier, Shitzu e Poodle foram examinados nesta pesquisa, e ectasia tubular estava presente em 3/3, 1/5, 1/3, 0/5, respectivamente.

Leishmania infantum foi detectada em três filhotes, mas, semelhante ao que fora documentado por outros autores (Pangrazio et al., 2009), não foram observadas lesões decorrentes da infecção por *L. infantum* nos filhotes positivos. A baixa frequência documentada deve estar relacionada ao fato de que a doença ainda é rara na região geográfica estudada (Pires, 2015). Por outro lado, a positividade em dois canis e em raças distintas evidencia que o agente está presente em uma área não-endêmica, e, por esta razão, a sorologia para detecção da infecção por *Leishmania* deve ser incluída nos protocolos sanitários para cães reprodutores, visto que pode haver transmissão por via venérea e transplacentária (Pangrazio et al., 2009; Silva et al., 2009a; Turchetti et al., 2015).

O caso de babesiose identificado nesta pesquisa inclui a doença na lista de diagnósticos diferenciais de quadros de anemia hemolítica em neonatos caninos. As lesões observadas foram semelhantes àquelas que ocorrem em cães mais velhos (Birkenheuer et al., 2012), com esplenomegalia intensa associada a icterícia e nefrose pigmentar.

Infecção transplacentária experimental de *Babesia gibsoni* foi documentada em cães no Japão (Fukumoto et al., 2005), em uma ninhada de cinco filhotes com um natimorto e morte dos quatro neonatos entre 14 e 39 dias de idade. O neonato acometido por *Babesia canis* no Espírito Santo tinha 15 dias de vida, e, por isso, é possível que tenha ocorrido transmissão transplacentária neste caso. Contudo, segundo o proprietário, dois carrapatos haviam sido removidos da pele deste filhote dois dias antes da morte, o que nos impede de afirmar que tenha havido transmissão vertical pois não foi possível definir há quanto tempo os ectoparasitas estavam fixados à pele do neonato.

Outra contribuição importante deste estudo para a compreensão das doenças relacionadas a mortalidade fetal e neonatal canina foi o emprego de imuno-histoquímica para a descrição de lesões associadas à migração de larvas de *Toxocara canis* nos órgãos de filhotes de cães. A transmissão transplacentária e transmamária deste helminto é conhecida há várias décadas (Burke e Roberson, 1985; Johnson et al., 1987), assim como seu ciclo com a migração através de fígado, pulmões e outros órgãos, como o sistema nervoso central dos cães, associado a formação de granulomas, mas sem correlacionar a migração larval com doença (Barron e Saunders, 1966). Contudo, não havia até o momento estudos descritivos sobre as lesões produzidas durante a migração das larvas em fetos e neonatos caninos, associadas aos antígenos de *T. canis*, sendo este mais um aspecto inédito deste trabalho.

Nos filhotes analisados por imuno-histoquímica, foi possível detectar antígenos de *T. canis* em espaços porta, em granulomas e áreas de necrose do parênquima hepático principalmente subcapsular, e no interstício pulmonar. Pneumonia intersticial e hepatite portal ocorreram associadas a imunomarcagem positiva nos tecidos dos filhotes desta pesquisa, e foram documentadas em infecção experimental de *T. canis* em camundongos (Resende et al., 2015). Apesar de diversos outros agentes terem o potencial de ocasionar estas lesões em cães (Caswell e Williams, 2016; Cullen e Stalker, 2016), esta é a primeira vez que *T. canis* é apontado como uma possível etiologia de pneumonia e hepatite em casos de morte perinatal na espécie canina.

Em humanos, hepatite granulomatosa devido a migração visceral de larvas de *T. canis* foi associada a infecção por *Staphylococcus* sp. e sepse em crianças (Lambertucci et al., 2001) que foi o gênero bacteriano mais isolado dos fetos e neonatos caninos desta pesquisa.

A positividade em todos os dez filhotes testados pela imuno-histoquímica não surpreende se considerarmos que cerca de 95% da população canina é portadora de *T. canis* (Barriga, 1988; Overgaauw e Knapens, 2013) e que os protocolos convencionais de vermifugação não previnem a transmissão transplacentária e transmamária (Burke e Roberson, 1983).

Lesões degenerativas hepáticas e renais observadas em 20 fetos e 29 neonatos desta pesquisa possivelmente decorreram de hipóxia. Entretanto, sua correlação com a ocorrência de distocia, importante causa de mortalidade perinatal canina (Münnich e Küchenmeister, 2014) não foi possível, porque a evolução dos partos não foi informada na grande maioria dos filhotes encaminhados para necropsia. Todavia, outras lesões, como inflamações, granulomas em fígado e baço, além de hipotrofia muscular, nos natimortos examinados nesta pesquisa, demonstram a ocorrência de doença prévia ao parto.

Por conseguinte, os casos de natimortalidade devem sempre ser investigados por meio de necropsia e exame histopatológico dos natimortos, antes que se possa atribuí-los a asfixia intrauterina por distocia. Ao contrário, fetos debilitados, portadores de lesões e doença, podem ser uma causa de distocia (Luz et al., 2015), e, devido a grande frequência de lesões nos natimortos examinados nesta pesquisa, esta parece ser uma ocorrência frequente.

Portanto, as lesões de hipóxia observadas em natimortos devem ser interpretadas com cautela e, sempre que possível, o exame das placentas deve ser realizado, embora isto seja difícil devido ao hábito das cadelas de ingeri-las logo após sua expulsão (Carmichael e Kenney, 1970), o que impediu a avaliação das placentas neste trabalho.

Os resultados apresentados ressaltam a importância da necropsia na investigação das causas de mortalidade fetal e neonatal canina, assim como a necessidade de realização de exames auxiliares para o diagnóstico dos agentes etiológicos envolvidos, como já destacado por outros autores (Schlafer, 2008; Lamm e Njaa, 2012). A alta frequência de coinfeções observada neste estudo demonstra que a ocorrência de mais de um agente deve sempre ser considerada nos casos de doença em fetos e neonatos caninos, tanto do ponto de vista diagnóstico como terapêutico.

Agentes etiológicos diversos foram identificados por meio dos métodos empregados, alguns poucas vezes considerados em casos de morte fetal e neonatal canina, embora reconhecidos na literatura, como a *Brucella canis*; outros nunca antes documentados na literatura como causa de mortalidade de fetos e neonatos caninos, como *Toxocara canis*, *Babesia canis*, *Acinetobacter baumannii* e *Kluyvera ascorbata*. Contudo, alguns agentes já documentados em fetos e neonatos caninos, como *Neospora caninum* (MacAllister et al., 2016), *Toxoplasma gondii* (Taqes et al., 2016), *Leptospira interrogans* (Graham e Taylor, 2012) e o vírus da cinomose canina (Pandher et al., 2006) não puderam ser pesquisados neste trabalho.

A multiplicidade das possíveis etiologias de doença e morte fetal e neonatal na espécie canina impossibilitam a realização de testes específicos para todos os agentes. Diante desta realidade, a necropsia e o exame histopatológico do filhote fresco, e não congelado, são essenciais na identificação das lesões e no direcionamento dos exames auxiliares que poderão confirmar a precisa etiologia de cada caso. Ainda, a ampla circulação de agentes infecciosos evidencia a precariedade do manejo sanitário na criação de cães de raça.

7. CONCLUSÕES

A mortalidade fetal e neonatal canina está predominantemente relacionada a doenças infecciosas.

Infecções bacterianas oportunistas foram as principais causas de morte identificadas, geralmente ocorrendo em coinfeção com agentes virais e *Brucella* sp.

A brucelose canina revelou-se amplamente disseminada nos plantéis de criação de cães de raça.

A frequência de aborto em ninhadas infectadas com *Brucella* sp. é baixa, grande número de neonatos são positivos, e os filhotes infectados apresentam ampla disseminação de *Brucella* em seus tecidos.

Infecções virais foram diagnosticadas com grande frequência, sempre em associação a infecções bacterianas oportunistas.

A toxocaríase é uma causa de lesões em fetos e neonatos caninos e sua relevância no período fetal e neonatal de cães merece mais pesquisas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L.G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.* v.90, p.553-561, 2002.

ALMES, K.M.; JANARDHAN, K.S.; ANDERSON, J. et al. Fatal canine adenoviral pneumonia in two litters of bulldogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.22, p.780-784, 2010.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v.5, p.403-410, 1990.

AL-QASSAB, S.; REICHEL, M.P.; SU, C. et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Vet. Parasitol.*, v.164, n.2-4, p.335-339, 2009.

ANGEL, M.O.; RISTOW, P.; K O, A.I. et al. Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum population in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v.6, n.9, p.675-679, 2013.

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M. et al. *Toxoplasma gondii*: evidence for the transmission by semen in dogs. *Exp. Parasitol.*, v.123, p.190-194, 2009.

BAGÜÉS, M.P.J.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; DORNAND, J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: Relationship to virulence. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.2429-2433, 2004.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOCKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.95, p.271-275, 1992.

- BANNOEHR, J.; FRANCO, A.; IURESCIA, M. et al. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.*, v.47, p.469-471, 2009.
- BARBER, J.S.; TREES, A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.*, v.28, p.57-64, 1998.
- BARRIGA, O.O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. *Vet. Parasitol.*, v.29, p.195-234, 1988.
- BARRON, C.N.; SAUDERS, L.Z. Visceral larva migrans in the dog. *Path. Vet.*, v.3, p.315-330, 1966.
- BINN, L.N.; LAZAR, E.C.; EDDY, G.A. et al. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.*, v.1, p.503-508, 1970.
- BIRKENHEUER, A.J. Babesiosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p.771-784.
- BODEWES, R.; LAPP, S.; HAHN, K. et al. Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. *Vet. Microbiol.*, v.174, p.1-8, 2014.
- BOGGIATTO, P.M.; GIBSON-CORLEY, K.N.; METZ, K. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.5, n.4, e1019, 2011.
- BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; TONIOLLO, G.H. et al. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. *Vet. Parasitol.*, v.86, p.143-145, 1999.
- BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; TONIOLLO, G.H. et al. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. *Parasitol. Res.*, v.104, p.1213-1217, 2009.
- BRICKER, B.J. Diagnostic strategies used for the identification of Brucella. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.433-4, 2002.
- BRIX, A.E.; HOWERTH, E.W.; MCCONKIE-ROSELL, A. et al. Glycogen storage disease type Ia in two littermate maltese puppies. *Vet. Pathol.*, v.32, p.460-465, 1995.
- BURKE, T.M.; ROBERSON, E.L. Fenbendazole treatment of pregnant bitches to reduce prenatal and lactogenic infections of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum* in pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, p.987-990, 1983.
- BURKE, T.M.; ROBERSON, E.L. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: Experimental infection of the bitch at midpregnancy and at parturition. *Int. J. Parasitol.*, v.15, n.5, p.485-490, 1985.
- CALDOW, G.L.; GRAHAM, M.M. Abortion in foxhounds and a ewe flock associated with *Salmonella* Montevideo infection. *Vet. Rec.*, v.142, p.138-139, 1998.
- CAPONE, V.P.; MORELLO, W.; TARONI, F.; MONTINI, G. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract: The current state of play. *Int. J. Mol. Sci.*, v.18, p.1-14, 2017.
- CARMICHAEL, L.E. Abortion in 200 beagles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.149, p.1126, 1966.

- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.152, n.6, p.605-16, 1968.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine Brucellosis: The clinical disease, pathogenesis and immune response. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.156, p.1726-1734, 1970.
- CARMICHAEL, L.E.; SCHLAFER, D.H.; HASHIMOTO, A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus tipo-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.6, p.165-174, 1994.
- CARMICHAEL, L.E.; SCHLAFER, D.H.; HASHIMOTO, A. Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus. *Cornell Vet.*, v.81, p.151-171, 1991.
- CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A.; KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn puppies. *Am. J. Vet. Res.*, v.26, p.803-14, 1965.
- CARPENTER, J.L.; ROBERTS, R.M.; HARPSTER, N.K.; KING, Jr. N.W. Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a litter of pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.176, n.11, p.1269-1273, 1980.
- CASWELL, J.L.; WILLIAMS, K.J. Respiratory system. In: MAXIE, M.G. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6. ed. Guelph: Elsevier, 2016. p.465-591.
- CAVALCANTE, G.T.; SOARES, R.M.; NISHI, S.M. et.al. Experimental infection with *Neospora caninum* in pregnant bitches. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.21, n.3, p.232-236, 2012.
- CHASTANT-MAILLARD, S.; FREYBURGER, L.; MARCHETEAU, E. et al. Timing of the intestinal barrier closure in puppies. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.190-193, 2012.
- CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.57, p.169-79, 2001.
- CULLEN, J.M.; STALKER, M.J. Liver and biliary system. In: MAXIE, M.G. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6. ed. Guelph: Elsevier, 2016. p.258-352.
- CUTZ, E.; ENHÖRNING, G.; ROBERTSON, B. et al. Effect of surfactant prophylaxis on lung morphology in premature primates. *Am. J. Pathol.*, v.92, n.3, p.581-594, 1978.
- DATZ, C. Parasitic and protozoal diseases. In: PETERSON, M.E.; KUTZLER, M.A. Small animals paediatrics: the first 12 months of life. 1 ed. St. Louis: Saunders, 2011. p.82-87.
- DAY, M. J. Immune System Development in the Dog and Cat. *J.Comp. Path.*, v.137, Suppl.1, n.7, p.10-15, 2007.
- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus – a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.*, v.155, p.1-12, 2012.
- DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Viral reproductive pathogens of dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.42, p.583-598, 2012a.
- DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G. et.al. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*, v.25, p.1161-1166, 2007.

- DECARO, N.; LENOCI, D.; AMORISCO, F. et al. Molecular characterization of Canine minute virus associated with neonatal mortality in a litter of Jack Russell terrier dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.24, n.4, p.755-758, 2012b.
- DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.38, p.799–814, 2008.
- DENTRINGER, C.M.; JACOB, K.; LEE, L.V. et al. Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy. New York City: Zoonoses and Public Health, 2014.
- DINIZ, S.A.; MELO, M.S.; BORGES, A.M.; et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.*, v.42, n.5, p.650-658, 2005.
- DREW, R.A. Possible association between abnormal vertebral development and neonatal mortality in bulldogs. *Vet. Rec.*, v.25, p.480-481, 1974.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its difference from related coccidia. *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.929-946, 2002.
- DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.193, n.10, p.1259-1263, 1988.
- DUBEY, J.P.; KNICKMAN, E.; GREENE, C.E. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs. *Acta Parasitol.*, v.50, n.2, p.176-179, 2005.
- DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p. 806-827.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis in dogs. *Vet. Parasitol.*, v.36, p.147-151, 1990.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.9, p.1578-1579, 1989.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – the last five years. *Vet. Parasitol.*, v.180, p.90-108, 2011.
- DUMON, C. Patologia Neonatal do Filhote. Os primeiros 15 dias. In: PRATS, A. Neonatologia e pediatria: canina e felina. São Caetano do Sul: Interbook, 2005a. p.126-151.
- DUMON, C.; MIMOUNI, P. Herpesvirose. In: PRATS, A. Neonatologia e pediatria: canina e felina. São Caetano do Sul: Interbook, 2005b. p.261-267.
- EISENBERG, T.; HAMANN, H.P.; KAIM, U. et.al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, n.10, p.3753-3755, 2012.
- EMINAGA, S.; PALUS, V.; CHERUBINI, G.B. Minute virus as a possible cause of neurological problems in dogs. *Vet. Rec.*, v.168, p.111–112, 2011.
- ENGLAND, G.C.W.; RUSSO, M. Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology*, v.66, p.1694-1698, 2006.

- ESCOBAR, G.I.; BOERI, E.J.; AYALA, S.M.; LUCERO, N.E. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. *Rev. Argent. Microbiol.*, v.42, n.1, p.35-40, 2010.
- EVANS, J.M. Parental Injuries to Offspring. *Proc. Roy. Soc. Med.*, v.61, n.12, p.32, 1968.
- EVERMANN, J.F.; LEDBETTER, E.C.; MAES, R.K. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.41, p.1097–1120, 2011.
- FAVROT, C.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S.M. et al. Parvovirus infection of keratinocytes as a cause of canine erythema multiforme. *Vet. Pathol.*, v.37, p.647–649, 2000.
- FISHER, E.W. Neonatal diseases of dogs and cats. *Br. Vet. J.*, v.138, p.277-284, 1982.
- FLECHER, M.C.; MUSSO, C.; MARTINS, I.V.F.; PEREIRA, F.E.L. Larval migration of the ascarid nematode *Toxocara canis* following infection and re-infection in the gerbil *Meriones unguiculatus*. *J. Helminthol.*, v.90, p.569-576, 2016.
- FOSSUM, T. W. Thoracic wall and sternum: diseases, disruptions, and deformities. In: BOJRAB, M.J. Disease mechanisms in small animal surgery. Malvern: Lea e Febiger. 1993. p.411-416.
- FRESHMAN, J.L. Pregnancy loss in the bitch. In: BONAGURA, J.D.; TWEDT, D.C. Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. 14. ed. St. Louis: Saunders, 2009. p.986-989.
- FUKUMOTO, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; XUAN, X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int. J. Parasitol.*, v.35, p. 1031-1035, 2005.
- GADSDEN, B.J.; MAES, R.K.; WISE, A.G. et al. Fatal canid herpesvirus 1 infection in an adult dog. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.24, n.4, p.604-607, 2012.
- GARCIA-PATIÑO, M.G.; GARCIA-CONTRERAS, R.; LICONA-LIMÓN, P. The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial infections. *Front. Microbiol.*, v.8, p.1-10, 2017.
- GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, v.70, n.3, p.270-85, 2008.
- GRAHAM, E.M.; TAYLOR, D.J. Bacterial reproductive pathogens of cats and dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.42, p.561-582, 2012.
- GRECO, D.S. Congenital and inherited renal disease of small animals. *Clin. Therio.*, v.31, n.2, p.393-399, 2001.
- GREENE, C.E. Canine herpesvirus infection. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012a. p.48-54.
- GREENE, C.E. Enteric bacterial infections. Salmonellosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012b. p.383-398.
- GREENE, C.E.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p.398-411.
- GREENE, C.E.; DECARO, N. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p.67-80.

- GREENE, C.E.; PRESCOTT, J.F. Streptococcal infections. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p.325-333.
- GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p.25-42.
- GROPETTI, D.; PECILE, A.; BARBERO, C.; MARTINO, P.A. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility. *Theriogenology*, v.77, p.1549-1556, 2012.
- HARRISON, L.R.; STYER, E.L.; PURSELL, A.R. et al. Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.4, p.19-22, 1992.
- HASHIMOTO, A. Canine parvovirus type-1 (MVC): Pathomorphological studies on the experimentally infected fetus and MVC-infected cultured cells. New York City, 1999. Disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/Baker_Can_Inf_Dis/vdb31/IVIS.pdf>. Acessado em: 15 fev. 2015.
- HECKEROTH, A.R.; TENTER, A.M. Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.*, v.100, p.837-846, 2007.
- HOLLETT, R.B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, v.66, p.575-587, 2006.
- HOLST, B.S.; LÖFQVIST, K.; ERNHOLM, L. et al. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Vet. Scan.*, v.54, p.18-27, 2012.
- HORSTER, M.; KEMLER, B.J.; VALTIN, H. Intracortical distribution of number and volume of glomeruli during postnatal maturation in the dog. *J. Clin. Invest.*, v.50, p.796-800, 1971.
- HULLINGER, G.A.; HINES II, M.E.; STYER, E.L. et al. Pseudocyttoplasmic inclusions in tongue epithelium of dogs with canine parvovirus-2 infections. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.10, p.108-111, 1998.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses 2003. Paris: Virus Taxonomy, 2003. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/proposals/2003.V070-074.Parvoviridae.pdf>>. Acessado em 20 fev. 2015.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses 2013. Edinburgh: Virus Taxonomy, 2013. Disponível em <<http://www.ictvonline.org/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf>>. Acessado em 20 fev. 2015.
- INDREBO, A.; TRANGERUD, C.; MOE, L. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Vet. Scand.*, v.49 (Suppl. I), p.1-11, 2007.
- JAMES, D.R.; GOLOVSKY, G.; THORNTON, J.M. et al. Clinical management of *Brucella suis* infection in dogs and implications for public health. *Aust. Vet. J.*, v.95, p.19-25, 2017.
- JÄRPLID, B.; JOHANSSON, H.; CARMICHAEL, L.E. A fatal case of pup infection with minute virus of canines (MVC). *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.8, p.484-497, 1996.
- JOHNSON, C.A.; GRACE, J.A.; PROBST, M.R. The effect of maternal illness on perinatal health. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.17, n.3, p.555-566, 1987.

- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. The Neonate From Birth to Weaning. In: *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: Saunders, 2001. p.146-167.
- JOHNSTON, S.D.; RAKSIL, S. Fetal loss in the dog and cat. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.17, n.3, p.535-554, 1987.
- KADEN, R.; AGREN, J.; BAVERUD, V. et al. Brucellosis outbreak in a Swedish kennel in 2013: Determination of genetic markers for source tracing. *Vet. Microbiol.*, v.174, p.523–530, 2014.
- KAWAKAMI, K.; OGAWA, H.; MAEDA, K. et al. Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, p.1176–1181, 2010.
- KEID, L.B.; CHIEBAO, D.P.; BATINGA, M.C.A. et al. *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.*, no prelo, 2017.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; MORAIS, Z.M. et al. *Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.35, p.161-166, 2004.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; CHIEBAO, D.P. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, v.68, n.9, p.1260-1270, 2007a.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res. Vet. Sci.*, v.86, n.1, p.22-26, 2009.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VIEIRA, N.R. et al. Diagnosis of canine brucellosis: Comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Vet. Res. Commun.*, v. 31, p. 951–965, 2007b.
- KISHNANI, P.S.; FAULKNER, E.; VANCAMP, S. et al. Canine model and genomic structural organization of glucogen storage disease type Ia (GSD Ia). *Vet. Pathol.*, v.38, p.83-91, 2001.
- KLEIN, R.P.; LOURENÇO, M.L.G.; MOUTINHO, F.Q. et al. Imunidade celular em neonatos caninos – do nascimento ao 45º dia de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.745-756, 2014.
- KOENIG, A. Gram-negative bacterial infections. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog and the cat*. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p.349-359.
- KONEMAN, E.W. *Diagnostic microbiology*. 5ed. Philadelphia: LIPPINCOTT, 1997.
- KORNBLATT, A.N.; ADAMS, R.L.; BARTHOLD, S.W.; CAMERON, G.A. Canine neonatal deaths associated with group B streptococcal septicemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, n.6, p.700-701, 1983.
- KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet. Pathol.*, v.51, p.527-538, 2014.
- KRAKOWKA, S.; HOOVER, E.A.; KOESTNER, A.; KETRING, K. Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, n.7, 919-22, 1977.

- KRUEGER, W.S.; LUCERO, N.E; BROWER, A. et al. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. *Zoonoses Public Health*, v.61, p.509–518, 2014.
- KUL, O.; ATMACA, H.T.; ANTEPLIOGLU, T. et al. *Neospora caninum*: the first demonstration of the enteroepithelial stages in the intestines of a naturally infected dog. *J. Comp. Pathol.*, v.153, p.9-13, 2015.
- KUSTRITZ, M.V.R. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology*, v.64, p.755-765, 2005.
- LAMBERTUCCI, J.R.; RAYES, A.A.; SERUFO, J.C.; NOBRE, V. Pyogenic abscesses and parasitic diseases. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.43, p.67-74, 2001.
- LAMM, C.G.; FERGUSON, A.C.; LEHENBAUER, T.W. et al. Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. *Vet. Pathol.*, v.47, n.3, p.387-395, 2010.
- LAMM, C.G.; NJAA, B.L. Clinical approach to abortion, stillbirth, and neonatal death in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.42, p.501-513, 2012.
- LARSEN, R.W.; KIUPEL, M.; BALZER, H.J. et al. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta Vet. Scand.*, v.57, n.1, p.1-7, 2015.
- LAU, S.K.; WOO, P.C.; YEUNG, H.C. et al. Identification and characterization of bocaviruses in cats and dogs reveals a novel feline bocavirus and a novel genetic group of canine bocavirus. *J. Gen. Virol.*, v.93, p.1573-1582, 2012.
- LEDBETTER, E.C.; KIM, S.G.; DUBOVI, E.J. Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. *Vet. Ophthalmol.*, v.12, p.242–247, 2009a.
- LEDBETTER, E.C.; LANDRY, M.P.; STOKOL, T. et al. *Brucella canis* endophthalmitis in 3 dogs: clinical features, diagnosis, and treatment. *Vet. Ophthalmol.*, v.12, n.3, p.183–191, 2009b.
- LEMONS, T.D.; CERQUEIRA, A.M.F.; TOMA, H.K. et al. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.21, n.2, p.137-142, 2012.
- LENGHAUS, C.; STUDDERT, M.J. Generalized parvovirus disease in neonatal pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.181, n.1, p.41-45, 1982.
- LENGHAUS, C.; STUDDERT, M.J.; FINNIE, J.W. Acute and chronic canine parvovirus myocarditis following intrauterine inoculation. *Aust. Vet. J.*, v.56, p.465-468, 1980.
- LOURENÇO, M.L.G.; MACHADO, L.H.A. Características do período de transição fetal-neonatal e particularidades fisiológicas do neonato canino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37, n.4, p.303-308, 2013.
- LOUW, G.J. Osteochondrodysplasia in a litter of bulldog puppies. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.54, n.2, p.129-131, 1983.
- LOWRY, J.E.; LEONHARDT, J.A.; YAO, C. et al. Infection of C57BL/6 mice by *Trypanosoma musculi* modulates host immune responses during *Brucella abortus* cocolonization. *J. Wildl. Dis.* v.50, n.1, p.11-20, 2014.

- LUCERO, N.E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M.N. et al. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiol. Infect.*, v.138, p.280-285, 2010.
- LÚCIO, C.F.; SILVA, L.C.G.; RODRIGUES, J.A. et al. Acid-base changes in canine neonates following normal birth or distocia. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, p.208-210, 2009.
- LUZ, M.R.; MÜNNICH, A.; VANNUCCHI, C.I. Novos enfoques na distocia em cadelas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.39, p.354-361, 2015.
- MACALLISTER, M.M.; FUNNEL, O.; DONAHOE, S.L.; SLAPETA, J. Unusual presentation of neosporosis in a neonatal puppy from a litter of bulldogs. *Aust. Vet. J.*, v. 94, n.11, p.411-414, 2016.
- MACARTNEY, L.; PARRISH, C.R.; BINN, L.N. et al. Characterization of minute virus of canines (MVC) and its pathogenicity for pups. *Cornell Vet.*, v.78, p.131-145, 1988.
- MAKLOSKI, C.L. Canine brucellosis management. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.41, n.6, p.1209-19, 2011.
- MANKTELOW, B.W.; BASKERVILLE, A. Respiratory distress syndrome in newborn puppies. *J. Small Anim. Pract.*, v.13, p. 329-332, 1972.
- MANTEUFEL, J.; TRUYEN, U. Animal bocaviruses: a brief review. *Intervirology*, v.51, p.328-334, 2008.
- MATSUI, T.; MATSUMOTO, J.; KANNO, T. et al. Intranuclear inclusions in the stratified squamous epithelium of the tongue in dogs and cats with parvovirus infection. *Vet. Pathol.*, v.30, p.303-305, 1993.
- MELONI, T.; MARTINO, P.A.; GRIECO, V. et al. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. *Vet. Ital.*, v.50, n.4, p.293-299, 2014.
- MILA, H.; FEUGIER, A.; GRELLET, A. et al. Inadequate passive immune transfer in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Prev. Vet. Med.*, v. 116, p. 209-213, 2014.
- MILANI, C.; CORRÒ, M.; DRIGO, M.; ROTA, A. Antimicrobial resistance in bacteria from breeding dogs housed in kennels with differing neonatal mortality and use of antibiotics. *Theriogenology*, v.78, p.1321-1328, 2012.
- MILLER, M.A.; BURGESS, T.L.; DODD, E.M. et al. Isolation and characterization of a novel marine *Brucella* from a southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*), Califórnia, USA. *J. Wild. Dis.*, v.53, n.2, p.215-227, 2017.
- MIYOSHI, M.; ISHII, Y.; TAKIGUCHI, M. et al. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v.61, n.4, p.375-379, 1999.
- MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAJIMA, T. et al. Virologic and Serologic Identification of Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus Type 1) from Dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.11, p.3993-3998, 2002.
- MOL, J.P.S.; FRANÇA, S.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.19, p.117-126, 2012.

- MOODLEY, A.; DAMBORG, P.; NIELSEN, S.S. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: literature review from 1980 to 2013. *Vet. Microbiol.*, v. 171, n.3-4, p.337-41, 2014.
- MOORE, J.A.; KAKUK, T.J. Male Dogs Naturally Infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.155, p.1352-1358, 1969.
- MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.*, v.5, p.213-230, 2014.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.209-227, 2002.
- MORLEY, P.S.; STROHMEYER, R.A.; TANKSON, J.D. et al. Evaluation of the association between feeding raw meat and *Salmonella enterica* infections at a Greyhound breeding facility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.228, n.10, p.1524-1532, 2006.
- MORRIS, J.A.; HARRISON, L.M.; PARTRIDGE, S.M. Practical and theoretical aspects of postmortem bacteriology. *Curr. Diagn. Pathol.*, v.13, p.65-74, 2007.
- MORSE, E.V.; DUNCAN, M.A.; ESTEP, D.A. et al. Canine Salmonellosis: A Review and Report of Dog to Child Transmission of *Salmonella enteritidis*. *Am. J. Public Health*, v.66, n.1, p.82-84, 1976.
- MÜNNICH, A. The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Vet. Res. Commun.*, v.32, Suppl.1, p.81-85, 2008.
- MÜNNICH, A.; LÜBKE-BECKER, A. *Escherichia coli* infections in newborn puppies—clinical and epidemiological investigations. *Theriogenology*, v.62, p.562-575, 2004.
- MÜNNICH, A.; KÜCHENMEISTER, U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reprod. Dom. Anim.*, v.49, Suppl.2, p.64-74, 2014.
- MÜNNICH, A.; KÜCHENMEISTER, U. Distocia in numbers – evidence-based parameters for intervention in the dog: causes for dystocia and treatment recommendations. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, p.141-147, 2009.
- NIELEN, A.L.J.; VAN DER GAAG, I.; KNOL, B.W.; SCHUKKEN, Y.H. Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. *Vet. Rec.*, v.142, p.602-606, 1998.
- OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L.; JÚNIOR, P.S.B. et al. Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. *Pesq. Vet. Bras.*, v.29, n.8, p.637-642, 2009.
- OLSEN, S.C.; PALMER, M.V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Vet. Pathol.*, v.51, n.6, p.1076-1089, 2014.
- OHSHIMA, T.; KAWAKAMI, K.; ABE, T. et al. A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.334-338, 2010.
- ÖNCEL, E.K.; ÖZSÜREKCI, Y.; AKYÖN, Y. et al. *Kluyvera ascorbata* infections in children: a case series. *Turk. Arch. Pediatrics*, v.50, p.123-8, 2015.

- OVERGAAUW, P.A.M.; VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet. Parasitol.*, v.193, p.398-403, 2013.
- OZKARAKA, M.; CERIBASI, S.; CERIBASI, A.O. The role of apoptosis and autophagy in bovine abortions associated with *Brucella* spp. *Acta Vet. Beograd.*, v.66, n.1, p.37-50, 2016.
- PANDHER, K.; PODELL, B.; GOULD, D. H. et al. Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.18, p.201-204, 2006.
- PANGRAZIO, K.K.; COSTA, E.A.; AMARILLA, S.P. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet. Parasitol.*, v.165, p.327-331, 2009.
- PARKASH, A.; HAIDER, N.; KHOSO, Z.A.; SHAIKH, A.S. Frequency, causes and outcome of neonates with respiratory distress admitted to neonatal intensive care unit, National Institute of Child Health, Karachi. *J. Pak. Med. Assoc.*, v.65, n.7, p.771-775, 2015.
- PERCY, D.H.; CARMICHAEL, L.E.; ALBERT, D.M. et al. Lesions in Puppies Surviving Infection with Canine Herpesvirus. *Vet. Pathol.*, v.8, p.37-53, 1971.
- PERCY, D.H.; MUNNEL, J.F.; OLANDER, H.J. et al. Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.31, n.1, p.145-156, 1970.
- PETERSON, M.E. Neonatal mortality. In: PETERSON, M.E.; KUTZLER, M.A. Small animals paediatrics: the first 12 months of life. 1. ed. St. Louis: Saunders, 2011. p.82-87.
- PHILBEY, A.W.; MATHER, H.A.; GIBBONS, J.F. et al. Serovars, bacteriophage types and antimicrobial sensitivities associated with salmonellosis in dogs in the UK (1954–2012). *Vet. Rec.*, v.174, p.94, 2014.
- PHUA, Y.L.; HO, J. Renal dysplasia in the neonate. *Curr. Opin. Pediatr.*, v.28, n.2, p.209-215, 2016.
- PIAMPIANO, P.; MCLEARY, M.; YOUNG, L.W. et al. Brucellosis: unusual presentations in two adolescent boys. *Pediatr. Radiol.*, v.30, p.355-357, 2000.
- PICKERILL, P.A.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis: Control programs in commercial kennels and effect on reproduction. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.160, n.12, p.1607-15, 1972.
- PICUT, C.A.; LEWIS, R.M. Microscopic features of canine renal dysplasia. *Vet. Pathol.*, v.24, p.156-163, 1987.
- PIRES, S.P.C. *Investigação da expansão geográfica da leishmaniose visceral americana por meio de inquérito de infecção canina em áreas receptoras no estado do Espírito Santo, Brasil*. 2015. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N. A.; OWE, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-156, 1989.
- PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; TEPESTA M. et al. Fatal canine parvovirus type-1 infection in pups from Italy. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.11, p.365-367, 1999.

- PRATELLI, A.; MOSCHIDOU, P. Host range of canine minute virus in cell culture. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.24, n.5, p.981-985, 2012.
- PRATS, A. Período de transição. In: PRATS, A. Neonatologia e Pediatria: canina e felina. São Caetano do Sul: Interbook, 2005a. p.42-47.
- PRATS, A. Período neonatal. In: PRATS, A. Neonatologia e Pediatria: canina e felina. São Caetano do Sul: Interbook, 2005b. p.30-41.
- PRETZER, S.D. Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. *Theriogenology*, v.70, p.320–326, 2008a.
- PRETZER, S.D. Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*. v.70, p.300-303, 2008b.
- RANDALL, G.C.B. Perinatal mortality: Some problems of adaptation at birth. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.22, p.53-81, 1978.
- REGAZZI, F.M. *Modificações pulmonares morfológicas e funcionais de neonatos da espécie canina em resposta à corticoterapia pré-natal*. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- REIS, R.P.C.; CRISMAN, R.; ROSER, M. et al. Neonatal neosporosis in a 2-week-old bernese mountain dog infected with multiple *Neospora caninum* strains based on MS10 microsatellite analysis. *Vet. Parasitol.*, v.221, p.134-138, 2016.
- RESENDE, N.M.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; BARBOSA, F.S. et.al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasit. Vectors*, v.8, n.354, p.1-11, 2015.
- ROBINSON, W.F.; HUXTABLE, C.R.; PASS, D.A. Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. *Vet. Pathol.*, v.17, p.282-293, 1980.
- RONSSSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K. et al. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*, v.61, n.4, p.619-36, 2004.
- RONSSSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E. et al. Canine Herpesvirus-1 (CHV-1): Clinical, serological and virological patters in breeding colonies. *Theriogenology*, v.64, p.61-74, 2005.
- ROTA, A.; MILANI, C.; DRIGO, I. et al. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from breeding dogs. *Theriogenology*, v.75, p.115-121, 2011.
- SAHIN, O.; BURROUGH, E.R.; PAVLOVIC, N. et al. *Campylobacter jejuni* as a cause of canine abortions in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.26, n.5, p.699–704, 2014.
- SAIJONMAA-KOULUMIES, L.E.; LLOYD, D.H. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Dermatol.*, v.13, p.123-130, 2002.
- SANTOS, R.L.; PEIXOTO, M.T.D.; SERAKIDES, R. et.al. Detección de *Brucella abortus* (muestra D19) por el complejo inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa en él testículo y en él epidídimo de bovinos inoculados experimentalmente. *Archiv. Reprod. Animal*, v.6, p.34-41, 1998.

- SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M. et al. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella Typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.*, v.39, n.2, p.200-215, 2002.
- SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y. et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, p.2770-2778, 2007.
- SCHÄFER-SOMI, S.; SPERGSEER, J.; BREITENFELLNER, J.; AURICH, J.E. Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies - a retrospective study. *J. Vet. Med.*, v.50, p.343-346, 2003.
- SCHLAFER, D.H. Canine and feline abortion diagnostics. *Theriogenology*, v.70, p.327-331, 2008.
- SCHOTTE, U.; BORCHERS, D.; WULFF, C. et al. *Salmonella* Montevideo outbreak in military kennel dogs caused by contaminated commercial feed, which was only recognized through monitoring. *Vet. Microbiol.*, v.119, p.316-323, 2007.
- SCHWARTZ, D.; GREEN, B.; CARMICHAEL, L.E.; PARRISH, C.R. The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology*, v.302, p.219-223, 2002.
- SCHOLZ, H.C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S., DAHOUK, S. et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.66, p. 2090-2098, 2016.
- SHAH, B.A.; PADBURY, J.F. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence*, v.5, n.1, p.170-178, 2014.
- SILVA, F.L.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.160, n.1-2, p.55-9, 2009a.
- SILVA, F.L., RODRIGUES, A.A., REGO, I.O. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v.151, p.86-90, 2008.
- SILVA, L.C.G.; LÚCIO, C.F.; VEIGA, G.A.L. et al. Neonatal clinical evaluation, blood gas and radiographic assessment after normal birth, vaginal dystocia or caesarean section in dogs. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, p. 160-163, 2009b.
- SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M.; RIBEIRO, R.R. et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.166, n.1-2, p.159-62, 2009c.
- SILVA, L.G.; PORTARI, G.V.; LÚCIO, C.F. et al. The influence of the obstetrical condition on canine neonatal pulmonary functional competence. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, v.25, n.6, p.725-730, 2015.
- SILVERSTEIN, D.; OTTO, C.M. Sepsis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and the cat. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2012. p. 359-369.
- SIPRIANI, T.M.; GRANDI, F.; SILVA, L.C. et al. Pulmonary maturation in canine foetuses from early pregnancy to parturition. *Reprod. Domest. Anim.*, v.44, suppl.2, p.137-140, 2009.

- SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M.A.; RUBIN, J.E.; CHURCH, D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.85, n.4, p.471-6, 2016.
- SPALDING, V.T.; HUDD, H.K.; LANGMAN, B.A. et al. Isolation of C.V.H. from puppies showing the "fading puppy" syndrome. *Vet. Rec.*, v.76, p.1402-1403, 1964.
- STROTTMANN, D.M.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L.C. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural*, v.38, n.2, p.400-405, 2008.
- TAQUES, I.I.G.G.; BARBOSA, T.R.; MARTINI, A.C. et al., Molecular assessment of the transplacental transmission of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella canis* and *Ehrlichia canis* in dogs. *Com. Im. Microbiol. Inf. Dis.*, v.49, p.47-50, 2016.
- TØNNESEN, R.; BORGE, K.S.; NØDTVEDT, A.; INDREBØ, A. Canine perinatal mortality: A cohort study of 224 breeds. *Theriogenology*, v.77, p.1788–1801, 2012.
- TURCHETTI, A.P.; DA COSTA, L.F.; ROMÃO, E.L. et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.163, p.67-76, 2015.
- TURCHETTI, A.P.; SOUZA, T.D.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v.8, p.403-407, 2014.
- TURCHETTI, A.P.; TINOCO, H.P.; MALTA, M.C.C. et al. Inclusion body disease in a *Corallus hortulanus*. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.6, n.1, p.15-18, 2013.
- UZAL, F.A.; PLATTNER, B.L.; HOSTETTER, J.M. Alimentary system. In: MAXIE, M.G. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6. ed. Guelph: Elsevier, 2016. p.1-257.
- VANNUCCHI, C.I.; KISHI, D.; REGAZZI, F.M. et al. The oxidative stress, antioxidante profile and acid-base status in pre-term and term neonates. *Reprod. Dom. Anim.*, v.50, p.240-246, 2015.
- VANNUCCHI, C.I.; REGAZZI, F.M.; BARBOSA, M.M.M. et al. Corisol profile and clinical evaluation of canine neonates exposed antenatally to maternal corticosteroid treatment. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.173-176, 2012a.
- VANNUCCHI, C.I.; SILVA, L.C.G.; LÚCIO, C.F. et al. Prenatal and neonatal adaptations with a focus on the respiratory system. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.177-181, 2012b.
- VELA, A.I.; FALSEN, E.; SIMARRO, I. et al. Neonatal mortality in puppies due to bacteremia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.2, p.666–668, 2006.
- VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. *Theriogenology*, v.70, p.304–319, 2008.
- VON DEHN, B. Pediatric clinical pathology. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.44, p.205-219, 2014.

- VRECENAK, J.D.; PEARSON, E.G.; SANTORE, M.T. et al. Stable long-term mixed chimerism achieved in a canine model of allogenic in utero hematopoietic cell transplantation. *Blood*, v.124, n.12, p.1987-1995, 2014.
- WALLACH, J.C.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; BALDI, P.C.; FOSSATI, C.A. Human Infection with M- Strain of *Brucella canis*. *Emerg. Infect. Dis.*, v.10, n.1, p.146-148, 2004.
- WANKE, M.M. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.195-207, 2004.
- WARETH, G.; MELZER, F.; EL-DIASTY, M. et al. Isolation of *Brucella abortus* from a dog and a cat confirms their biological role in re-emergence and dissemination of bovine brucellosis on dairy farms. *Transbound. Emerg. Dis.*, no prelo, 2016.
- WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A. et.al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.64, p.4120-4128, 2014.
- WOLDEMESKEL, M.; LIGGETT, A.; ILHA, M. et al. Canine parvovirus-2b-associated erythema multiforme in a litter of English Setter dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.23, n.3, p.576-580, 2011.
- WRIGHT, J.D.; TENGELSEN, L.A.; SMITH, K.E. et al. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium in Four Animal Facilities. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, n.8, p.1235-1241, 2005.
- XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc. Rural*, v.39, n.7, p.2252-2260, 2009a.
- XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.*, v.140, p.149-157, 2009b.
- YOUNG, C.N.; HALDORSON, G.; MEMON, M.A. Diagnosis of canine and feline neonatal death: a retrospective study of 107 cases (2000-2010). *Clin. Therio.*, v.7, n.1, p.53-58, 2015.
- ZOHA, S. J.; CARMICHAEL, L. E. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). *Vet.Microbiol.*, v.7, p.35-50, 1982.

9. ANEXO



CARTA AO CRIADOR DE CÃES

PESQUISA SOBRE MORTALIDADE DE FILHOTES DE CÃES

ORIENTAÇÕES GERAIS

Estudos realizados nos EUA, Europa e Brasil indicam que cerca de 30% dos filhotes de cães morrem antes do desmame. Estudos amplos sobre as causas destas mortes ainda não foram realizados no Brasil. A partir desses estudos, será possível prevenir as doenças e tratar de forma mais eficiente os filhotes enfermos.

O nascimento e a criação de filhotes são o objetivo e o grande desafio dos canis. O óbito de filhotes de uma ninhada ocasiona a redução da oferta de filhotes desmamados, com conseqüente perda econômica, e muitas vezes um grande abalo emocional para o criador, além de uma perda genética irreparável. A identificação e quantificação destas perdas e suas causas é essencial para indicar focos de investigação científica em neonatologia canina e para o desenvolvimento de medidas preventivas e de controle para promover a saúde e sobrevivência dos filhotes de cães.

Convidamos você *criador* de cães a cooperar em nossa pesquisa com o preenchimento de um questionário e de fichas de ninhadas com informações sobre o número de filhotes nascidos em sua criação. A identidade dos canis será mantida em sigilo. Ao se cadastrar, cada canil será identificado com um número, e apenas a coordenadora da pesquisa, Profa. Tayse Domingues de Souza, terá acesso a identidade de cada canil. O maior número possível de criadores cadastrados e de ninhadas relatadas, assim como a veracidade das informações apresentadas, são de fundamental importância para a relevância e confiabilidade das conclusões que serão alcançadas. As conclusões da pesquisa serão informadas aos criadores participantes, assim como sugestões para a redução da mortalidade neonatal.

Para a participação na pesquisa, deverão ser informados todos os nascimentos e óbitos de filhotes que ocorrerem no plantel até agosto de 2016. Caso ocorram mortes de filhotes com até 3 semanas de idade, cada filhote morto deverá ser acondicionado em uma sacola plástica (fornecida pela pesquisa), em caixa de isopor com adequada quantidade de gelo, e logo encaminhado para exame juntamente com as informações sobre o filhote morto, descritas na ficha de ninhada. É importante que sejam informadas todas as ninhadas nascidas no período, para o cálculo da taxa de mortalidade. Os filhotes mortos serão analisados através da realização de necropsia e exames laboratoriais.

Contando com sua participação, agradecemos a atenção dispensada!

Equipe do Projeto Cinofilia em Foco



UNIVERSIDADE
VILA VELHA
ESPÍRITO SANTO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto de pesquisa:

Diagnóstico de doenças relacionadas a mortalidade fetal e neonatal canina.

Pesquisadores responsáveis:

Doutoranda: Tayse Domingues de Souza - Doutorado em Ciência Animal -
Escola de Veterinária - UFMG / Professora do Curso de Medicina Veterinária - UVV

Orientador: Prof. Renato de Lima Santos - Professor Titular do Departamento
de Clínica e Cirurgia Veterinárias - Escola de Veterinária - UFMG

Co-orientadores: Prof^ª. Tatiane Alves da Paixão - Professora adjunta do
Departamento de Patologia Geral - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Prof. Marcos Brian Heinenmann - Professor adjunto da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia - USP

Colaborador: Prof. Fernando Luiz Tobias - Professor adjunto do Curso de
Medicina Veterinária - UVV

Instituições:

Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Departamento
de Clínica e Cirurgia Veterinárias - Setor de Patologia Animal. Endereço: Av. Antônio
Carlos, 6627 - Campus Pampulha, CEP 31270-901, Caixa Postal 567, Belo Horizonte -
MG

Universidade Vila Velha - Curso de Medicina Veterinária - Hospital Veterinário
Prof. Ricardo Alexandre Hippler - Laboratório de Patologia Animal e Microbiologia
Veterinária. Endereço: Rua Annor da Silva, s/n, bairro Boa Vista, Vila Velha-ES.



UNIVERSIDADE
VILA VELHA
ESPÍRITO SANTO



Local da coleta de dados:

Canis de criação de cães de raça localizados no estado do Espírito Santo e filiados a Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC).

Serão cadastrados para participação na pesquisa canis de criação de cães de raça filiados a CBKC e localizados em diferentes municípios do Estado do Espírito Santo, tanto na região metropolitana de Vitória (Vitória, Vila Velha, Guarapari, Serra, Cariacica), como também em Cachoeiro do Itapemirim, Marataízes, Domingos Martins, Santa Teresa, Aracruz, Linhares, São Mateus. As necropsias e exames microbiológicos serão realizados nos laboratórios da Universidade Vila Velha, em Vila Velha, ES. As análises moleculares serão desenvolvidas no Laboratório de Patologia Molecular da UFMG, em Belo Horizonte, MG.

A mortalidade perinatal na espécie canina ocorre em taxas elevadas. Estima-se que 30% dos filhotes de cães morram antes do desmame. As enfermidades fetais e neonatais caninas relacionadas a mortalidade incluem doenças infecciosas (bacterianas, virais, e parasitárias), traumas, agressões ambientais (hipotermia/hipertermia), distúrbios nutricionais (hipoglicemia, hipo e hipervitaminoses), doenças genéticas, desordens tóxicas e malformações idiopáticas. Algumas destas enfermidades, com a brucelose e a salmonelose, podem representar risco zoonótico para o criador e seus funcionários.

O objetivo geral deste projeto é realizar um estudo descritivo longitudinal da ocorrência de mortalidade de fetos e neonatos caninos, no período perinatal e neonatal tardio, em canis de criação de cães de raça, e descrição dos seus aspectos anatomopatológicos, epidemiológicos e etiológicos. Fetos e neonatos caninos mortos, acometidos por doenças espontâneas nestes canis, serão analisados através de necropsia completa, exames histopatológico, bacteriológico e molecular.

A participação dos criadores de cães na pesquisa consistirá na cooperação na investigação de casos de mortalidade fetal e neonatal ocorridos em ninhadas de sua criação, com:

1. Preenchimento do questionário de informações sobre o manejo de criação e constituição do plantel.
2. Preenchimento de fichas de acompanhamento de ninhadas com informações sobre o parto, número de filhotes nascidos, ocorrência de mortalidade e os pais da ninhada.



UNIVERSIDADE
VILA VELHA
ESPÍRITO SANTO



3. Acondicionamento adequado (em saco plástico e isopor com gelo) e encaminhamento de filhotes mortos para exame no Laboratório de Patologia Veterinária da UVV, juntamente com o questionário sobre o histórico do(s) filhote(s) encaminhado(s) (ficha de anamnese).

Em contrapartida, serão apresentadas aos criadores palestras técnicas sobre temas relacionados a criação de cães, os achados anatomopatológicos observados nos filhotes examinados serão comunicados confidencialmente em até 48h após a realização da necropsia, assim como os resultados finais da pesquisa.

O projeto de pesquisa descrito acima foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG que funciona na Unidade Administrativa II, Sala 2005, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-90, Belo Horizonte – MG, coep@prpq.ufmg.br

Os criadores cadastrados na pesquisa receberão uma cópia do projeto de pesquisa e deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde constam os telefones, endereços eletrônicos e o endereço institucional dos pesquisadores responsáveis, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, caso seja necessário.

Eu, Tayse Domingues de Souza, aluna de doutorado responsável pelo desenvolvimento do projeto de pesquisa aqui descrito, declaro ter informado aos criadores sobre a sua participação no projeto de pesquisa em questão.

Eu, _____, criador de cães de raça e membro da CBKC, declaro ter sido informado, concordo com a participação no projeto de pesquisa em questão e comprometo-me em fornecer as informações, preencher os questionários e doar os filhotes mortos, necessários para o desenvolvimento deste estudo.

Local e data:

_____, _____ de _____ de 2014.

Assinaturas:

FICHA DE CADASTRO DO CANIL¹

Nome do canil: _____

Raças criadas: _____

Nome do(s) criador(res): _____

Contato: _____

Número total de cães no plantel: _____ (adultos: _____; filhotes: _____)

Raça 1. Número de Matrizes: _____ de Padreadores: _____

Raça 2. Número de Matrizes: _____ de Padreadores: _____

Raça 3. Número de Matrizes: _____ de Padreadores: _____

Raça 4. Número de Matrizes: _____ de Padreadores: _____

Expectativa de ninhadas nos próximos 12 meses? ()sim ()não. Quantas? _____

Realiza quarentena ou exames antes de introduzir cães no plantel? ()sim ()não. Quantos dias? _____

Alimentação: ()comida caseira ()fórmula natural ()mista ()ração comercial.Qual? _____

Vacinação? Descrever o protocolo de vacinação e citar as vacinas:
adultos: _____

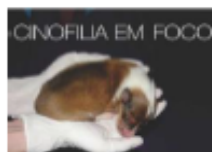
filhotes: _____

Vermifugação? Descrever o protocolo e citar os produtos utilizados:

Controle de pulgas, carrapatos e mosquitos? Descrever o protocolo e citar os produtos utilizados:

Limpeza e desinfecção: Descrever a maneira e frequência que é realizada e citar os produtos utilizados:

¹ Estas informações são sigilosas e servirão tão somente para o contato com o criador e a interpretação dos resultados, orientando no delineamento das sugestões para redução da mortalidade dos filhotes.



Orientações para participação na pesquisa

Filhotes que venham a óbito e placentas poderão ser coletados para análise.

➤ Como encaminhar as amostras para diagnóstico

1. ANTES DO PARTO

- Preencher a ficha de cadastro e o questionário.
- Assinar o “termo de concordância”.
- Receber o kit para coleta de amostras (isopor, sacolas plásticas, gelo reciclável).
- Informar a previsão de nascimento de ninhadas.
- Antes do parto, manter o gelo no freezer acondicionado em sacolas limpas.

2. DURANTE E APÓS O PARTO

- Realizar a coleta de placentas ou filhotes mortos, acondicioná-los imediatamente nos frascos ou sacos plásticos, em isopor. **NÃO COLOCAR EM REFRIGERADOR JUNTO DE ALIMENTOS, POIS PODEM SER FONTE DE DOENÇAS.**
- Preencher a ficha de acompanhamento de ninhada.
- Informar o mais rápido possível a disponibilidade de amostras para análise (PLACENTAS OU FILHOTES). Contatos: (27) 99949-6549 (tim) / 99226-3477 (claro) / 99514-0784 (vivo) / 3242-2333 (oi fixo).
- Encaminhar as amostras coletadas junto com a ficha de acompanhamento da ninhada, resfriadas no isopor com gelo, o mais rápido possível, para o Hospital Veterinário da UVV.

As análises serão realizadas em 3 etapas:

- Exame macroscópico e microbiológico: realizados logo após o recebimento de amostras frescas. Resultado preliminar encaminhado para o email do proprietário cadastrado em até 48h após o recebimento de amostras frescas*.
- Exame microscópico: requer processamento das amostras para análise histopatológica. Resultados encaminhados para o email do proprietário cadastrado em até 40 dias.
- Análises moleculares: requerem desenvolvimento de métodos e serão realizadas em até 10 meses.

*Amostras frescas são placentas/filhotes mortos que tenham sido refrigerados. Estes casos terão prioridade de análise. As amostras congeladas serão analisadas conforme disponibilidade da equipe, e não há previsão para encaminhamento de resultados, pois o congelamento compromete muito a viabilidade do diagnóstico.

