

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO PATOLÓGICA DE DOENÇAS HEPÁTICAS INFECCIOSAS EM
CÃES

EDUARDO CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO PATOLÓGICA DE DOENÇAS HEPÁTICAS INFECCIOSAS EM
CÃES

Autor: Eduardo Conceição de Oliveira
Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
concentração em Cirurgia, Morfologia
e Patologia animal, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE
2011

O48A Oliveira, Eduardo Conceição de
Avaliação patológica de doenças hepáticas
infecciosas em cães. / Eduardo Conceição de Oliveira -
Porto Alegre: UFRGS, 2011.

85 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2011. David Driemeier, Orient.

1. Patologia Veterinária: cães 2. Hepatopatias
3. Fígado 4. Necrose 5. Infecção I. Driemeier, David,
Orient. II. Título

CDD 619.6026

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

Eduardo Conceição de Oliveira

Avaliação patológica de doenças hepáticas infecciosas em cães.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

Profª Dra. Berenice de Ávila Rodrigues

Membro da Comissão

Prof Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros (UFSM)

Membro da Comissão

Prof. Dr. André Silva Carissimi (UFRGS)

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial ao Prof. David Driemeier pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de trabalho, amizade, liberdade na escolha dos meus trabalhos e pelo espaço fornecido como professor nas disciplinas de patologia.

Aos colegas de pós-graduação Luciana Sonne e Saulo Petinatti Pavarini, agradeço pelo longo tempo de trabalho na Área de Patologia de Pequenos Animais, amizade, aprendizado e boa convivência. À amiga, aluna e estagiária Paula Rodrigues de Almeida pela ajuda durante o doutorado.

Aos alunos da Faculdade de Veterinária da UFRGS pelo conhecimento, apoio e experiência adquirida como docente nas disciplinas de patologia.

Por fim, agradeço também aos amigos do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS: Pedro Pedroso, Pedro Bezerra, Tatiane Terumi, Paulo Bandarra, Caroline Pescador, Priscila Zlotowski, Djeison Raymundo, Bárbara Krebs, André Dalto, Juliano Leal, Danilo Gomes, Nadia Antoniassi, Fabiana Boabaid, Luiz Schneider, Elisa Teixeira, Adriana Meirelles, Karine Ludwig, Marcele Bandinelli, Ana Paula Gobbi, Miúriel Goulart, Veronica Rolim, Fabiana Wurster, Neusa Castro, Daniele Bassuino, Gabriel Frainer e Gregory Juffo, agradeço pelos momentos alegres, trabalho e amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	10
<i>ABSTRACT</i>	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. Revisão Bibliográfica	14
2.1 Doenças hepáticas infecciosas em cães.....	14
2.1.1 Leptospirose canina.....	17
2.1.2 Hepatite infecciosa canina.....	20
2.1.3 Herpesvírus canino.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Resultados Gerais.....	28
4.2 Artigo 1	31
4.3 Artigo 2	38
4.4 Leptospirose canina.....	56
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresentação de alguns agentes infecciosos responsáveis por hepatopatias em cães.	16
Tabela 2 - Distribuição por tipo de lesão nos diagnósticos <i>post mortem</i> no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (período 2000 a 2009) de cães com lesões hepáticas.	28
Tabela 3 - Distribuição dos diagnósticos <i>post mortem</i> de hepatopatias realizados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (período 2000 a 2009) de cães.....	29
Tabela 4 - Distribuição e identificação das raças e dos cães sem raça definida que apresentaram hepatopatias no exame <i>post mortem</i> do SPV-UFRGS (período 2000-2009).....	30
Tabela 5 – Distribuição por raça e sem raça definida dos cães diagnosticados com leptospirose:.....	57
Tabela 6 – Distribuições dos achados macroscópicos hepáticos avaliados em 112 cães necropsiados com leptospirose canina:.....	58
Tabela 7 - Distribuição dos achados macroscópicos renais identificados em 112 cães necropsiados com leptospirose.	60
Tabela 8 - Distribuições dos achados macroscópicos pulmonares identificados em 112 cães necropsiados com leptospirose canina.	61
Tabela 9 – Frequências das alterações histológicas hepáticas identificadas nos 112 cães com leptospirose.	64
Tabela 10 - Frequências das alterações histológicas renais identificadas nos 112 cães com leptospirose.	66
Tabela 11 - Frequências das alterações histológicas pulmonares identificadas nos 112 cães com leptospirose.	68
Tabela 12 - Frequências das alterações histológicas cardíacas identificadas nos 112 cães com leptospirose.	69
Tabela 13 - Frequência das alterações histológicas de estômagos analisados em 40 cães com leptospirose canina.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico da distribuição por idade de 80 cães analisados com leptospirose.....	56
Figura 2 – caninos com leptospirose, apresentando icterícia em diferentes locais anatômicos. A: icterícia cutânea, pele da região abdominal e inguinal. B: icterícia na mucosa oral. C: avaliação ocular apresentou esclera icterícia. D: subcutâneo com icterícia no tecido adiposo.	58
Figura 3 – fígado icterício, canino com leptospirose.....	59
Figura 4 – fígado icterício e com bordos arredondados de um canino com leptospirose.....	59
Figura 5 – fígado icterício, com padrão lobular evidente e friável ao toque: cão com leptospirose.	60
Figura 6 – rins de cães com leptospirose. A. Rim icterício e com petéquias na superfície capsular. B. Rim com icterícia e acentuada hemorragia na superfície cortical.	61
Figura 7 – pulmões não colapsados e vermelho-escuros de um cão com leptospirose.....	62
Figura 8 – pulmões não colapsados com áreas vermelhas e icterícias, cão com leptospirose.....	62
Figura 9 – estômagos de cães com leptospirose. A. mucosa icterícia com extensa área hemorrágica. B. mucosa gástrica hiperêmica, icterícia e com extensa hemorragia.	63
Figura 10 – exame macroscópico de cães com leptospirose. A. coração com endocárdio do átrio esquerdo com mineralização (endocardite mural urêmica) e icterícia. B. mineralização e icterícia na pleura parietal dos espaços intercostais.....	63
Figura 11 – corte histológico de fígado com dissociação de hepatócitos, em cão diagnosticado com leptospirose (HE, obj. 10).....	65
Figura 12 – corte histológico de fígado com dissociação de hepatócitos e células binucleadas (setas), em cão com leptospirose (HE, obj. 20).	65
Figura 13 - corte histológico de rim de um cão com leptospirose. Degeneração tubular e infiltrado intersticial mononuclear moderado (HE, obj. 40).	66

Figura 14 - corte histológico de rim, canino com leptospirose. Necrose tubular, infiltrado intersticial mononuclear e acúmulo de pigmentos acastanhados no epitélio tubular (HE, obj.20).....	67
Figura 15 – cortes histológicos de pulmões de cães com leptospirose. A. hemorragia intra-alveolar acentuada (HE, obj. 20). B. mineralização de septos alveolares, pneumonia e hemorragia (HE, obj. 20).	68
Figura 16 – corte histológico do estômago de um cão com uremia por leptospirose. Visualização de necrose, mineralização e hemorragia da mucosa gástrica. (HE, obj, 20).	70

RESUMO

Foi realizado um estudo das hepatopatias de cães, dando ênfase aos achados patológicos de doenças hepáticas infecciosas. Foram realizadas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009, 4.573 necropsias de cães e em 396 casos (8,66%) corresponderam a doenças hepáticas. Diagnosticaram-se doenças hepáticas infecciosas ou inflamatórias em 48,74% dos casos (193/396). A leptospirose canina foi a principal hepatopatia encontrada, diagnosticada em 150 cães (37,88% das doenças hepáticas). Selecionaram-se 112 caninos com leptospirose para avaliação dos achados patológicos. Os principais achados de necropsia incluíam icterícia (94,6%) e hemorragias (82,1%) em diferentes locais anatômicos. Pela histologia, identificou-se no fígado dissociação de hepatócitos (100%), e nos rins degeneração e necrose de túbulos renais (75,89%) e nefrite intersticial (54,46%). Nos pulmões, visualizaram-se congestão (78,57%), hemorragia (67,86%) e edema (61,61%). Onze filhotes pertencentes a duas ninhadas foram analisados pelos seus sinais clínicos, achados patológicos e por métodos de diagnósticos complementares para confirmação da infecção por herpesvírus canino tipo 1. Hemorragia cortical renal característica da infecção por herpesvírus canino foram identificadas (9/11). Observaram-se comumente hepatomegalia (7/11), palidez do fígado (6/11), pulmões firmes e não colapsados (11/11), esplenomegalia (9/11) e linfonomegalia (8/11). As lesões histológicas caracterizaram-se por quadro hemorrágico e necrótico atingindo o fígado, rins, pulmões e órgãos linfoides. O diagnóstico específico foi obtido pela imunofluorescência direta. Cães com hepatite infecciosa canina (HIC) foram analisados com base nos seus dados clínicos, achados patológicos e pelos resultados imuno-histoquímicos. Realizaram-se 23 diagnósticos de HIC no período de 1996 a 2009. Os principais achados de necropsia foram palidez do fígado (17/23), hepatomegalia (10/23) e hemorragia em grande parte dos casos. Observaram-se também edema de vesícula biliar (11/23), material fibrinoso na superfície hepática (8/23) e icterícia (6/23). Histologicamente, acentuada necrose do fígado (23/23) foram encontradas associadas à identificação de corpúsculos intranucleares (22/23) característicos de HIC. Visualizaram-se marcações imuno-histoquímicas positivas de adenovírus canino tipo 1 em maior quantidade no fígado (23/23), cérebro (22/22), cerebelo (16/20) e rim (16/21).

ABSTRACT

The study presented here was performed to investigate hepatic diseases of dogs, emphasizing pathological findings related to infectious diseases. It was performed from January 2000 to December 2009, 4573 necropsies of dogs were made and 396 (8,66%) cases corresponded to hepatic diseases. Infectious or inflammatory hepatic diseases were diagnosed in 48,74% (193/396) of the cases. Canine leptospirosis was the main hepatic disease found, diagnosed in 150 dogs (37,88% of the liver diseases). 112 cases of leptospirosis were selected for evaluation of pathological findings. During the necropsies, jaundice (94,6%) and hemorrhages (86,1%) were commonly seen in several organs. Trough histology were identified dissociation of hepatocytes in the liver, tubular degeneration and necrosis (82,14%) and interstitial nephritis (54,46%) in the kidneys. In the lungs, congestion (78,57%), hemorrhage (67,86%) and edema (61,61%) were observed. Eleven puppies belonging to two different litters were analyzed through clinical signs, pathological findings and complementary diagnostic methods for confirmation of canine herpesvirus type 1 infection. Were identified cortical hemorrhages (9/11), characteristic of canine herpesvirus type 1 infection. Hepatomegaly (7/11), paleness of liver (6/11), firm lungs (11/11) and not collapsed (11/11), splenomegaly (9/11) and limphadenomegaly (8/11). Histological lesions were characterized by an hemorrhagic and necrotic presentation affecting the liver, kidneys, lungs and lymphoid organs. Specific diagnosis was obtained by direct immunofluorescence. Dogs with infectious canine hepatitis (ICH) were analyzed based on their clinical data, pathological findings and immunohistochemical results. 23 ICH diagnoses were performed in the period of 1996 to 2009. The main necropsy findings were liver paleness (17/23), hepatomegaly (10/23), and hemorrhage in the majority of cases. Gallbladder edema (11/23), fibrinous material at the liver surface (8/23) and jaundice (6/23) were also observed. Histologically, severe necrosis of the liver (23/23) was found, related to identification of intranuclear inclusion bodies, a characteristic finding of ICH. Positive immunohistochemical staining for canine adenovirus type 1 were seen in greater amount in liver (23/23), brain (22/22), cerebellum (16/20) and kidney (16/21).

1. INTRODUÇÃO

O fígado é um importante órgão no metabolismo corporal. Este é responsável pelas sínteses de colesterol, lipídios, ácidos biliares, glicogênio, metabolismo de carboidratos, degradação de substâncias ingeridas e de hormônios, acúmulo de vitaminas, sínteses de proteínas e de fatores de coagulação e pelo metabolismo da bilirrubina (WEBSTER, 2005; CULLEN, 2007; KUMAR et al., 2008).

Diante de uma alteração hepática significativa, essas funções poderão ficar comprometidas, caracterizando uma insuficiência hepática aguda ou crônica. A insuficiência hepática pode levar ao aparecimento de numerosos sinais clínicos e patológicos sistêmicos como: ascite, hemorragias, icterícia, alterações neurológicas, úlceras gastroduodenais e perda da condição corporal (WEBSTER, 2005; NGUYEN; LINGAPPA, 2006).

Diferentes doenças hepáticas são diagnosticadas em cães, podendo ter origem neoplásica, infecciosa, inflamatória, degenerativa, metabólica, tóxica ou circulatória (JONES; HUNT; KING, 2000; CULLEN, 2007).

Doenças infecciosas possuem grande importância entre as causas de morbidade na espécie canina (BENTUBO et al., 2007). Algumas destas doenças podem acometer o fígado e com elevado risco de óbito para os cães. Os principais agentes envolvidos são *Leptospira* spp., o adenovírus canino tipo 1 (CAV-1) e em menor escala o herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) (CULLEN, 2007). Entre estes, merece destaque *Leptospira* spp., devido ao seu potencial zoonótico, com grande risco de causar a morte de animais domésticos e seres humanos pela ocorrência de lesões hepáticas, renais e pulmonares (BHARTI et al., 2003; SALKADE et al., 2005; GANCHEVA et al., 2005).

Na medicina veterinária, há poucos estudos retrospectivos que possibilitem conhecer a importância clínica de cada doença sobre os diferentes sistemas e como causa de óbito na espécie canina (PROSCHOWSKY; RUGBJERG; ERSBØLL, 2003; BONNET et al., 2005; BENTUBO et al., 2007; FIGHERA et al., 2008). No Brasil, da mesma forma, pouco se conhece sobre a importância das doenças hepáticas, assim como a porcentagem de cada hepatopatia entre os diagnósticos *post mortem* realizados em

caninos. Diante do contraste entre a importância das hepatopatias e a escassez de trabalhos envolvendo caninos no Brasil, alguns pesquisadores têm realizado estudos em doenças hepáticas (SILVA, 2005; INKELMANN et al., 2007; SILVA et al., 2007). Através dos resultados obtidos, os avanços no conhecimento das hepatopatias de cães com seus achados patológicos permitirão a implementação de medidas preventivas e terapêuticas por clínicos de pequenos animais no combate às doenças de maior ocorrência. Principalmente diante de um maior número de óbitos com origem infecciosa, indicando a necessidade de um melhor programa preventivo através da vacinação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças hepáticas infecciosas de cães

Hepatopatias infecciosas de cães podem ser ocasionadas por bactérias, fungos, vírus, protozoários e riquetsias (Tabela 1) (VAN DEN INGH et al., 2006; WINKLE et al.; 2006, CENTER, 2006; KEARNS, 2009). Doenças hepáticas infecciosas poderão levar a uma insuficiência hepática devido à necrose hepatocelular. Tradicionalmente referidas como hepatites, podem provocar extensa necrose com pouca ou nenhuma inflamação em lesões agudas (VAN DEN INGH et al., 2006).

Infecções bacterianas hepáticas estão associadas, principalmente, ao deslocamento de bactérias do trato digestório ao fígado pela veia porta (CENTER, 2006). Em uma situação normal, bactérias entéricas são removidas do fígado por células de Kupffer, eliminadas por neutrófilos ou excretadas na bile (CENTER, 2006). Entretanto, alterações hepáticas ocasionadas por isquemia, hipovolemia, doenças hepáticas crônicas, desvios portossistêmicos, endotoxinas, hipertensão portal, redução da capacidade imunológica e colestase podem favorecer uma infecção através de bactérias provenientes da flora intestinal (CENTER, 2006; KEARNS, 2009).

As principais bactérias identificadas em quadros de hepatites bacterianas em caninos incluem *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp. (KEARNS, 2009). Hepatites bacterianas agudas não apresentam reação inflamatória característica, podendo provocar necrose focal ou multifocal confluentes, com neutrófilos, macrófagos e linfócitos em grau variado. Colorações especiais (Warthin-Starry e Giemsa) auxiliam na identificação bacteriana em cortes histológicos e o diagnóstico específico é determinado com o cultivo bacteriológico e/ou PCR (*polymerase chain reaction*) (VAN DEN INGH et al., 2006).

Em pequenos animais, raramente ocorrem abscessos pela ação de bactérias piogênicas (KEARNS, 2009). Abscessos são formados após alterações locais ou sistêmicas que favoreçam uma infecção bacteriana, como: traumas, septicemias,

infecção ascendente do trato digestivo, onfalites ou por isquemia hepática (KEARNS, 2009).

Hepatite aguda pode ser ocasionada pelo *Clostridium piliformes*, provocando a Doença de Tyzzer em cães e gatos. A doença provoca um quadro clínico agudo, levando a morte do animal em 24 a 48 horas após a infecção (KEARNS, 2009). A Doença de Tyzzer é caracterizada por áreas de necrose confluentes com ou sem infiltrado inflamatório e nas margens das áreas necróticas, bacilos longos e grandes são observados no interior de hepatócitos. As bactérias são melhores visualizadas pelas colorações de prata (Warthin-Starry) ou Giemsa (VAN DEN INGH et al., 2006).

Hepatites granulomatosas são diagnósticos incomuns em cães. Doenças como histoplasmose, toxoplasmose ou infecções bacterianas (exemplos: micobactérias, *Nocardia* spp., *Brucella* spp. e *Bartonella* spp.) podem ocasionar hepatites granulomatosas (KEARNS, 2009). O processo inflamatório crônico resulta em agregados focais ou multifocais de macrófagos, células epitelioides, linfócitos, células gigantes, fibroblastos e variada deposição de tecido conjuntivo fibroso (WINKLE et al., 2006).

A infecção por *Toxoplasma gondii* pode ter envolvimento hepático. Diferentes padrões de necrose podem ser identificados, resultando em necrose focal a coalescente e, em casos severos, necrose massiva (VAN DEN INGH et al., 2006). Caninos com cinomose canina, erliquiose ou que apresentam queda da imunidade são mais comumente acometidos pela toxoplasmose (KEARNS, 2009).

Tabela 1 – Apresentação de alguns agentes infecciosos responsáveis por hepatopatias em cães.

Bactérias	<i>Leptospira</i> spp. <i>Clostridium piliformes</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Helicobacter canis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pasteurella</i> spp. <i>Brucella</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium avium intracellulare</i> <i>Nocardia asteroides</i> <i>Yersinia</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i>
Vírus	Adenovírus canino tipo 1 Herpesvírus canino tipo 1
Protozoários	<i>Toxoplasma gondii</i> <i>Leishmania</i> spp. <i>Neospora caninum</i> <i>Hepatozoon canis</i> <i>Encephalitozoon cuniculi</i> <i>Sarcocystis canis</i> <i>Babesia</i> spp.
Fungos	<i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Prototheca</i> spp.
Riquétsias	<i>Ehrlichia</i> spp. <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Rickettsia rickettsii</i>

Fontes: VAN DEN INGH et al., 2006; WINKLE et al.; 2006, CENTER, 2006; KEARNS, 2009.

2.1.1 Leptospirose canina

Leptospira spp. é uma bactéria espiroqueta da família Leptospiraceae. Como importantes características, apresenta forma espiralada e fina, crescimento obrigatoriamente aeróbio em temperatura de 28-30°C, medindo 0,1µm de diâmetro por 6-20µm de espessura e possui motilidade (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Esta família é formada por 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstoni*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffi* e divididas em mais de 260 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Destas citadas, a *Leptospira interrogans* e a *Leptospira kirschneri* são importantes espécies patogênicas em cães (STOKES; DRU FORRESTER, 2004). Em cães os principais sorovares encontrados são o canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pomona, hardjo, zannoni, copenhageni, bratislava, autumnalis, ballum e sawkoebing (STOKES; DRU FORRESTER, 2004; MOORE et al., 2006; MILLER et al., 2007; DAVIS et al., 2008; GOLDSTEIN et al., 2006). Com a utilização dos sorovares canicola e icterohaemorrhagiae nos programas de vacinação da leptospirose, ocorreu um declínio na sua prevalência em estudos sorológicos (FAVERO et al., 2002; LANGSTON; HEUTER, 2003).

A leptospirose é uma doença infecciosa sistêmica de humanos, animais domésticos e selvagens (STUART, 1952; LEVETT, 2001). Em humanos, a doença é mais diagnosticada em populações com piores condições sócio-econômicas na vida urbana, em que a infecção ocorre após o contato com águas ou solos contaminados, principalmente, em períodos de chuvas e enchentes (CARVALHO; BETHLEM, 2002; MCBRIDE et al., 2005; FONTES et al., 2010). Por esse motivo, a doença é endêmica em regiões tropicais com altas taxas de precipitações de chuvas e a América do Sul e Central, China, África e Sudeste da Ásia apresentam maior casuística (DUTTA; CHRISTOPHER, 2005). A leptospirose humana foi diagnosticada pela primeira vez no ano de 1886, pelo médico alemão Adolf Weil, em um paciente com insuficiência renal, hemorragia e icterícia (LEVETT, 2001, JANSEN et al., 2005), e é denominada de doença de Weil. Entre os animais domésticos, caninos, bovinos e a suínos são mais acometidas (LEFEBVRE, 2004). Como resultado dessa infecção, graves quadros

clínicos são observados, provocando insuficiência renal, hepática, alterações pulmonares, hemorragias e falhas reprodutivas (JONES; HUNT; KING, 2000; SZEREDI; HAAKE, 2006; SAGLAM et al., 2008; DAHER et al., 2010).

A leptospira é mantida nos túbulos renais de hospedeiros reservatórios e é excretada na urina (BHARTI et al., 2003). Tanto animais domésticos como animais selvagens carregam a leptospira no trato urinário, como suínos, bovinos, caninos, pequenos marsupiais, roedores e mamíferos aquáticos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Os cães são reservatórios do sorovar canicola, mas também podem servir como hospedeiros secundários de outros sorovares patogênicos (STOKES; DRU FORRESTER, 2004).

A leptospirose canina pode ser transmitida pela urina, contato venéreo, transferência placentária, mordidas, ingestão de tecidos, água, solo ou alimentos contaminados (GREENE et al., 2006; BURR; LUNN; YAM, 2009). A infecção ocorre principalmente pela penetração do microorganismo pelas membranas intactas da boca, olhos, cavidade nasal, pele úmida ou por lesões cutâneas. Após a penetração, ocorre uma rápida fase de leptospiremia que dura poucos dias com posterior disseminação da bactéria para diferentes órgãos (BOLIN, 1996). Órgãos como rins, fígado, baço, olhos, sistema nervoso central e sistema genital são atingidos, ocorrendo intensa multiplicação bacteriana nesses locais (BOLIN, 1996; LANGSTON; HEUTER, 2003). A leptospira apresenta um período de incubação de sete dias, porém pode variar conforme o estado imunológico do animal e virulência da bactéria (GREENE et al., 2006).

Um grande número de sinais clínicos são identificados em cães com leptospirose. Clinicamente os animais apresentam febre (39,5°C a 40°C), vômito, icterícia, anorexia, letargia, diarreia, dispneia, desidratação, perda de peso, hemorragias sistêmicas em grau variado, dor abdominal e alterações do sistema urinário (poliúria, oligúria ou anúria) (STUART, 1952; GREENE et al., 2006; GOLDSTEIN et al., 2006; GEISEN et al., 2007; PRESCOTT, 2008).

A necropsia de cães com leptospirose é caracterizada pela ocorrência de achados patológicos multissistêmicos. Icterícia é um achado importante no diagnóstico da leptospirose, pigmentando mucosas, pele, tecido subcutâneo e órgãos internos (BYRNE, 1955; FIGHERA, 2008). Macroscopicamente, o fígado pode apresentar-se aumentado, friável e de coloração amarelada devido à colestase (GREENE et al., 2006; FIGHERA,

2008). No fígado, as lesões microscópicas são caracterizadas pela dissociação de hepatócitos, células binucleadas e com necrose discreta (GREENLEE et al., 2004; VAN DEN INGH et al., 2006). Os rins poderão estar aumentados, com hemorragias e discretos pontos brancos na superfície cortical (HUTSON, 1945; JONES; HUNT; KING, 2000). Nefrite intersticial, degeneração e necrose são achados histológicos renais característicos da leptospirose (NEWMAN; CONFER; PANCIERA, 2009; SCHWEIGHAUSER et al., 2009). Lesões extra-renais de uremia são observadas, principalmente, no trato digestório (GREENE et al., 2006). Lesões renais e hepáticas crônicas de leptospirose canina são vistas com menor frequência (ANDRÉ-FONTAINE, 2006) e a ocorrência de uma insuficiência renal crônica após a recuperação de um quadro agudo de leptospirose pode ser a seqüela desta infecção (STOKES; DRU FORRESTER, 2004). Edema, hemorragia, mineralização e pneumonia são achados patológicos pulmonares descritos (GREENE et al., 2006; FIGHERA, 2008). Em alguns casos de leptospirose foi relatada a ocorrência de intussuscepção (FIGHERA, 2008; SCHWEIGHAUSER et al., 2009). Também já foi descrita a ocorrência de aborto e infertilidade em cães como resultado de uma infecção transplacentária (LANGSTON; HEUTER, 2003; ANDRÉ-FONTAINE, 2006).

Alterações hematológicas e bioquímicas são observadas em cães com leptospirose canina. O exame hematológico apresenta leucocitose, trombocitopenia e também pode ocorrer uma anemia regenerativa (GEISEN et al., 2007; VAN DE MAELE et al., 2008). Os resultados bioquímicos indicam comprometimento renal e hepático pelo aumento de ureia e da creatinina, hiperbilirrubinemia, elevação de enzimas hepáticas (exemplos: fosfatase alcalina e alanina aminotransferase), hiperfosfatemia, hipocalcemia ou hipercalcemia (MILLER et al., 2007; VAN DE MAELE et al., 2008).

Numerosos métodos de diagnósticos são descritos e utilizados para confirmação da leptospirose, porém nenhum deles é considerado perfeito na confirmação da doença (OLIVEIRA et al., 2005; BURR; LUNN; YAM, 2009). O teste de aglutinação microscópica (MAT – *microscopic agglutination test*) é considerado o método de diagnóstico padrão de leptospirose, detectando os títulos de sorovares específicos de leptospirose (DAVIS et al., 2008). Resultado falso negativo pode ocorrer nos primeiros 7 a 10 dias de infecção ou ter uma baixa titulação no início da infecção (BURR; LUNN; YAM, 2009). Recomenda-se nesses casos amostras pareadas, coletando-se novamente

após duas a três semanas (BURR; LUNN; YAM, 2009). Animais vacinados podem apresentar titulação alta para o sorovar presente na vacina (exemplo, canicola e icterohaemorrhagiae), porém o valor raramente é maior que 1:300 (LANGSTON; HEUTER, 2003). Além disso, a titulação vacinal da leptospira não dura mais do que três meses (LANGSTON; HEUTER, 2003). Culturas de leptospira são extremamente difíceis de serem obtidas e levam muito tempo para seu crescimento, podendo levar vários meses para o diagnóstico (LEFEBVRE, 2004; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007; BURR; LUNN; YAM, 2009). A utilização prévia de antimicrobianos, o curto período de leptospiremia e a intermitente eliminação pela urina dificultam ainda mais o cultivo (BURR; LUNN; YAM, 2009). Em cortes histológicos, a leptospira pode ser visualizada pela coloração especial de Warthin-Starry ou pela técnica de imuno-histoquímica (TIMONEY et al., 1988; LANGSTON; HEUTER, 2003). A PCR pode ser utilizada na confirmação da doença, utilizando-se sangue, urina ou amostras de tecidos (BOOMKENS et al., 2005; BURR; LUNN; YAM, 2009). Como vantagens, a PCR apresenta boa sensibilidade e especificidade e pode ser utilizada como método de diagnóstico no período inicial da doença, diferente da MAT que necessita de soroconversão (VAN DE MAELE et al., 2008). A identificação da leptospira em microscopia de campo escuro pode ser utilizada através de amostras de urina, sangue ou tecidos (TIMONEY et al., 1988; BOLIN, 1996). Entretanto, sua utilização como teste da leptospirose é pouco recomendada pela difícil interpretação, necessidade de alta concentração de bactérias, baixa sensibilidade e reduzida especificidade (BOLIN, 1996; LEVETT, 2001). Outro método que pode ser utilizado com boa especificidade é a imunofluorescência direta (BOLIN, 1996). Nessa técnica, pode-se utilizar sangue, urina e impressões de tecidos (rim e fígado) (BOLIN, 1996; GREENE et al., 2006; BURR; LUNN; YAM, 2009).

2.1.2 Hepatite infecciosa canina

A hepatite infecciosa canina (HIC), denominada inicialmente como doença de Rubarth, é uma enfermidade viral ocasionada pelo adenovírus canino tipo1 (CAV-1) (ZEE; MACLACHLAN, 2004). O CAV-1 pertence à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus* (MORAES; COSTA, 2007). Como característica importante, os vírus

pertencentes a essa família, replicam no núcleo de células infectadas, formando como produto um grande corpúsculo de inclusão intranuclear (MORAES; COSTA, 2007). O CAV-1 é um vírus não envelopado, com estrutura icosaédrica, medindo de 70 a 90 nm de diâmetro e formado por um genoma de DNA de dupla fita linear (ZEE; MACLACHLAN, 2004; MORAES; COSTA, 2007).

O CAV-1 acomete cães, lobos, raposas, coiotes e ursos (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Muitas das infecções são subclínicas, mas a HIC ocorre principalmente em cães não vacinados com idade inferior a 12 meses (TIMONEY et al., 1988; MORAES; COSTA, 2007). A HIC é uma doença de distribuição mundial observada desde 1930 em caninos (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008), porém, com a utilização de programas de vacinação sua ocorrência é atualmente rara (ZEE; MACLACHLAN, 2004). A HIC possui maior importância em populações com padrão sócio-econômico inferior, onde a imunização de cães é pouco praticada (MORAES; COSTA, 2007).

A transmissão ocorre através da urina, saliva, fezes ou secreções respiratórias (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008) e ocorre pelo contato direto entre os animais ou indireto por meio de fômites, alimentos ou água (TIMONEY et al., 1988). Na infecção pela via oronasal, ocorre a replicação do vírus nas tonsilas, deslocando-se para linfonodos regionais da cabeça com posterior viremia e deslocamento para diferentes órgãos (MORAES; COSTA, 2007). O período de incubação é de 4 a 9 dias (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Após 10 a 14 dias da recuperação da infecção, o vírus permanece somente nos rins, podendo ser eliminado pela urina por 6 a 9 meses (GREENE, 2006). O CAV-1 tem tropismo pelo endotélio vascular e hepatócitos, resultando em lesão vascular e necrose hepática aguda (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

Um quadro clínico muito rápido de poucas horas do início dos sinais clínicos até a morte do animal pode ser observado (GREENE, 2006). Numerosos sinais clínicos podem ser identificados na HIC, como: vômito, diarreia (com ou sem sangue), dor abdominal, febre ($>40^{\circ}\text{C}$), anorexia, edema subcutâneo, tosse, dispneia, icterícia, depressão, ataxia, desorientação e convulsões (TIMONEY et al., 1988; GREENE, 2006; DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Opacidade de córnea e uveíte anterior, caracterizando o sinal clínico conhecido como “olho azul” da HIC, se

desenvolve pela deposição de imunocomplexos no endotélio vascular do globo ocular (KOPTOPOULOS; CORNWELL, 1981; MORAES; COSTA, 2007). Essa lesão pode ocorrer de 1 a 3 semanas após a recuperação ou em caninos que apresentaram uma infecção subclínica de CAV-1 (GREENE, 2006; DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Estes animais apresentam opacidade de córnea, dor, secreção ocular, fotofobia, blefaroespasma, glaucoma e ulceração de córnea (CURTIS; BARNETT, 1983; GREENE, 2006). A alteração ocular de “olho azul” pode ser unilateral ou bilateral (TIMONEY et al., 1988). Cães que receberam a vacina atenuada com CAV-1 também podem desenvolver o “olho azul” (MORAES; COSTA, 2007). Edema de córnea após a utilização de vacina viva modificada de adenovírus canino tipo 2 também foi descrita como causa do “olho azul” (BLOGG, 1983). Glomerulonefrite pela deposição de imunocomplexos pode ocorrer em cães com HIC (WRIGHT 1976; HERVÁS et al., 1997).

Alterações hematológicas na HIC são caracterizadas por leucopenia, linfopenia, neutropenia, trombocitopenia, aumento de protrombina e diminuição da atividade do fator VIII (TIMONEY et al., 1988; GREENE, 2006). Bioquimicamente, como resultado da lesão hepática, identifica-se aumento de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase), bilirrubinúria, bilirrubinemia e hipoglicemia (TIMONEY et al., 1988).

O diagnóstico laboratorial de CAV-1 poderá ser realizado através de provas sorológicas (fixação de complemento, inibição da hemoaglutinação ou ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) (STUDDERT; STUDDERT, 1972), isolamento viral, microscopia eletrônica (GARG; MOULTON; SEKHRI, 1967), imunofluorescência direta (ZEE; MACLACHLAN, 2004), pela confirmação histológica pela técnica imuno-histoquímica (CHOUINARD et al., 1998; INKELMANN et al., 2008) e PCR (CAUDELL et al., 2005; DECARO et al., 2007; CHATURVEDI et al., 2008).

No exame de necropsia, os cães infectados pelo CAV-1 poderão apresentar mucosas pálidas ou ictericas (INKELMANN et al., 2007). Muitos animais apresentam boa condição corporal devido à morte rápida na HIC, poucas horas ou dias após o início dos sinais clínicos (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Hemorragias em diferentes locais anatômicos são comumente observadas. Podem ser identificadas na

pele, tecido subcutâneo, mucosa oral, encéfalo, cavidades, fígado, pâncreas, pulmões, timo, rins, serosa ou na luz de órgãos digestivos ou urina (INKELMANN et al., 2007; DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Na cavidade abdominal, identifica-se em alguns cães ascite discreta de coloração clara a vermelha (GREENE, 2006). O fígado pode estar aumentado, pálido, congesto, amarelo-escuro, com aumento do padrão lobular e apresentando pontilhados claros na superfície capsular ou de corte (INKELMANN et al., 2007; DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Espessamento da vesícula biliar é observado em alguns casos pela ocorrência de edema da parede (INKELMANN et al., 2007). Deposição discreta de fibrina pode ser identificada na superfície do fígado, entre os lobos hepáticos ou sobre a serosa de outros órgãos abdominais (CORNWELL; WRIGHT, 1969; GREENE, 2006). Pulmões podem apresentar áreas de consolidação (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Histologicamente, a HIC é caracterizada pela necrose de hepatócitos e identificação de corpúsculos de inclusão intranucleares principalmente em hepatócitos (TIMONEY et al., 1988). Estes corpúsculos formam uma grande estrutura anfófila ou basófila no interior do núcleo, podendo ter um halo na periferia nuclear que corresponde à cromatina marginada (GREENE, 2006).

2.1.3 Herpesvírus canino

A família *Herpesviridae* é composta por inúmeros vírus que são responsáveis por doenças em humanos e animais domésticos (TIMONEY et al., 1988). Em cães diferentes quadros clínicos são ocasionados pelo herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1). O CHV-1 pertence à subfamília Alphaherpesvirinae, gênero Varicellovirus (FRANCO; ROEHE, 2007). CHV-1 é um vírus de DNA de dupla fita linear, formando um núcleo (ou core) no centro, com capsídeo icosaédrico envolvendo o núcleo, recoberto por tegumento e um envelope lipoprotéico na sua superfície (FRANCO; ROEHE, 2007).

CHV-1 possui distribuição mundial e sua prevalência pode ser alta em determinadas populações de cães (CRAWFORD; SELLON, 2010). Estudos sorológicos apontam evidências do vírus em 30% a 100% dos cães de canis (GREENE; CARMICHAEL, 2006). A transmissão ocorre pelo contato oronasal com secreções

nasais ou genitais e também pela via transplacentária (CRAWFORD; SELTON, 2010). Muitas das infecções por CHV-1 são subclínicas ou apresentam-se de grau leve e autolimitantes, ficando o vírus em sua forma latente (CRAWFORD; SELTON, 2010). A infecção latente ocorre pela permanência do CHV-1 nos gânglios trigêmeos ou lombo-sacrais (FRANCO; ROEHE, 2007). Em determinadas situações o CHV-1 é reativado pela queda de imunidade, geralmente relacionada, ao estresse e utilização de glicocorticoides (GALOSI, 2007).

Sinais clínicos graves são observados pela ocorrência de doença necrótica e hemorrágica em cães de 1 a 3 semanas (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). CHV-1 provoca um quadro agudo; em casos graves, a morte dos cães acontece em 24 a 48 horas (GREENE; CARMICHAEL, 2006). Em ninhadas acometidas por CHV-1, a mortalidade pode chegar a 100% (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Os filhotes apresentam apatia, anorexia, dor abdominal, choro, descarga nasal hemorrágica, dispneia, tremores, movimentos de pedalar, opistótono e convulsões (LOVE; HUXTABLE, 1976; GREENE; CARMICHAEL, 2006). Em animais mais velhos, o CHV-1 é associado com infecções do trato respiratório, ulcerações de córnea e alterações reprodutivas (LOVE, 1972). Desordens reprodutivas são caracterizadas pela ocorrência de abortos, natimortos, óbito de neonatos e infecções da vulva ou pênis (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008). Em fêmeas, a infecção por CHV-1 provoca vaginite, ocasionando hiperemia, hemorragias e hiperplasia de folículos linfóides da mucosa vaginal (HILL; MARÉ, 1974). Semelhantes lesões também são observadas no macho, localizadas principalmente na base do pênis, identificando-se hiperemia e petéquias na mucosa e menor ocorrência de nódulos que indicam uma hiperplasia linfóide (HILL; MARÉ, 1974). A infecção do trato respiratório pode ocasionar faringite, rinite ou traqueobronquite em cães (DECARO; MARTELLA; BUONAVOGLIA, 2008).

O diagnóstico *post mortem* é baseado na identificação das lesões características de CHV-1, como a formação de petéquias na superfície renal, identificação de hemorragia e necrose em diferentes órgãos e pela identificação de corpúsculos de inclusão intranucleares (TIMONEY et al., 1988; FRANCO; ROEHE, 2007). O diagnóstico definitivo é feito pela observação de antígenos de CHV-1 pela imunofluorescência direta (IFA) ou por isolamento viral (SCHWARTZ; MARTIN, 1966; FRANCO; ROEHE, 2007). Órgãos como fígado, rim, baço e pulmões podem ser

utilizados para o isolamento viral (LOVE; HUXTABLE, 1976). O CHV-1 necessita de células primárias de cães ou de linhagens de origem canina MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), onde produzem efeito citopático e alguns isolados induzem a formação de sincícios (FRANCO; ROEHE, 2007). Diagnóstico *post mortem* definitivo de CHV-1 também pode ser realizado por PCR ou pela hibridização *in situ* (SCHULZE; BAUMGÄRTNER, 1998). Testes sorológicos para a detecção de anticorpos de CHV-1, como vírus neutralização, ELISA e inibição da hemoaglutinação, podem ser utilizados no monitoramento de canis ou no diagnóstico individual de cães (GREENE; CARMICHAEL, 2006).

No exame de necropsia, achados patológicos sistêmicos são observados. A lesão característica renal corresponde à identificação de petéquias no córtex renal (LOVE; HUXTABLE, 1976). O fígado se apresenta levemente aumentado, com múltiplos pontos branco-acizentados distribuídos pelo parênquima e petéquias na superfície capsular e de corte (LOVE; HUXTABLE, 1976; HASHIMOTO et al., 1978). Os pulmões se apresentam firmes, não colapsados, congestionados e podem ter áreas de hemorragia (GREENE; CARMICHAEL, 2006). Esplenomegalia e linfonomegalia são achados comumente observados durante as necropsias de filhotes com CHV-1 (GREENE; CARMICHAEL, 2006).

Cortes histológicos do fígado e rim revelam necrose multifocal acompanhada de áreas de hemorragia (HASHIMOTO et al., 1978). Na periferia de áreas necróticas dos rins, pulmões e fígado, raros corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser identificados (WOUTERS; VARASCHIN; WOUTERS, 2001). Nos pulmões, pneumonia fibrinonecrótica e hemorragias são observadas (WATT; SPRADBROW; LAMBERTH, 1974; LOVE; HUXTABLE, 1976). No sistema nervoso central, identificaram-se hiperemia, meningoencefalite mononuclear e áreas de necrose (PERCY et al., 1970; LOVE; HUXTABLE, 1976). Focos de necrose também foram visualizados no baço, linfonodos e globo ocular (CARMICHAEL; SQUIRE; KROOK, 1965).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho analisou os registros de necropsias (período de 2000 a 2006) e de novos casos (período de 2007 a 2009) de cães necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV - UFRGS). Nesta avaliação, buscaram-se os caninos que apresentaram diagnósticos de hepatopatias com origem infecciosa, conforme classificação utilizada por Greene (2006). Os animais do estudo foram provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS, de clínicas e hospitais veterinários ou encaminhados diretamente pelos proprietários ao SPV-UFRGS, englobando como área de atendimento a Região Metropolitana de Porto Alegre. Dados gerais de cada animal foram registrados e analisados, através da identificação da raça, idade e sexo dos cães. Os achados macroscópicos apresentados nas necropsias e as lesões histológicas foram identificados e registrados conforme as características patológicas de cada doença. Após o exame macroscópico dos caninos, coletaram-se fragmentos do fígado, intestino delgado, coração, pulmão, rim, encéfalo, baço, pâncreas, adrenal, linfonodo mesentérico, timo e medula óssea e fixados em formalina 10% durante 24 a 48 horas. Posteriormente, os fragmentos teciduais foram processados pelas técnicas histológicas convencionais e corados pela hematoxilina e eosina (HE).

Os óbitos por hepatite infecciosa canina (HIC) foram analisados de janeiro de 1996 a dezembro de 2009. Com base no histórico fornecido pelo médico veterinário e/ou proprietários do animal, registraram-se os sinais clínicos, ano da ocorrência dos casos, histórico de vacinação e a suspeita clínica por parte do médico veterinário. Além da identificação dos achados patológicos (macroscópicos e histológicos), realizou-se o diagnóstico complementar através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ). Para realização da IHQ, inibição da peroxidase foi realizada com peróxido de hidrogênio a 10% em solução de metanol durante 30 minutos. A recuperação antigênica ocorreu com a utilização de proteinase K *ready-to-use* (S3020, DakoCytomation) por 1 minuto. Para diagnóstico de HIC, utilizou-se anticorpo monoclonal para adenovírus canino tipo 1 (VMRD – 2E10-H2) na diluição de 1:400 durante o período de 14 a 16 horas (*overnight*) a 4°C. Após esta fase, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (*kit* LSAB - K0690,

DakoCytomation) durante um período total de 40 minutos. Como cromógeno utilizou-se o 3,3'diaminobenzidina (DAB – K3468, DakoCytomation) durante um minuto.

Analisaram-se os casos de CHV-1 com base no histórico clínico, achados patológicos e por métodos complementares de diagnóstico. Amostras de fígado, pulmão, baço e rim foram enviadas ao Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para isolamento viral e realização de imunofluorescência direta para CHV-1. Pela maior predisposição de uma infecção por CHV-1 em temperaturas corporais mais baixas (CARMICHAEL; BARNES; PERCY, 1969), pesquisou-se a temperatura ambiental através da consulta ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) com o objetivo de investigar a associação da temperatura do local do nascimento com a temperatura corporal.

Os cães acometidos por leptospirose canina foram analisados pelas lesões macroscópicas e histológicas características desta doença. Como metodologia nos diagnósticos utilizou-se como lesões características de leptospirose, a identificação de dissociação de hepatócitos e a nefrite intersticial (MAXIE; NEWMAN, 2007). Avaliaram-se também outros achados patológicos como: lesões orais e gástricas compatíveis com quadro de uremia, hemorragia, mineralização, intussuscepção e pneumopatias. Para descrever as lesões histológicas, nova análise dos cortes histológicos foi realizada na busca de uma avaliação mais padronizada.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados Gerais

Durante o período de dez anos, realizaram-se 4573 necropsias de cães no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Dessas necropsias, 396 diagnósticos (8,66%) foram de hepatopatias de cães. Hepatopatias inflamatórias/infecciosas de caninos representaram 4,22% (193 casos) dos diagnósticos *post mortem* nesta espécie no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009. Através de uma classificação por tipo de lesão encontrada identificou-se que o principal grupo é o de doenças com origem infecciosa/inflamatória. Essas lesões representaram 48,99% das necropsias de cães com hepatopatias (tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição por tipo de lesão nos diagnósticos *post mortem* no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (período 2000 a 2009) de cães com lesões hepáticas.

Tipo de lesão	Número de casos	%
Inflamatória/infecciosa	193	48,73
Tumoral	92	23,23
Degenerativa	53	13,38
Metabólica	27	6,82
Trauma	26	6,57
Tóxica	4	1,01
Outro	1	0,25
Total	396	100

A leptospirose canina foi a principal doença hepática infecciosa em cães, diagnosticada em 150 casos (3,28% das necropsias de cães no período e 37,88% das doenças hepáticas). A segunda doença mais encontrada no estudo foi a cirrose, identificando-se em 56 animais (13,38% das hepatopatias). Identificaram-se também diferentes neoplasias acometendo o fígado, dentre as quais, a neoplasia primária mais observada foi o colangiocarcinoma, que representou 46% das doenças tumorais do fígado (46 casos). A tabela 3 apresenta as doenças hepáticas de cães diagnosticadas no SPV-UFRGS durante o período de 10 anos.

A análise do sexo dos cães revelou que no período realizaram-se a necropsia de 206 fêmeas (50,37%) e 198 machos (48,41%) com hepatopatias. Em 5 casos (1,22%) o sexo não foi informado nos registros de arquivo. A idade foi informada em 266 casos (64,43%), revelando uma média de 62,18 meses (5,18 anos) e com uma variação de 4 dias a 17 anos.

Tabela 3 - Distribuição dos diagnósticos *post mortem* de hepatopatias realizados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (período 2000 a 2009) de cães.

Doença	Número de casos	%
Leptospirose	150	37,88
Cirrose	53	13,38
Colangiocarcinoma	46	11,62
Traumatismo	26	6,57
Hepatite infecciosa canina	22	5,56
Degeneração gordurosa	27	6,82
Hemangiossarcoma	10	2,53
Carcinoma hepatocelular	7	1,77
Hepatite purulenta	7	1,77
Metástase de carcinoma de mama	6	1,52
Metástase de carcinoma de pâncreas	6	1,52
Hepatite necrótica	9	2,27
Linfossarcoma	5	1,26
Fibrossarcoma	4	1,01
Metástases de feocromocitoma	3	0,76
Carcinoide	2	0,51
Colangio-hepatite crônica	2	0,51
Hepatite mononuclear	2	0,51
Herpesvírus canino	2	0,51
Intoxicação por cobre	2	0,51
Aflatoxicose	1	0,25
Esplenose hepática	1	0,25
Lipossarcoma	1	0,25
Metástase adenocarcinoma gástrico	1	0,25
Metástase carcinoma bronquial	1	0,25
Leptospirose	150	37,88
Cirrose	53	13,38
Colangiocarcinoma	46	11,62
Total	396	100

Informações sobre a raça foram descritas em 391 registros (98,73%). Cães sem raça definida (SRD) corresponderam a 190 casos (48,59%) e em 175 casos (51,02%) a raça foi descrita. Entre as raças mais encontradas, as cinco mais diagnosticadas, foram:

Poodle (6,14%), Rottweiler (5,88%), Pastor Alemão (5,88%), Cocker (5,37%) e Boxer (2,81%). A distribuição completa da avaliação racial está informada na tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição e identificação das raças e dos cães sem raça definida que apresentaram hepatopatias no exame *post mortem* do SPV-UFRGS (período 2000-2009).

Raça	Número de cães	%
Sem raça definida	190	48,59
Poodle	24	6,14
Rottweiler	23	5,88
Pastor Alemão	23	5,88
Cocker	21	5,37
Boxer	11	2,81
Fila	10	2,56
Pit Bull	10	2,56
Doberman	7	1,79
Yorkshire	7	1,79
Collie	6	1,53
Pinscher	6	1,53
Husky	6	1,53
Dachshund	5	1,28
Dogue Alemão	4	1,02
Labrador	4	1,02
Pastor Belga	4	1,02
Beagle	4	1,02
Setter Irlandês	3	0,77
Akita	3	0,77
Terrier Brasileiro	3	0,77
Chow Chow	3	0,77
American Staffordshire Terrier	2	0,51
Bulldog Francês	2	0,51
Sheepdog	2	0,51
Border Collie	1	0,26
Dálmata	1	0,26
Golden Retriever	1	0,26
Pointer	1	0,26
Shar-Pei	1	0,26
Weimaraner	1	0,26
Whippet	1	0,26
Shih-tzu	1	0,26
Total	391	100

4.2 Artigo 1

Título: Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino.

Autores: Eduardo C. Oliveira, Luciana Sonne, Pedro S. Bezerra Júnior, Elisa M. Teixeira, Renata Dezengrini, Saulo P. Pavarini, Eduardo F. Flores e David Driemeier

Revista: Pesquisa Veterinária Brasileira. 29 (8): 637-642, agosto 2009.

Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino¹

Eduardo C. Oliveira², Luciana Sonne², Pedro S. Bezerra Júnior², Elisa M. Teixeira², Renata Dezengrini³, Saulo P. Pavarini², Eduardo F. Flores³ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Oliveira E.C., Sonne L., Bezerra Júnior P.S., Teixeira E.M., Dezengrini R., Pavarini S.P., Flores E.F. & Driemeier D. 2009. [Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus.] Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(8):637-642. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

The clinic and pathological findings and laboratorial testing of puppies with postmortem diagnosis of canine herpesvirus infection are described. The cases occurred in two households of Porto Alegre, RS, in April 2007 and July 2008. The puppies presented anorexia, depression, cry and dyspnea, followed by death about 24-72 hours after the onset of clinical signs. At necropsy multifocal pin point hemorrhages were observed in the kidneys. The liver was enlarged with petechiae and white foci on the surface. The lungs were red and did not collapse. The spleen was enlarged and, in some cases, with petechiae on the capsular surface. Mesenteric lymph nodes and thymus were enlarged. Microscopic lesions included hemorrhages and multifocal necrosis of the renal tubular epithelial cells, hepatocytes and lymphoid tissues. In the lungs there was severe multifocal alveolar necrosis with abundant fibrin deposits and a mixed inflammatory infiltrate of variable intensity. Intranuclear inclusion bodies were identified in the periphery of necrotic areas in hepatocytes, renal tubular epithelial cells and alveolar cells. Samples of liver, kidney and lung were positive in the direct immunofluorescence test for canine herpes virus type 1 (CHV-1). The diagnosis was based on epidemiological data, necropsy findings, histological lesions and positive immunofluorescence results using CHV-1 antibody in tissue samples. To our knowledge, this is the first report of the identification of CHV-1 in Brazil, although previous clinic and pathological findings already suggested the presence of the virus in Brazilian canine population.

INDEX TERMS: Diseases of dogs, canine herpesvirus, hemorrhage, hepatic necrosis.

RESUMO.- Descrevem-se os achados clínicos e patológicos e os exames laboratoriais de filhotes de cães com diagnóstico *post mortem* de infecção por herpesvírus canino. Os casos ocorreram em duas propriedades da Ci-

dade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em abril de 2007 e julho de 2008. Clinicamente, os cães apresentaram anorexia, apatia, choro e dispneia. A morte dos cães ocorreu após 24-72 horas do início dos sinais clínicos. Na necropsia observaram-se hemorragia multifocal renal e hepatomegalia com petéquias e pontos brancos na superfície natural do fígado. Os pulmões se apresentaram não-colapsados e vermelhos. Havia esplenomegalia e, em alguns cães, petéquias na superfície capsular do baço. Aumento dos linfonodos mesentéricos e do timo foi observado. Lesões microscópicas incluíram hemorragia e necrose multifocal em células epiteliais tubulares renais, hepatócitos e tecidos linfoides. Nos pulmões, havia ne-

¹ Recebido em 9 de fevereiro de 2009.

Aceito para publicação em 16 de março de 2009.

² Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Laboratório de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

crose alveolar multifocal acentuada com abundante material fibrinoso e infiltrado inflamatório misto de intensidade variada. Ocasionalmente corpúsculos de inclusão intranucleares em áreas periféricas à necrose foram identificados em hepatócitos, células epiteliais de túbulos renais e células alveolares. Amostras de fígado, rim e pulmão foram positivas na imunofluorescência direta para herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1). O diagnóstico de infecção por herpesvírus foi baseado nos achados de necropsia, histológicos e de imunofluorescência positiva em tecidos usando anticorpo anti-CHV-1. De nosso conhecimento, este é o primeiro relato da identificação do CHV-1 no Brasil, embora achados clínico-patológicos anteriores já sugerissem a presença do agente na população canina do país.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de cães, herpesvírus canino, hemorragia, necrose hepática.

INTRODUÇÃO

Herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) foi originalmente isolado em 1964 como um agente fatal de cães neonatos (Carmichael et al. 1965). A infecção provoca lesões sistêmicas, caracterizadas por necrose e hemorragia em cães com menos de três semanas de idade (Comwell et al. 1969, Hashimoto et al. 1978). A transmissão aos filhotes pode ocorrer durante a passagem destes pelo canal do parto, pela via transplacentária ou pelas secreções oronasais da fêmea (Hashimoto et al. 1983, Ardans 2004). Em cães adultos, o CHV-1 ocasiona balanopostite em machos (Foster 2007) e pode provocar infertilidade, abortamento, natimortalidade e vulvovaginite em fêmeas (Hill & Maré 1974, Hashimoto et al. 1983, Smith 1997). Também foi descrita a presença do CHV-1 como agente etiológico de quadros respiratórios, associado a casos de rinite, faringite e traqueobronquite (Appel et al. 1969, Huxsoll & Hemelt 1970, Buonavoglia & Martella 2007).

Como importante característica do CHV-1, está o fato de esse apresentar-se em estado de latência, podendo ser ativado em casos de queda de imunidade, provocados por fatores de estresse, gestação, doenças prévias ou pela administração de corticosteroides (Okuda et al. 1993, Ronsse et al. 2004). Manifestações clínicas são esporádicas, porém a porcentagem de animais soropositivos na população canina é alta. Alguns trabalhos apontam uma prevalência de CHV-1 maior que 40% em determinadas populações (Rijsewijk et al. 1999, Ronsse et al. 2002). Em neonatos, o grave quadro clínico é atribuído a menor temperatura corporal dos caninos nesta faixa etária (Carmichael et al. 1969), sistema imunológico imaturo (Carmichael & Greene 2006) e a falta de anticorpos maternos transmitidos pelo colostro (Galosi 2007).

Diferentes relatos (Schwartz & Martin 1966, Huxtable & Farrow 1970, Nairn & Smith 1971, Watt et al. 1974, Love & Huxtable 1976, Hashimoto et al. 1978) e estudos experimentais foram publicados sobre a infecção neonatal de CHV-1 (Carmichael et al. 1965, Hashimoto et al. 1982).

Porém, a infecção neonatal por herpesvírus canino é pouco descrita no Brasil (Wouters et al. 2001).

O presente trabalho tem como objetivo descrever os sinais clínicos, os achados patológicos e os métodos de diagnóstico utilizados para a confirmação da infecção em duas ninhadas de cães pelo CHV-1. Embora relatos clínicos e patológicos anteriores já sugerissem a presença do agente na população canina do Brasil, este é o primeiro relato com identificação do agente no país.

MATERIAL E MÉTODOS

Onze cães de duas ninhadas, uma da raça Labrador (nove filhotes) e outra da raça Chow-Chow (dois filhotes), compostas de oito machos e três fêmeas, com idade de 10-20 dias, foram encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para realização de exame de necropsia. Os históricos clínicos dos filhotes e das cadelas foram obtidos junto aos proprietários e aos médicos veterinários responsáveis pelos casos. Alterações patológicas, observadas durante o exame de necropsia, foram identificadas e registradas. Coletou-se fragmentos de pulmões, fígado, rins, coração, adrenais, estômago, bexiga, linfonodos mesentéricos, baço, timo, medula óssea e encéfalo em solução de formalina tamponada. Posteriormente, realizou-se o processamento do material pelas técnicas histológicas de rotina e coloração dos cortes histológicos com hematoxilina e eosina (HE). Coletou-se pulmão e fígado de dois cães de cada ninhada para realização de cultivo bacteriano aeróbio. Amostras resfriadas de rim, fígado, baço e pulmão foram enviadas ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) de quatro cães da raça Labrador e de dois cães Chow-Chow. Nesse laboratório, o material foi submetido a tentativas de isolamento viral em cultivo celular em células CRFK (*Crandel feline kidney cells*) e à imunofluorescência direta (IFD) para o CHV-1. Para o isolamento, fragmentos dos tecidos foram macerados com areia estéril, ressuspendidos em meio de cultivo e centrifugados. Os sobrenadantes foram inoculados em tapetes de células CRFK e submetidos a três passagens de 4 dias cada, antes de serem considerados negativos para vírus. A IFD foi realizada em impressões dos tecidos sob lâminas de microscopia, fixadas em acetona gelada (por 5 min), e incubadas com um anticorpo policlonal anti-CHV-1 conjugado com fluoresceína (VMRD Inc., P.O. Box 502, Pullman, WA, USA). As lâminas foram observadas em um microscópio de luz ultravioleta. As temperaturas máxima, mínima, média da máxima e média da mínima da Cidade de Porto Alegre, RS foram obtidas durante o período do nascimento dos cães até o início dos sinais clínicos através de consulta ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET 2008).

RESULTADOS

Os cães afetados eram da raça Labrador, filhos de uma cadela de dois anos de idade, de primeira cria, nascidos em 21 de abril de 2007. Durante o parto nenhuma alteração foi observada. Após o nascimento, os cães ingeriram o colostro e nenhuma anormalidade foi identificada pela proprietária. Do parto até o início dos sinais clínicos, a cadela e os nove filhotes foram mantidos no canil. Os sinais clínicos iniciaram aos oito dias de idade, em dois

filhotes. Esses cães apresentaram inicialmente apatia, choro persistente e anorexia. Posteriormente, esses cães apresentaram intensa dispneia, letargia e morte em 48 horas após o início dos sinais clínicos. Nos sete outros filhotes desta ninhada, os mesmos sinais foram identificados progressivamente, resultando em morte de todos os cães em 24-72 horas após o início dos sinais clínicos, morrendo o último cão aos 17 dias de idade. Em dois filhotes, convulsões foram relatadas pelo médico veterinário responsável pelo caso. As temperaturas máxima e mínima registradas na Cidade de Porto Alegre foram de 31°C (média da máxima=27°C) e de 6°C (média da mínima = 14,6°C), respectivamente, no período do nascimento até o início dos sinais clínicos (21-28 de abril de 2007).

Os dois cães da raça Chow-Chow eram provenientes de uma ninhada de cinco cães, nascidos em 3 de julho de 2008, de uma segunda cria de uma cadela de três anos de idade. Nenhuma alteração foi observada no parto e nos primeiros dezessete dias de vida; os filhotes foram

criados no pátio da casa. Sinais clínicos iniciaram aos dezoito dias de idade em três cães, estes apresentaram grave dispneia, apatia e anorexia e morreram após 48 horas do início dos sinais clínicos. Os outros dois cães apresentaram, aos 22 dias de idade, sinais respiratórios brandos e se recuperaram após uma semana. No período do nascimento (3 de julho de 2008) até o início dos sinais clínicos (20 de julho de 2008) as temperaturas máxima e mínima registradas na Cidade de Porto Alegre foram de 31°C (média da máxima = 23,6°C) e 6°C (média da mínima = 10,8°C), respectivamente.

No exame dos cadáveres observou-se as mucosas oculares e oral com discreta palidez (5/11 cães). Nos rins, se visualizou hemorragia multifocal no córtex (9/11) (Fig.1) e na junção córtico-medular (2/11). A avaliação hepática revelou hepatomegalia (7/11), áreas pálidas no parênquima (6/11), variada quantidade de petéquias (5/11) (Fig.2) e inúmeros pontos brancos na superfície (4/11). Identificou-se esplenomegalia moderada a acentuada (9/11), in-



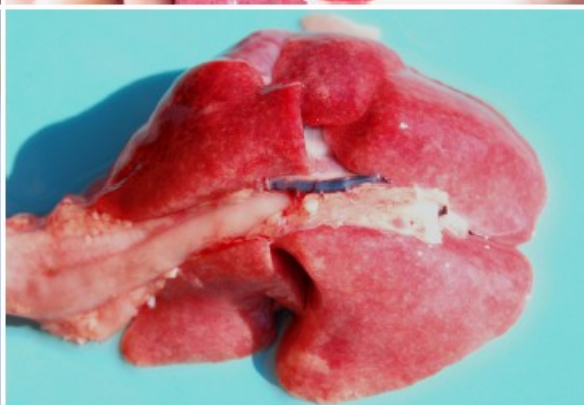
1



2



3



4

Fig.1. Típico aspecto dos rins de um cão com síndrome hemorrágica dos filhotes induzida naturalmente por herpesvírus canino tipo 1. Observe os múltiplos focos hemorrágicos na superfície capsular.

Fig.3. Múltiplos focos hemorrágicos na superfície capsular de um baço aumentado de volume em um cão infectado naturalmente por herpesvírus canino tipo 1.

Fig.2. Fígado pálido e com petéquias na superfície capsular em um cão infectado naturalmente por herpesvírus canino tipo 1.

Fig.4. Pulmões de um cão infectado naturalmente por herpesvírus canino tipo 1. O parênquima é não-colapsado, vermelho e apresenta numerosos pontos brancos na superfície pleural.

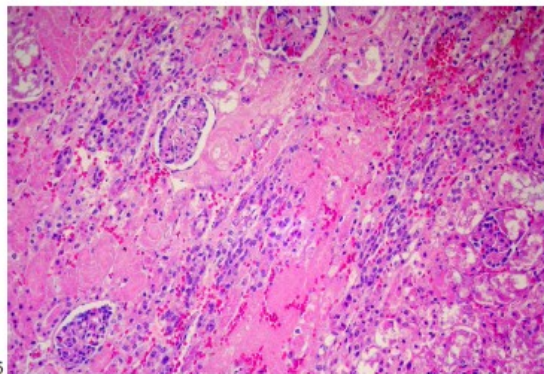


Fig. 5. Extensa área de necrose associada à discreta hemorragia no rim. HE, obj. 20x.

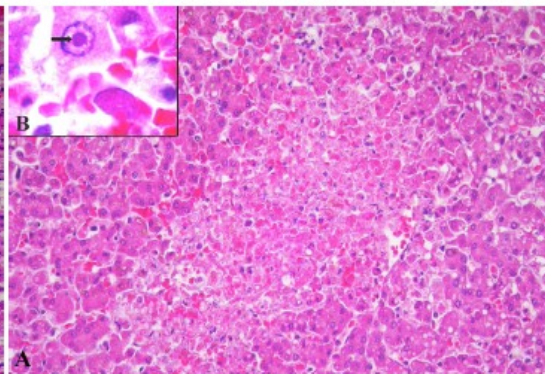
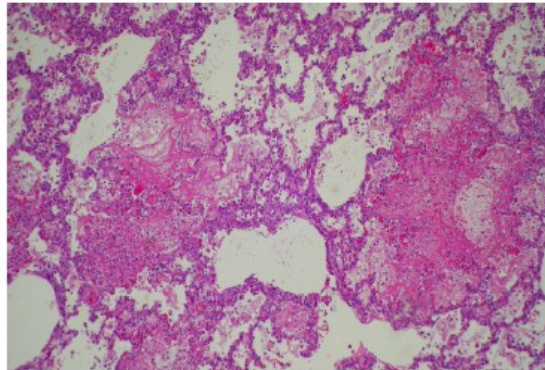


Fig. 6. (A) Foco necrótico e discreta vacuolização citoplasmática de hepatócitos adjacentes no fígado. HE, obj. 40x. (B) Corpúsculo de inclusão intranuclear (seta) no interior de hepatócito. HE, obj. 100x.

Fig. 7. Pneumonia fibrinonecrótica multifocal. HE, obj. 10x.



meras petéquias na superfície esplênica (5/11) (Fig. 3) e áreas escuras intercaladas por áreas mais claras na superfície do órgão (2/11). Um discreto aumento do volume dos linfonodos mesentéricos (8/11) foi visualizado. Na abertura da cavidade torácica, os pulmões se apresentaram não-colapsados, preenchendo grande parte do tórax (11/11). Ao toque, os pulmões (Fig. 4) se encontravam firmes (11/11), vermelhos (9/11) e na superfície pleural havia pontos brancos (5/11) e petéquias (3/11). Aumento discreto do timo foi visualizado (6/11) em associação a algumas petéquias e equimoses (5/11).

Necrose de coagulação multifocal acentuada (11/11) foi observada em células epiteliais tubulares do rim (Fig. 5). Nestas áreas necróticas, identificou-se hemorragia na cortical (9/11) e junção córtico-medular (2/11). Em grande parte dos casos nenhuma reação inflamatória foi identificada nas áreas adjacentes da necrose. Em dois casos nefrite intersticial mononuclear discreta foi identificada junto à área de necrose. Pequenos focos multifocais de necrose com distribuição aleatória foram observados no parênquima hepático (11/11) (Fig. 6). No fígado, havia ainda congestão (9/11), hemorragia (7/11), vasculite mononuclear (4/11), vacuolização de hepatócitos (3/11) e hepatite portal mononuclear ou mista (2/11). Nos pulmões, havia pneumonia fibrinonecrótica multifocal acentuada (Fig. 7) em todos os cães e focos de hemorragia em alguns (4/11). Adjacente às áreas necróticas, observou-se inflamação de intensidade variada, caracterizada por infiltrado misto com predomínio de macrófagos ou infiltrado mononuclear discreto representado por macrófagos e linfócitos. Necrose linfóide (10/11), hemorragia (9/11) e congestão (4/11) foram observadas no baço. Nos linfonodos

mesentéricos, visualizou-se necrose linfóide e/ou perda da estrutura folicular (9/11), hiperplasia folicular (4/11), congestão (4/11) e eritrofagocitose (3/11). No timo, visualizaram-se hiperplasia linfóide (7/11), congestão (5/

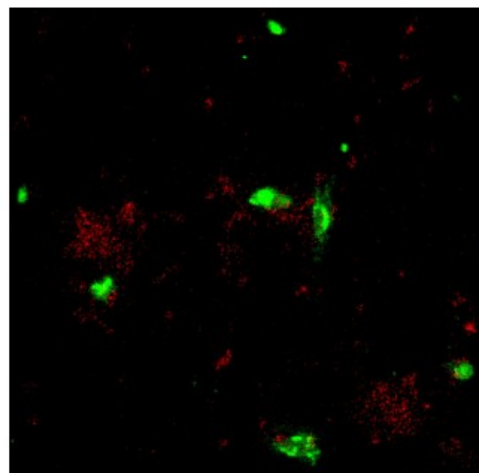


Fig. 8. Impressão do fígado. Células positivas para antígenos virais (herpesvírus canino tipo 1) coradas em verde. Imunofluorescência direta, obj. 10x.

11) e focos de hemorragia (5/11). No sistema nervoso central, observou-se mielite focal mononuclear (2/11), vasculite multifocal mononuclear no cérebro (2/11), encefalite focal mononuclear (1/11) e hemorragia focal (1/11). Focos necróticos na região medular da adrenal foram identificados em um cão. Raros corpúsculos de inclusão intranucleares de difícil localização foram visualizados na periferia de tecidos necróticos. Estes foram encontrados em hepatócitos (Fig.6) (5/11), células epiteliais de túbulos renais (4/11) e células alveolares (1/11).

Obteve-se resultado positivo na IFD para antígenos do CHV-1 nas seis amostras de tecido testadas. Células isoladas ou em pequenos focos (3-5 células) positivas para antígenos virais foram identificadas no baço e fígado (Fig.8). As tentativas de isolamento viral em células CRFK, no entanto, resultaram infrutíferas. O cultivo bacteriano aeróbio, de amostras obtidas do pulmão e fígado não apresentou crescimento.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de infecção por herpesvírus canino (CHV-1) foi baseado nos achados macroscópicos identificados na necropsia, na observação de lesões histológicas características com inclusões intranucleares em tecidos e pela confirmação do agente através da imunofluorescência direta (IFD) com conjugado específico. As descrições dos casos são semelhantes a outros relatos de infecção pelo CHV-1 em cães com menos de três semanas de idade (Carmichael et al. 1965, Watt et al. 1974, Kojima et al. 1989). Uma alta taxa de morbidade e mortalidade em cães jovens também foi identificada em outros estudos (Love & Huxtable 1976, Wouters et al. 2001). Isto demonstra a gravidade do quadro clínico e a possibilidade de transmissão a todos os cães da ninhada.

A menor temperatura corporal dos cães neonatos (cerca de 1-1,5°C mais baixa) é atribuída como fator predisponente de uma infecção fatal pelo CHV-1 (Carmichael et al. 1969). Esta observação é baseada na identificação da ótima temperatura de replicação do vírus (35-37°C) em cultivo celular (Carmichael et al. 1969). Em nossa observação, a temperatura externa também pode ter contribuído no desenvolvimento da infecção, pois condições climáticas e o local de alojamento favoreceram a uma menor temperatura corporal dos neonatos. Porém, em outro relato, a infecção foi diagnosticada em cães neonatos mantidos na temperatura ambiental de 39°C (Love & Huxtable 1976). Entretanto, a temperatura não é o único fator que pode favorecer a infecção. A imunidade transmitida pela mãe, através do colostro, também é um fator importante na patogenia da infecção pelo CHV-1 em neonatos (Carmichael & Greene 2006). Na presença de mães soronegativas, fêmeas infectadas que não produzam anticorpos, os filhotes provenientes destas cadelas tendem a ter sinais clínicos mais graves (Carmichael & Greene 2006, Galosi 2007). Outro fator, que contribui para uma grave infecção sistêmica, está relacionado à imaturidade do sistema imunológico de cães com poucas sema-

nas de vida (Carmichael & Greene 2006). Nestes dois surtos, após a morte dos cães, os proprietários optaram por castrar as duas fêmeas como medida preventiva da transmissão do CHV-1 através da reprodução ou de futuras perdas da ninhada pela infecção.

Hemorragias podem ser identificadas no rim, pulmão, fígado, baço, estômago, intestino e timo de cães infectados pelo CHV-1 (Kojima et al. 1989, Wouters et al. 2001). Esta alteração é observada pela ocorrência de vasculite e a pela trombocitopenia (Carmichael & Greene 2006). Entre os locais anatômicos, a hemorragia do córtex renal tem sido descrita como a mais característica nas infecções por CHV-1 em neonatos (Cornwell & Wright 1969).

A visualização de corpúsculos de inclusão intranuclear se apresentou de difícil localização e com baixo número de observações. Este achado foi descrito por outros autores (Schwartz & Martin 1966, Love & Huxtable 1976, Wouters et al. 2001), assim como a ausência de corpúsculos de inclusão intranuclear também foi relatada (Huxtable & Farrow 1970). Frequentemente os corpúsculos de inclusão intranucleares podem estar ausentes, mesmo na ocorrência de severas lesões histológicas (Cornwell & Wright 1969).

Neste estudo, a identificação de lesões neurológicas teve baixa ocorrência e baixa intensidade. Estes resultados podem estar relacionados ao rápido desenvolvimento e gravidade das lesões identificadas em outros órgãos. Nesses casos, ocorre a morte do cão antes de ocorrer lesões no sistema nervoso central (Carmichael & Greene 2006). Focos de necrose da adrenal, como visto em um dos cães deste relato, raramente são descritos em neonatos acometidos pelo CHV-1 (Carmichael et al. 1965).

CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados, conclui-se que as lesões vistas nestes filhotes de cães foram provocadas pela infecção neonatal pelo CHV-1, que provocou a morte em um curto período de tempo, caracterizando-se por uma alta taxa de morbidade e mortalidade.

A confirmação laboratorial da identidade do agente (através da IFD) demonstra a presença e circulação do vírus na população canina do país e pode indicar a necessidade da adoção de medidas profiláticas, incluindo a vacinação.

Agradecimentos.- Aos demais membros do SPV-UFRGS, pelo auxílio técnico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Appel M.J.G., Menegus M., Parsonson I.M. & Carmichael L.E. 1969. Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5 to 12-week-old pups. *Aust. Vet. J.* 30:2067-2073.
- Ardans A.A. 2004. Herpesviridae, p.320-332. In: Hirst D.C., MadLachlan N.J. & Walker R.L. (Eds), *Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Blackwell, Ames.
- Buonavoglia C. & Martella V. 2007. Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 38:355-373.

- Camichael L.E. & Greene C.E. 2006. Canine herpesvirus, p.47-53. In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd ed. W.B. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Camichael L.E., Barnes F.D. & Percy D.H. 1969. Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *J. Infect. Dis.* 120:669-678.
- Camichael L.E., Squire R.A. & Krook L. 1965. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *Am. J. Vet. Res.* 26:803-814.
- Cornwell H.J.C. & Wright N.G. 1969. Neonatal canine herpesvirus infection: A review of present knowledge. *Vet. Rec.* 84:2-6.
- Cornwell H.J.C., Wright N.G., Campbell R.S.F. & Roberts R.J. 1969. Neonatal disease in the dog associated with a herpes-like virus. *Vet. Rec.* 79:661-662.
- Foster R.A. 2007. Male reproductive system, p.1317-1348. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- Galosi C.M. 2007. Herpesvirus canino 1: Agente etiológico y enfermedad. *Analecta Vet.* 27:5-12.
- Hashimoto A., Hirai K., Miyoshi A., Shimakura S., Yagami K., Kato N., Kunihiro K., Fujiura A., Kitazawa K., Okada K. & Fujimoto Y. 1978. Naturally occurring canine herpesvirus infection in Japan. *Japn. J. Vet. Sci.* 40:157-169.
- Hashimoto A., Hirai K., Suzuki Y. & Fujimoto Y. 1983. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 44:610-614.
- Hashimoto A., Hirai K., Yamaguchi T. & Fujimoto Y. 1982. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 43:844-850.
- Hill H. & Maré C.J. 1974. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Aust. Vet. J.* 35:669-672.
- Huxsoll D.L. & Hemelt I.E. 1970. Clinical observations of canine herpesvirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156:1706-1713.
- Huxtable C.R. & Farrow B.R.H. 1970. Canine herpesvirus as a suspected cause of neonatal mortality in puppies. *Aust. Vet. J.* 46:344-355.
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). 2008. Mapas de condições registradas. <http://www.inmet.gov.br/html/clima.php#>. Consultado em 4.11.2008.
- Kojima A., Fujinami F., Takeshita M., Minato Y., Yamamura T., Imaizumi K. & Okaniwa Y. 1989. Outbreak of neonatal canine herpesvirus infection in a specific pathogen-free beagle colony. *Japn. J. Vet. Sci.* 52:145-154.
- Love D.N. & Huxtable C.R.R. 1976. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. *Vet. Rec.* 99:501-503.
- Nairn M.E. & Smith V.W. 1971. Canine herpesvirus from a pup in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 47:463.
- Okuda Y., Ishida K., Hashimoto A., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K. & Camichael L.E. 1993. Virus reactivation in bitches with medical history of herpesvirus infection. *Am. J. Vet. Res.* 54:551-554.
- Rijsewijk F.A.M., Luiten E.J., Daus F.J., van der Heijden R.W. & van Oirschot J.T. 1999. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in the Netherlands in 1997-1998. *Vet. Microbiol.* 65:1-7.
- Ronsse V., Verstegen J., Ondin K., Frédéric F. & Poulet H. 2004. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theiogenology* 61:619-636.
- Ronsse V., Verstegen J., Ondin K., Guiot A.L., Aeberlé C., Nauwynck H.J. & Poulet H. 2002. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod. Domest. Anim.* 37:299-304.
- Schulze C. & Baumgärtner W. 1998. Nested polymerase chain reaction and situ hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. *Vet. Pathol.* 35:209-217.
- Schwartz W.L. & Martin W.D. 1966. Canine herpesvirus infection of puppies. *Vet. Med.* 61:1171-1173.
- Smith K.C. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.* 153:253-268.
- Watt D.A., Spradbrow P.B. & Lamberth J.L. 1974. Neo-natal mortality of puppies in Queensland caused by canine herpesvirus infection. *Aust. Vet. J.* 50:120-122.
- Wouters F., Varaschin M.S. & Wouters A.T.B. 2001. Herpesvirus canino: descrição de casos espontâneos. *Anais do 10^o Enapave, Pirassununga, SP*, p.127. (Resumo)

4.3 Artigo 2

Título: Hepatite infecciosa canina em cães naturalmente infectados: achados patológicos e diagnóstico imuno-histoquímico.

Autores: Eduardo C. Oliveira, Paula R. Almeida, Luciana Sonne, Saulo P. Pavarini, Tatiane T. N. Watanabe e David Driemeier.

Revista: Pesquisa Veterinária Brasileira. Aceito para publicação em 27 de dezembro de 2010, volume 31, 2011.

Trabalho 1984 PA
(Adapt.p.PVB, 15.6.10)

Hepatite infecciosa canina em cães naturalmente infectados: achados patológicos e diagnóstico imuno-histoquímico¹

Eduardo C. Oliveira², Paula R. Almeida², Luciana Sonne², Saulo P. Pavarini², Tatiane T.N. Watanabe² e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Oliveira E.C., Almeida P.R., Sonne L., Pavarini S.P., Watanabe T.T.N. & Driemeier D. 2011. [**Infectious canine hepatitis in naturally infected dogs: pathological findings and immunohistochemical diagnosis.**] Hepatite infecciosa canina em cães naturalmente infectados: achados patológicos e diagnóstico imuno-histoquímico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

Twenty three dogs with infectious canine hepatitis (ICH) were analysed based on general data, clinicopathological findings, and immunohistochemistry. The main gross lesions observed were hepatic paleness (17/23), hepatomegaly (10/23), and hemorrhage (21/23). Gallbladder edema (11/23), fibrinous material on the hepatic capsular surface (8/23), and jaundice (6/23) were also observed. Severe hepatic necrosis was observed in association with amphophilic or basophilic intranuclear inclusions inside hepatocytes and endothelial cells (22/23). Splenic and nodal lymphoid necrosis and hemorrhage associated with small number of intranuclear inclusions inside reticuloendothelial cells were identified. Immunohistochemistry (IHC) was positive for adenovirus type 1 in all animals, with the best staining pattern occurring in the liver (23/23), brain (22/22),

¹ Recebido em 15 de junho de 2010.

Aceito para publicação em 15 de outubro de 2010.

Parte da tese de Doutorado do primeiro autor.

²Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

cerebellum (16/20), and kidney (16/21). Greater amount of viral antigen was identified in hepatocytes and vascular endothelial cells from the brain and glomerular tuft.

INDEX TERMS: Hepatitis, dogs, necrosis, hemorrhage, immunohistochemistry.

RESUMO.- Vinte e três cães com hepatite infecciosa canina (HIC) foram analisados com base nos seus dados gerais, achados clínicos, patológicos e imuno-histoquímicos. As principais lesões macroscópicas encontradas foram palidez do fígado (17/23), hepatomegalia (10/23) e hemorragia (21/23). Observou-se também edema da parede da vesícula biliar (11/23), malhas de fibrina cobrindo a superfície capsular hepática (8/23) e icterícia (6/23). Acentuada necrose hepatocelular foi encontrada associada à identificação de corpúsculos intranucleares anfílicos e basofílicos em hepatócitos e células endoteliais (22/23) característicos de adenovírus. Identificou-se no baço e linfonodos necrose linfóide, hemorragia e menor ocorrência de corpúsculos intranucleares em células reticuloendoteliais. A imuno-histoquímica (IHQ) foi positiva para adenovírus canino tipo 1 em todos os animais analisados. Os principais órgãos positivos na IHQ foram fígado (23/23), telencéfalo (22/22), cerebelo (16/20) e rim (16/21). Maior marcação de antígenos viral foi observada em hepatócitos e no endotélio vascular do encefalo e dos tufo glomerulares renais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Hepatite, cães, necrose, hemorragia, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

A hepatite infecciosa canina (HIC) é uma doença viral sistêmica causada pelo adenovírus canino tipo 1 (CAV-1) (Decaro et al. 2008) e acomete principalmente cães jovens e não vacinados (Timoney et al. 1988). Como importante característica, o CAV-1 possui tropismo por hepatócitos e células endoteliais (Zee & MacLachlan 2004), resultando em grave quadro clínico devido à necrose hepatocelular e hemorragia sistêmica (Greene 2006, Decaro et al. 2008).

A HIC foi diagnosticada primeiramente em cães em 1930 (Decaro et al. 2008) e com o decorrer dos anos se tornou uma doença comum e amplamente diagnosticada em diferentes países (Carvalho et al. 1975). Com a utilização de vacinas para a prevenção da doença, a ocorrência de HIC apresenta-se reduzida pelo mundo e atualmente é mais

descrita em países sem adequados programas de vacinação ou que não apresentam um controle de importação de animais (Decaro et al. 2007, Decaro et al. 2008).

O objetivo deste trabalho é descrever as características gerais, os achados clínico-patológicos e o diagnóstico por imuno-histoquímica (IHQ) de 23 casos de HIC diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) entre 1996 e 2009.

MATERIAL E MÉTODOS

Registros de necropsias realizadas em cães no SPV-UFRGS foram revisados do período de janeiro de 1996 a dezembro de 2009 para identificar cães diagnosticados com HIC. Todos os diagnósticos foram baseados em achados histológicos de HIC. Dados gerais, histórico e achados patológicos dos cães com HIC foram registrados e analisados. Informações referentes ao sexo, raça, idade, ano da realização da necropsia, sinais clínicos, suspeita clínica e estado vacinal dos cães foram buscadas. Como diagnóstico complementar, realizou-se a identificação de antígeno viral pela técnica de IHQ em cortes histológicos de fígado, rim, pulmão, baço, linfonodo mesentérico, timo, telencéfalo e cerebelo. A técnica foi realizada pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. Inibição da peroxidase foi realizada com peróxido de hidrogênio a 10% em solução de metanol durante 30 minutos. A recuperação antigênica ocorreu com a utilização de proteinase K *ready-to-use* (S3020, DakoCytomation) por 1 minuto. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com leite em pó por 20 minutos. Para diagnóstico de HIC, utilizou-se anticorpo monoclonal para adenovírus canino tipo 1 (VMRD - 2E10-H2) na diluição de 1:400 durante o período de 14-16 horas (*overnight*) a 4°C. Após esta fase, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado ligado a estreptavidina-peroxidase (*kit* LSAB - K0690, DakoCytomation) durante um período total de 40 minutos. Como cromógeno utilizou-se o 3,3'-diaminobenzidina (DAB - K3468, DakoCytomation) durante um minuto.

RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 1996 a dezembro de 2009 realizaram-se 23 diagnósticos de HIC, de um total de 6.993 necropsias em cães realizadas no SPV-UFRGS, representando 0,34% das necropsias de cães. Foram afetados 13 fêmeas e 10 machos. A idade foi informada em 21 casos, obtendo-se uma média de 6,26 meses, variando de 45 dias a 3 anos. Animais sem raça definida representaram 52,17% dos casos e cães com raça 47,83% das necropsias. Em 14 casos, informações quanto ao programa de vacinação foram relatadas pelo médico veterinário ou proprietário. Desses, nove

animais não receberam nenhuma dose de vacina polivalente canina (apresenta antígeno vacinal de adenovírus), dois cães receberam três doses desse tipo de vacina, dois filhotes receberam uma dose e um cão recebeu duas doses. A suspeita clínica, informada pelo veterinário ou proprietário, foi relatada em 15 casos. As duas principais suspeitas clínicas relatadas foram parvovirose canina (4/15) e leptospirose (4/15), e em somente um caso foi cogitada a possibilidade de HIC. Em 19 cães informações do histórico clínico foram dadas na requisição de necropsia. Os principais sinais clínicos relatados no histórico foram apatia (11/19), anorexia (8/19), icterícia (5/19) e diarreia (4/19). Dados gerais do animal, o ano da realização da necropsia e informações clínicas estão descritas no Quadro 1.

Achados macroscópicos

O exame de necropsia identificou alterações macroscópicas hepáticas em todos os cães (Quadro 1), caracterizadas principalmente por palidez (17/23) e friabilidade (13/23), hepatomegalia (10/23), focos de hemorragia (5/23) e acentuação do padrão lobular (5/23). Observou-se discreto material fibrinoso na superfície capsular hepática e entre os lóbulos (8/23) e edema da parede da vesícula biliar (11/23). Diarreia ocorreu em dez animais e nesses casos se apresentava hemorrágica em sete. Icterícia foi observada em parte das necropsias (6/23). Grande parte dos casos (21/23) cursou com hemorragia em diferentes órgãos. O principal órgão acometido por essa alteração foi o intestino delgado (10/23), que apresentou hemorragia na luz e em alguns casos petéquias e equimoses na serosa e/ou mucosa. Observou-se hemorragias também na mucosa e/ou serosa do estômago (6/23), timo (6/23), pulmões (5/23), peritônio (4/23), pele (4/23), fígado (3/23), coração (3/23), encéfalo (3/23), subcutâneo (1/23), mesentério (1/23) e na serosa do cólon (1/23). Identificou-se serosa intestinal rugosa em 39,13% (9/23) das necropsias, além de hiperemia da serosa e mucosa (5/23) e placas de Peyer evidentes (4/23). No exame macroscópico de órgãos linfoides abdominais, observou-se esplenomegalia (15/23) e aumento de linfonodos mesentéricos (14/23). Havia também edema tímico (4/23), pulmonar (3/23), hidrotórax (2/23), ascite (2/23) e no tecido subcutâneo (2/23).

Achados microscópicos

A avaliação histológica apresentou variação no número de órgãos analisados. A descrição das lesões é seguida pela análise numérica, seguindo a regra (número de casos

com a lesão/número de cortes histológicos analisados). No fígado encontrou-se necrose hepatocelular acentuada (23/23), com padrão centrolobular (14/23), massivo (5/23) e aleatório (4/23). Outros achados no fígado incluíam congestão (13/23), hemorragia (10/23), leve infiltrado inflamatório formado por macrófagos e linfócitos ou misto (9/23), leve colestase (5/23) e vasculite linfoplasmocitária (3/23). As lesões microscópicas hepáticas identificadas em cada caso de HIC estão apresentadas no Quadro 2. Na vesícula biliar, somente foi observado edema na submucosa (8/13) associado à dilatação de vasos e autólise em grau variado.

Cortes histológicos de linfonodos mesentéricos revelaram necrose acentuada de células foliculares e parafoliculares (14/19), infiltrado de histiócitos (15/19), hemorragia (9/19), eritrofagocitose (8/19), rarefação linfoide (6/19) e hiperplasia linfoide (3/19). No baço identificou-se hemorragia (10/21), necrose linfoide (9/21), rarefação linfoide (8/21), infiltrado de histiócitos (6/21) e eritrofagocitose (3/21). No timo havia congestão acentuada (8/18), necrose linfoide (5/18), focos de hemorragia (6/18), rarefação linfoide moderada (4/18), edema interlobular (4/14) e hiperplasia linfoide da região cortical (3/14). Na avaliação pulmonar, identificou-se congestão (9/22), infiltrado inflamatório alveolar formado por linfócitos, macrófagos, plasmócitos ou misto (8/22), focos de hemorragia (6/22) e edema alveolar de grau variado (7/22). A histologia renal revelou congestão (8/21), degeneração tubular (5/21), glomerulonefrite membranosa discreta (4/21) e focos de hemorragia (3/21). No intestino delgado, observou-se necrose e rarefação linfoide nas placas de Peyer (7/19) e infiltrado de linfócitos discreto na mucosa (4/19). No encéfalo, havia congestão de vasos superficiais do córtex (8/22), vacuolização discreta multifocal da substância branca (6/22), raros focos de vasculite linfocitária (6/22), hemorragia multifocal de grau variado (5/22) e necrose focal do neurópilo em área adjacente a hemorragia (2/22).

Corpúsculos intranucleares basofílicos e anofílicos característicos de adenovírus foram identificados em grande parte dos casos (22/23). O fígado foi o principal órgão na identificação de corpúsculos, apresentando-se grande número (12/23), pequeno número (8/23), moderado número (2/23) ou nenhum corpúsculo em um caso. Os corpúsculos de inclusão intranucleares foram encontrados principalmente em hepatócitos e em menor grau nas células de Kupffer e no endotélio vascular (em poucos casos ocorrendo no endotélio glomerular renal, encefálico e tímico). Identificou-se reduzido número de corpúsculos intranucleares em células reticuloendoteliais do baço e de linfonodos mesentéricos.

Exame imuno-histoquímico

O resultado da IHQ foi positivo para adenovírus canino tipo 1 em todos os cães. Entre os órgãos testados, os melhores resultados foram obtidos no fígado (23/23), telencéfalo (22/22), cerebelo (16/20) e rim (16/21) (Quadro3). No fígado, antígeno viral foi identificado em maior número em hepatócitos, com marcação no citoplasma, núcleo e em corpúsculos de inclusão intranucleares. Porém, alguns corpúsculos de inclusão intranucleares não se apresentavam marcados. Observaram-se também marcação em células de Kupffer e ocasionalmente no endotélio vascular. No diagnóstico do animal que não apresentava corpúsculos de inclusão intranucleares no corte histológico de fígado, identificou-se hepatócitos marcados positivamente para CAV-1. No rim, marcação foi obtida unicamente em células endoteliais dos tufos glomerulares. No encéfalo, antígeno de CAV-1 foi identificado no endotélio vascular, com forte marcação do citoplasma, núcleo e corpúsculos de inclusão intranucleares. Em órgãos linfoides, observou-se menor número de cortes histológicos positivos para CAV-1 e baixa quantidade de linfócitos ou células endoteliais marcadas positivamente.

DISCUSSÃO

Durante o período de análise, os óbitos devido à hepatite infecciosa canina (HIC) representaram reduzido número nas necropsias do SPV-UFRGS. Resultado semelhante foi identificado por Inkelmann et al. (2007), que encontrou HIC em 1,2% dos diagnósticos numa avaliação de 5.361 necropsias de cães na região central do Rio Grande do Sul. Entretanto, os casos apresentados, relacionados com o aumento do número de casos, principalmente nos últimos dois anos (39,13% dos casos analisados), podem estar associados a um deficiente programa de vacinação. Na avaliação vacinal dos cães, observou-se a doença em animais vacinados, mesmo tendo as três doses recomendadas. Esse resultado pode estar relacionado a uma menor qualidade da vacina aplicada ou a um deficiente estado imunológico dos animais. Fatores como inadequada conservação da vacina, modo de aplicação, intervalos entre as aplicações e estresse do animal podem ter contribuído para a ocorrência da infecção (Greene & Schultz 2006).

A idade jovem encontrada na maior parte dos cães também é apresentada em outras publicações, indicando uma maior sensibilidade de jovens em adquirir a HIC (Studdert & Studdert 1972, Decaro et al. 2007, Inkelmann et al. 2007). Entretanto, o acometimento de caninos maiores de um ano também é descrita, podendo ocorrer pela

não vacinação ou por um estado imunológico menos eficiente (Greene 2006, Inkelmann et al. 2007).

A suspeita clínica de HIC somente estava presente no histórico de um cão. Esse resultado pode estar relacionado à dificuldade de realizar um diagnóstico clínico de HIC, provavelmente devida ao curso agudo da doença, ou ao fato de que a HIC pode apresentar sinais clínicos inespecíficos ou alterações que são observadas em outras doenças de maior casuística. Dessa forma, os sinais apresentados em um caso de HIC podem apresentar semelhanças a casos de parvovirose canina. Além disso, juntamente a alterações hepáticas agudas observadas na HIC, alguns achados macroscópicos de HIC também são encontrados em casos de parvovirose canina, como diarreia hemorrágica, serosa intestinal rugosa e alterações linfóides (Gelberg 2007). Com isso, durante a necropsia, os achados comumente apresentados por essas doenças confirmam um quadro clínico e patológico semelhante e que somente será confirmado por meio de análise histológica e/ou por diagnóstico complementar.

A avaliação do padrão de necrose hepática revelou um predomínio de necrose centrolobular, padrão descrito em infecções por CAV-1 (Stalker & Hayes 2007, Decaro et al. 2008), porém outros padrões de necrose hepática, como aleatória, foram identificados. Esses achados também foram descritos por Inkelmann et al. (2007). Hemorragias em diferentes locais anatômicos se apresentaram comumente durante a necropsia. Essa alteração é ocasionada pelo desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada (CID) provocada pela trombocitopenia, pelo aumento no tempo de protrombina e diminuição dos fatores de coagulação (Greene 2006, Decaro et al. 2008). Essas anormalidades são desencadeadas pela lesão do CAV-1 no endotélio, com ativação da coagulação pela exposição de substâncias pró-coagulantes no subendotélio, provocando uma coagulopatia de consumo com a utilização de plaquetas e fatores de coagulação (Stalker & Hayes 2007).

Outros achados patológicos como icterícia, edema de vesícula biliar e depósito de fibrina na superfície hepática podem ser identificados no exame de necropsia, auxiliando o diagnóstico de HIC. Porém, a ocorrência destas lesões é menor (Greene 2006, Inkelmann et al. 2007). O resultado apresentado na vesícula biliar difere de Cornwell & Wright (1969), que em estudo experimental de HIC em filhotes, observaram edema de vesícula biliar em muitos cães. Algumas possibilidades são colocadas para a formação do edema, como aumento da pressão portal, diminuição da pressão osmótica ou combinação de ambos os fatores (van Breda Vriesman et al. 2007).

O diagnóstico complementar pela IHQ foi eficaz na identificação do CAV-1 em cortes histológicos. Em um caso, auxiliou o diagnóstico de HIC na ausência de corpúsculos de inclusão intranucleares. A identificação de antígeno viral, principalmente em hepatócitos e no endotélio vascular, confirma o tropismo do CAV-1 por esses locais, ajudando no entendimento da patogenia da HIC. Marcação por IHQ não foi identificada em todos os corpúsculos de inclusão intranucleares que caracterizam a infecção pelo CAV-1, resultado também observado em outros trabalhos de HIC que utilizaram a IHQ como ferramenta de diagnóstico (Rakich et al. 1986, Crouinard et al. 1998, Inkelmann et al. 2008). Segundo Rakich et al. (1986), corpúsculos de inclusões são formados por uma matriz amorfa com variada quantidade de material viral, podendo conter estruturas virais antigenicamente diferentes e dessa forma podem não ligar ao anticorpo específico de CAV-1.

Alterações linfoides foram observadas em diferentes órgãos e associadas à identificação histológica do CAV-1 pela IHQ também demonstraram o tropismo viral por células linfoides. Esses resultados também foram descritos em outros estudos com a identificação de achados patológicos e a identificação viral em cortes histológicos (Cornwell & Wright 1969, Inkelmann et al. 2007, Inkelmann et al. 2008).

Agradecimentos.- Ao demais membros do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS pelo auxílio técnico. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Carvalho R.P.S., Soborg F. & Souza V.A.U.F. 1975. Canine hepatitis virus infections in dogs of São Paulo city, Brazil. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 42:93-98.
- Cornwell H.J.C. & Wright N.G. 1969. The pathology of experimental infectious canine hepatitis in neonatal puppies. *Res. Vet. Sci.* 10:156-160.
- Crouinard L., Martineau D., Forget C. & Girad C. 1998. Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis or cirrhosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:320-325.
- Decaro N., Campolo M., Elia G., Buonavoglia D., Colaianni M.L., Lorusso A., Mari V. & Buonavoglia C. 2007. Infectious canine hepatitis: An “old” disease reemerging in Italy. *Res. Vet. Sci.* 83:269-273.

- Decaro N., Martella V. & Buonavoglia C. 2008. Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet. Clin. Small Anim.* 38:799-814.
- Gelberg H.B. 2007. Alimentary system, p.378-380. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis. 1476p.
- Greene C.E. 2006. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis, p.41-53. In: *Ibid.* (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3d ed. Saunders Elsevier, St Louis. 1387p.
- Greene C.E. & Schultz R. D. 2006. Immunoprophylaxis, p.1069-1119. In: Greene C.E. (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3d ed. Saunders Elsevier, St Louis. 1387p.
- Inkelmann M.A., Anjos B.L., Kommers G.D., Figuera R.A. & Barros C.S.L. 2008. Aspectos imunoistoquímicos da hepatite infecciosa canina. *Ciência Rural* 38:2636-2640.
- Inkelmann M.A., Rozza D.B., Figuera R.A., Kommers G.D., Graça D.L., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2007. Hepatite infecciosa canina: 62 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 27:325-332.
- Rakich P.M., Prasse K.W. Lukert P.D. & Cornelius L.M. 1986. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. *Vet. Pathol.* 23:478-484.
- Sari R., Yildirim B., Sevinc A., Bahceci F. & Hilmioglu F. 2002. Gallbladder contractility in patients with cirrhotic versus malignant ascites. *J. Clin. Ultrasound.* 30:477-480.
- Stalker M.J. & Hayes M.A. 2007. Liver and biliary system. In: Maxie, M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, p.297-388. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 771p.
- Studdert M.J. & Studdert V.P. 1972. Recovery of infectious canine hepatitis virus from dogs with different clinical syndromes. *Aust. Vet. J.* 48:554-557.
- Timoney J.F., Gillespie J.H., Scott F.W. & Barlough J.E. 1988. The adenoviridae, p.532-551. In: *Ibid.* (Eds), *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8th ed. Cornell University Associates, New York. 951p.
- Van Breda Vriesman A.C., Engelbrecht M.R., Smithuis R.H.M. & Puylaert J.B.C.M. 2007. Diffuse gallbladder wall thickening: differential diagnosis. *Am. J. Roentgenol.* 188:495-501.
- Zee Y.C. & MacLachlan N.J. 2004. Adenoviridae, p.317-319. In: Hirsh D.C., MacLachlan N.J. & Walker R.L. (Eds), *Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Blackwell Publishing, Iowa.

Quadro 1. Distribuição dos casos de hepatite infecciosa canina diagnosticados com o ano da realização da necropsia, dados gerais e informações clínicas dos 23 cães, período de análise 1996 a 2009

Caso	Ano da necropsia	Raça	Sexo	Idade	Vacinação	Suspeita clínica	Histórico e sinais clínicos
1	1998	SRD	Fêmea	12 meses	NV	NR	NR
2	2003	SRD	Fêmea	36 meses	NR	NR	Edema subcutâneo e anorexia.
3	2005	Chow Chow	Fêmea	2 meses	NR	Intoxicação	Quadro clínico de um dia com apatia, vômitos, hipertemia e convulsões.
4	2005	Pit Bull	Macho	NR	NR	NR	NR
5	2005	SRD	Fêmea	4 meses	NV	Babesiose ou leptospirose	Apatia e anorexia.
6	2005	Boxer	Fêmea	45 dias	NV	Parvovirose canina	Quadro clínico de 2 dias com vômitos e mucosas pálidas.
7	2006	SRD	Fêmea	NR	NR	HIC ou leptospirose	Quadro clínico de poucas horas com icterícia e fezes com sangue.
8	2006	SRD	Fêmea	4 meses	3 doses	Babesiose ou cinomose	Quadro clínico de 3 dias com icterícia, anorexia e dificuldade de locomoção.
9	2006	Poodle	Fêmea	2 meses	1 dose	NR	Quadro clínico de poucas horas com apatia e anorexia.
10	2006	Labrador	Macho	3 meses	NV	Verminose	Apatia, convulsões e mucosas pálidas.
11	2008	SRD	Fêmea	5 meses	3 doses	NR	Apatia e diarreia.
12	2008	SRD	Macho	2 meses	NV	Intoxicação	Encontrado morto, sem sinais clínicos anteriores.
13	2008	SRD	Macho	3 meses	NV	NR	Apatia, anorexia e icterícia.
14	2008	SRD	Macho	2 meses	NV	Parvovirose canina	Apatia, hipotermia, diarreia e mucosas pálidas.
15	2009	Yorkshire	Macho	2 meses	NV	Parvovirose canina	Fezes pastosas e com sangue.
16	2009	Pastor Alemão	Fêmea	4 meses	2 doses	Parvovirose canina	Anorexia e diarreia.
17	2009	Shih Tzu	Macho	2 meses	1 dose	NR	Anorexia, apatia e morte em 2 dias.
18	2009	SRD	Macho	1 mês	NR	Leptospirose	Apatia, icterícia e petéquias na pele.
19	2009	Poodle	Fêmea	2 meses	NR	NR	NR
20	2009	SRD	Fêmea	3 meses	NV	Leptospirose	Apatia, icterícia e dispneia.
21	2009	SRD	Macho	2 meses	NR	NR	NR
22	2009	Pastor Alemão	Fêmea	3 meses	NR	Parvovirose canina	Apatia, anorexia, mucosas pálidas e diarreia com sangue.
23	2009	Yorkshire	Macho	36 meses	NR	Intoxicação	Quadro clínico de um dia e com convulsões.

SRD = sem raça definida, NV = não vacinado, NR = não relatado, HIC = hepatite infecciosa canina.

Quadro 2. Identificação de edema da vesícula biliar, alterações macroscópicas e histológicas do fígado dos 23 cães com hepatite infecciosa canina

Caso	Edema de vesícula	Macroscopia fígado	Microscopia fígado						
			NE	CI	CO	HE	CL	VA	HT
1	+	Aumentado, pálido e friável.	+	+	+	+	-	-	-
2	-	Friável, fibrina e manchas brancas.	+	+	+	+	-	-	-
3	-	Pálido e friável.	+	+	+	-	+	+	+
4	-	Pálido.	+	+	+	-	-	-	-
5	-	Aumentado, pálido, padrão lobular evidente e com áreas vermelhas.	+	+	-	+	-	-	+
6	-	Pálido, friável, fibrina e com padrão lobular evidente.	+	+	+	+	-	-	-
7	+	Aumentado, pálido, friável e com padrão lobular evidente.	+	+	-	+	+	-	+
8	-	Pálido e friável.	+	+	+	-	+	+	+
9	+	Aumentado, pálido, friável e com pontos brancos.	+	+	+	+	-	-	-
10	+	Aumentado, pálido, friável e com padrão lobular evidente.	+	+	+	+	-	-	-
11	-	Pálido.	+	+	+	-	-	-	+
12	+	Aumentado, pálido, friável e com fibrina.	+	+	+	+	+	-	+
13	-	Pálido e friável.	+	+	-	-	+	+	+
14	+	Aumentado, pálido, friável e com fibrina.	+	+	-	-	-	-	-
15	+	Aumentado, pálido, friável e com fibrina.	+	+	-	-	+	-	+
16	+	Aumentado	+	+	+	-	-	-	-
17	-	Aumentado, pálido, friável e com padrão lobular evidente.	+	+	-	-	+	-	-
18	-	Friável.	+	+	-	+	-	-	-
19	+	Aumentado, pálido, friável.	+	+	+	+	+	-	-
20	-	Friável.	+	+	-	-	-	-	-
21	+	Aumentado.	+	+	-	-	-	-	-
22	-	Aumentado, pálido, friável.	+	+	+	-	+	-	+
23	+	Padrão lobular evidente.	+	-	-	+	+	-	+

NE = necrose, CI = corpúsculo de inclusão intranuclear, CO = congestão, HE = hemorragia, CL = colestase, VA = vasculite, HT = hepatite, (+) = presente, (-) = ausente.

Quadro 3. Resultados dos testes imuno-histoquímicos em diferentes órgãos nos 23 cães com hepatite infecciosa canina

Caso	Fígado	Rim	Baço	Linfonodo	Timo	Pulmão	Cérebro	Cerebelo
1	+++ ^a	+++	NA	NA	NA	-	+++	NA
2	+	+	+	NA	NA	NA	+	+
3	+	+	-	NA	NA	-	++	++
4	+++	NA	++	-	-	-	+	+
5	++	+	+	-	-	-	+	+
6	+	+	-	++	-	-	++	-
7	++	++	-	-	-	-	NA	NA
8	+++	+++	NA	-	-	-	+	NA
9	+	-	-	+	-	+	+	-
10	+++	+++	-	NA	+	-	+++	+++
11	++	-	+	-	NA	-	+	+
12	+++	++	++	++	+	-	++	+++
13	++	+++	-	-	-	+	+	+
14	+++	+	-	-	++	-	+	-
15	+++	-	+++	+	-	-	++	-
16	+++	+++	-	-	+	+	++	++
17	+	+	-	-	-	-	+	+
18	+++	+++	++	+	+	+	+++	+
19	+++	-	+	-	++	-	++	+
20	+	NA	-	+	NA	-	+	+
21	+	-	-	-	-	-	+++	++
22	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	++
23	++	+	++	-	+	+	+	+

^a Grau de marcação: + = leve, ++ = moderada, +++ = acentuada; - = resultado negativo, NA= não analisado.

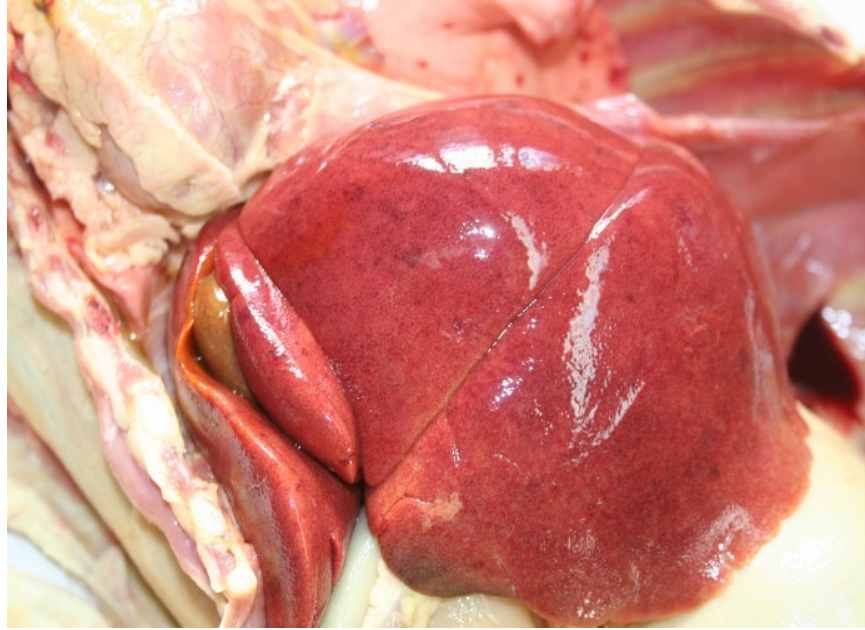
FIGURAS

Fig.1. Fígado de um cão infectado pelo adenovírus canino tipo 1, apresentando padrão lobular evidente e hemorragias na superfície capsular.



Fig.2. Fígado pálido e com material fibrinoso na superfície capsular de um cão infectado pelo adenovírus canino tipo 1.

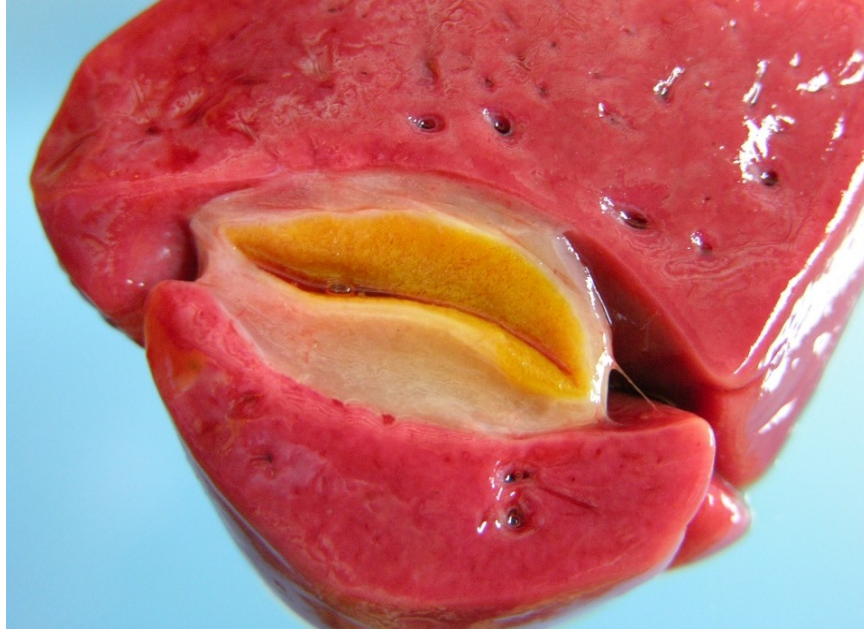


Fig.3. Vesícula biliar apresentando edema acentuado em um cão com hepatite infecciosa canina.

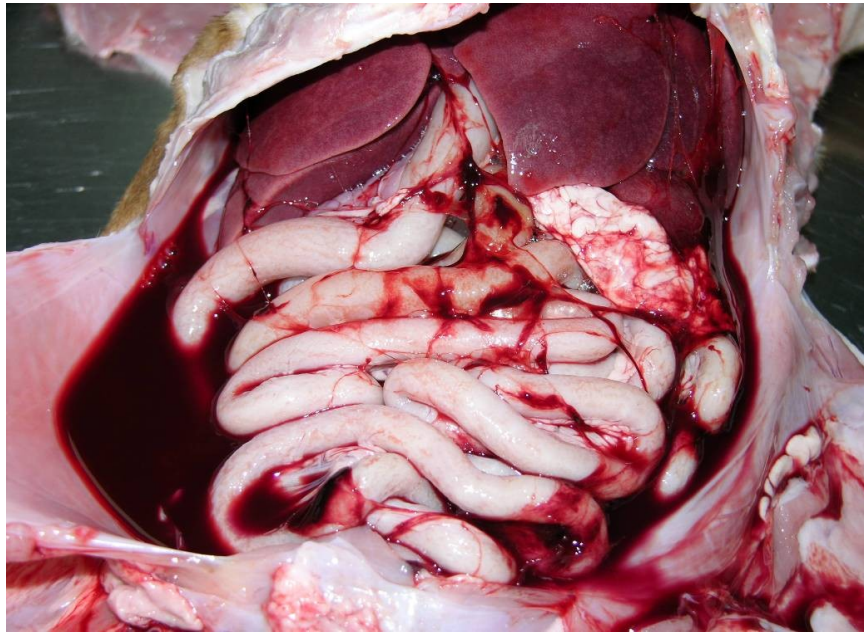


Fig.4. Hemoperitônio em um cão com hepatite infecciosa canina.

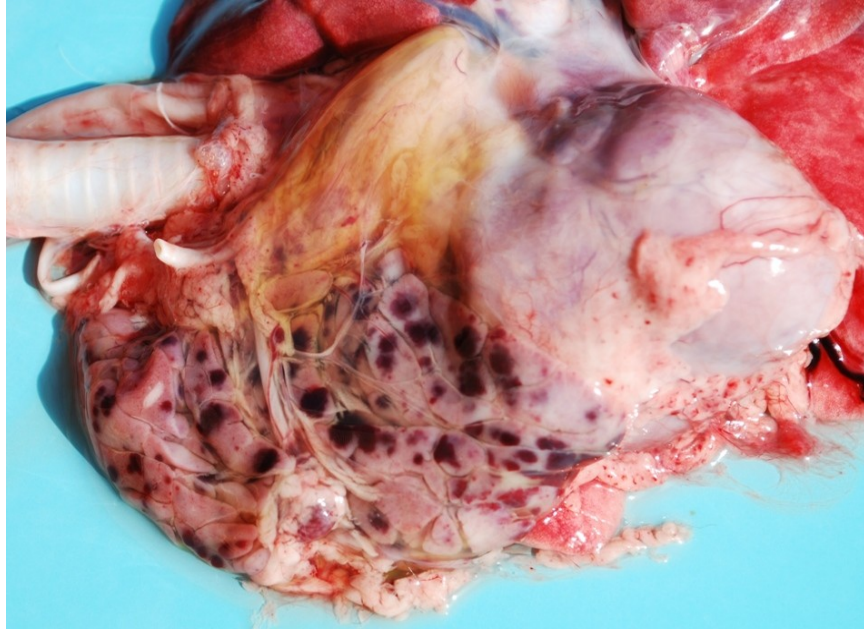


Fig.5. Hemorragia tímica acentuada em um cão com hepatite infecciosa canina.

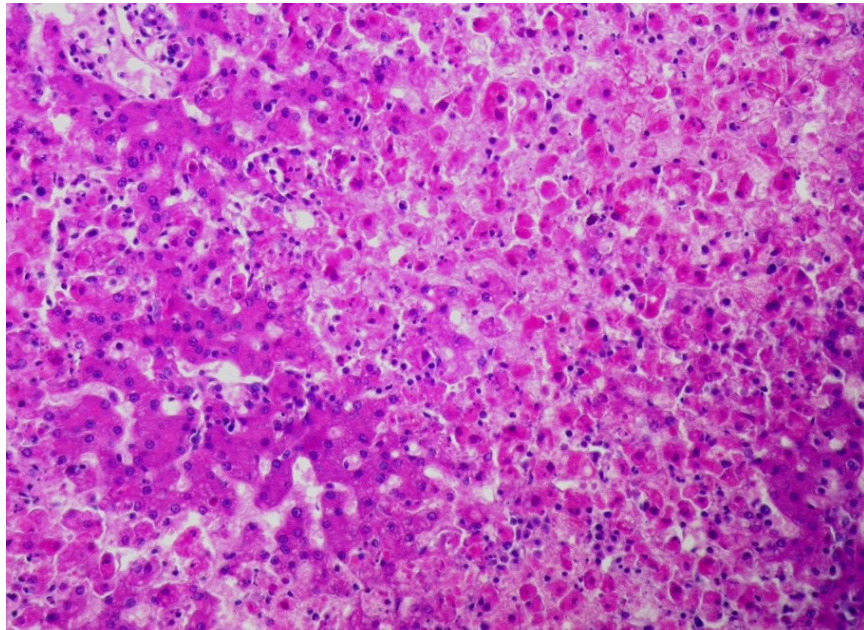


Fig.6. Necrose hepática aleatória devido à infecção pelo adenovírus canino tipo 1. HE, obj.40x.

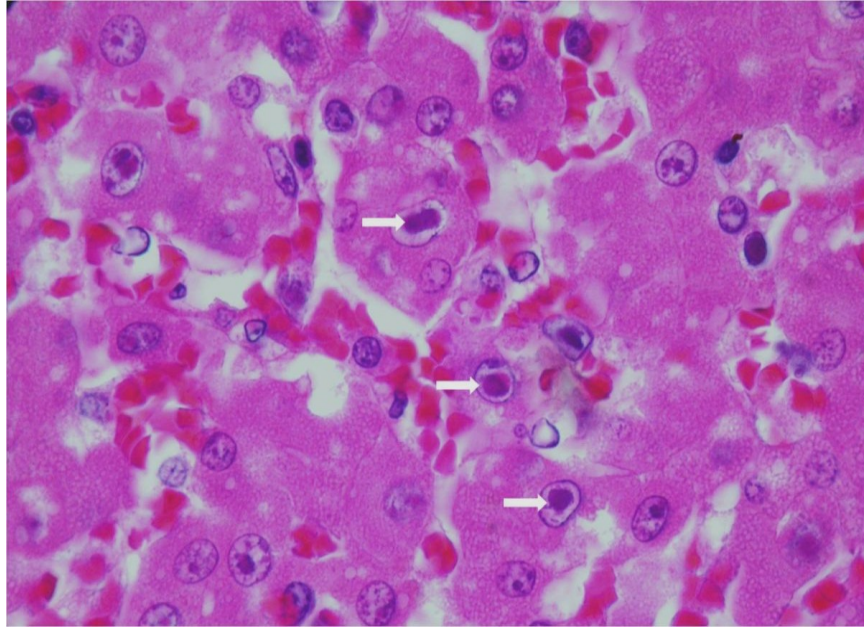


Fig.7. Corte histológico de fígado de um cão com hepatite infecciosa canina. Corpúsculos de inclusão intranucleares (setas) no interior de hepatócitos. HE, obj.100x.

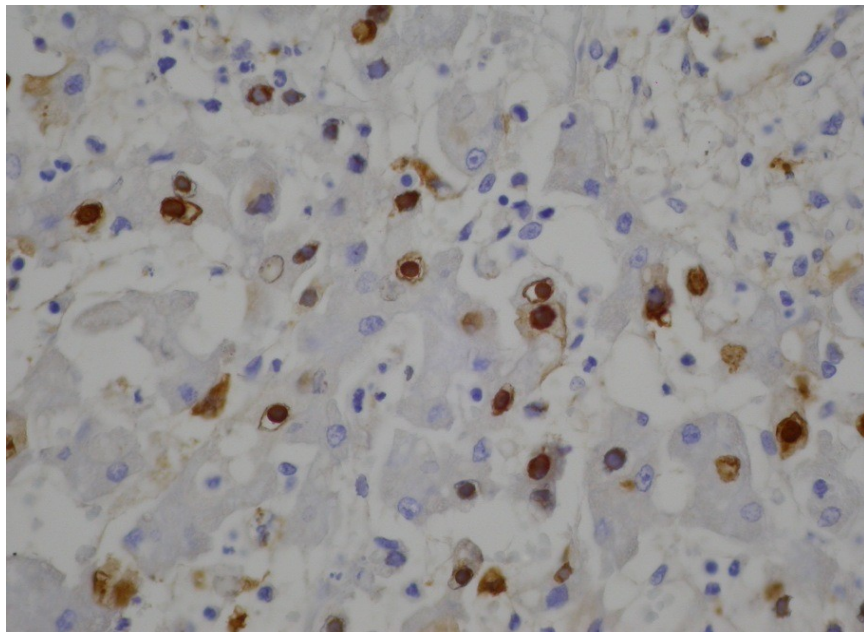


Fig.8. Imuno-histoquímica positiva para antígenos de adenovírus canino tipo 1 em hepatócitos caracterizada por marcação em corpúsculos de inclusão intranucleares, núcleos e no citoplasma (em marrom). Método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase, obj.40x.

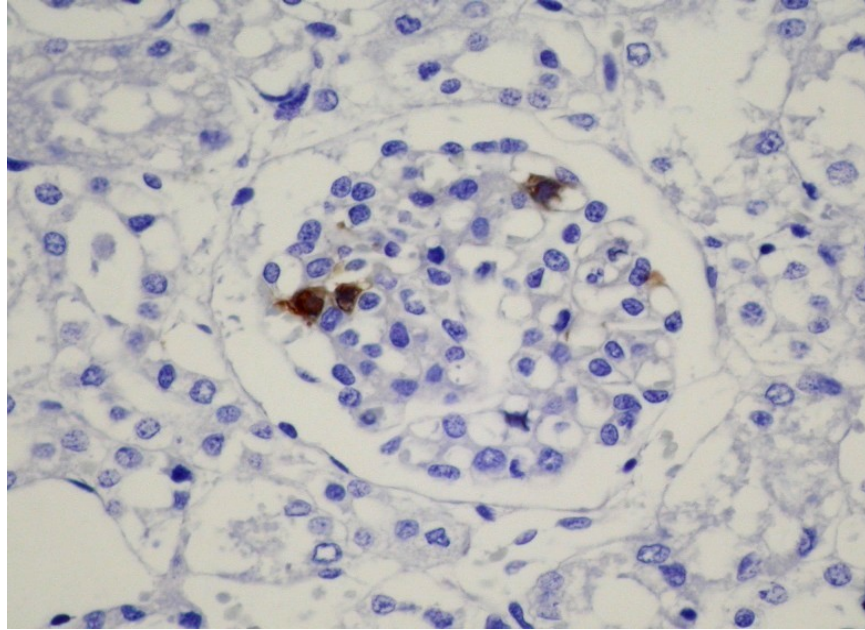


Fig.9. Imuno-histoquímica positiva (em marrom) para antígenos de adenovírus canino tipo 1 no endotélio glomerular. Método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase, obj.40x.

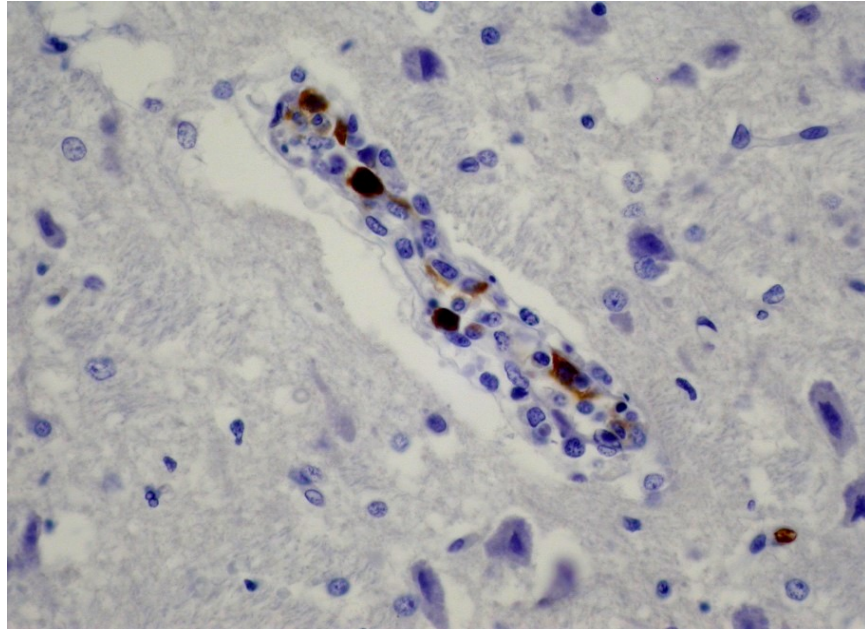


Fig.10. Imuno-histoquímica positiva (em marrom) para antígenos de adenovírus canino tipo 1 no endotélio cerebral. Método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase, obj.40x.

4.4 Leptospirose canina

4.4.1 Resultados gerais

Durante dez anos, realizoaram-se 150 diagnósticos de leptospirose canina no SPV-UFRGS. Para um estudo mais detalhado dos dados gerais dos animais, dos achados macroscópicos obtidos no exame de necropsia e das lesões histológicas, selecionou-se 112 casos por apresentarem melhores informações nos registros. Neste critério, os casos foram selecionados pela presença de descrições dos achados patológicos e disponibilidade de lâminas e blocos de parafina no sistema de arquivos.

Dos 112 cães afetados por leptospirose, 66 eram machos (58,93%) e 46 fêmeas (41,07%). Cães sem raça definida representaram 60 casos (53,57%) e cães de raça 52 casos (46,43%). As raças frequentemente afetadas foram a Rottweiler (8 cães), Cocker e Pastor Alemão (7 cães cada uma). Obteve-se a idade dos cães em 80 casos, revelando a média de idade de 2,75 anos (33,05 meses), variando de 1 mês a 15 anos. Cães com até um ano de idade foram os mais acometidos (Figura 1). A distribuição por faixa etária revelou que 44 cães eram filhotes (55%), 31 classificados como adultos (38,75%) e 5 como idosos (6,25%). A tabela 5 apresenta a distribuição dos casos por raça e a identificação dos animais sem raça definida.

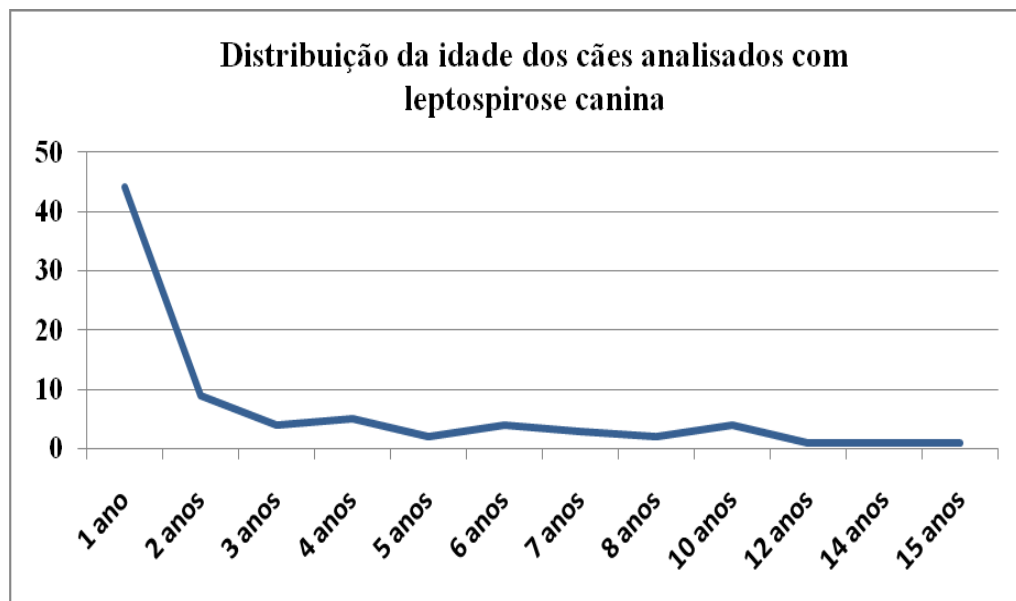


Figura 1 – Gráfico da distribuição por idade de 80 cães analisados com leptospirose.

Tabela 5 – Distribuição por raça e sem raça definida dos cães diagnosticados com leptospirose:

Raças	Número	%
Sem raça definida	60	53,57
Rottweiler	8	7,14
Cocker	7	6,25
Pastor Alemão	7	6,25
Boxer	6	5,36
Pit Bull	6	5,36
Poodle	4	3,57
Fila	3	2,68
Husky	2	1,79
Dálmata	1	0,89
Akita	1	0,89
American Staffordshire Terrier	1	0,89
Border Collie	1	0,89
Collie	1	0,89
Teckel	1	0,89
Doberman	1	0,89
Dogue Alemão	1	0,89
Terrier Brasileiro	1	0,89
Total	112	100

4.4.2 Achados macroscópicos

Icterícia foi encontrada em 106 casos (94,6% das necropsias). A identificação de icterícia (Figura 2) em diferentes graus foi obtida pela análise da coloração da pele, mucosa oral, mucosa ocular, esclera, mucosa genital, tecido subcutâneo, endotélio vascular e pela avaliação de órgãos internos, principalmente os de cores mais claras.

Encontraram-se alterações hepáticas macroscópicas em 69 cães (61,61% necropsias). O achado de necropsia mais identificado no fígado (figuras 3 a 5) foi a icterícia em 38 animais (33,93%). Aumento da friabilidade do fígado foi determinado pela apresentação de fissuras na superfície capsular e pela ruptura ou fácil depressão do parênquima ao toque (figura 5). Hemorragias focais leves da superfície hepática apresentaram-se na forma de petéquias ou sufusões. As lesões hepáticas encontradas nos cães com leptospirose canina estão descritas na tabela 6 com suas respectivas frequências. Vesícula biliar com conteúdo grumoso ou mais denso foi descrita em 25 casos (20,49%).



Figura 2 – caninos com leptospirose, apresentando icterícia em diferentes locais anatômicos. **A:** icterícia cutânea, pele da região abdominal e inguinal. **B:** icterícia na mucosa oral. **C:** avaliação ocular apresentou esclera icterícia. **D:** subcutâneo com icterícia no tecido adiposo.

Tabela 6 – Distribuições dos achados macroscópicos hepáticos avaliados em 112 cães necropsiados com leptospirose canina:

Alteração macroscópica	Número	%
Icterícia	38	33,93
Hepatomegalia	28	25
Aumento da friabilidade	28	25
Padrão lobular evidente	28	25
Hemorragia	4	3,57
Congestão	4	3,57

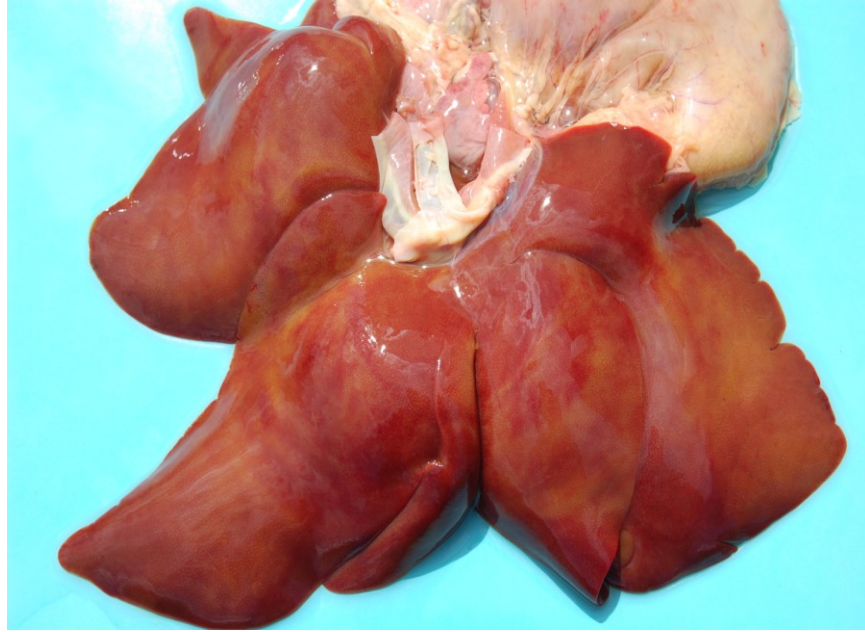


Figura 3 – fígado icterico, canino com leptospirose.



Figura 4 – fígado icterico e com bordos arredondados de um canino com leptospirose.

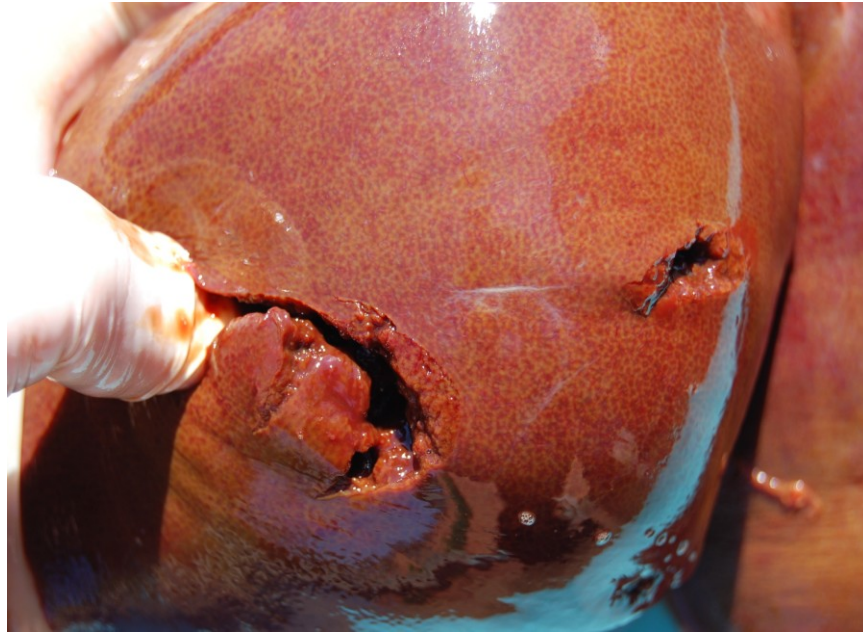


Figura 5 – fígado icterico, com padrão lobular evidente e friável ao toque: cão com leptospirose.

Alterações macroscópicas renais estavam presentes em 63 animais (56,25%). O achado patológico mais observado foram os rins ictericos (Figura 6) em 47 casos (41,96%). Identificaram-se hemorragias renais na superfície cortical (Figura 6) em parte dos casos, com a formação de petéquias, equimoses ou sufusões em grau variado. Pontos brancos discretos na superfície capsular renal foram observados em reduzido número de casos e infartos hemorrágicos unilaterais foram raramente identificados. As frequências das lesões renais encontradas durante os exames de necropsias estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição dos achados macroscópicos renais identificados em 112 cães necropsiados com leptospirose.

Alteração macroscópica	Número	%
Icterícia	47	41,96
Hemorragia	27	24,11
Pontos brancos na superfície capsular	15	13,39
Aumentado	10	8,93
Infarto	2	1,79

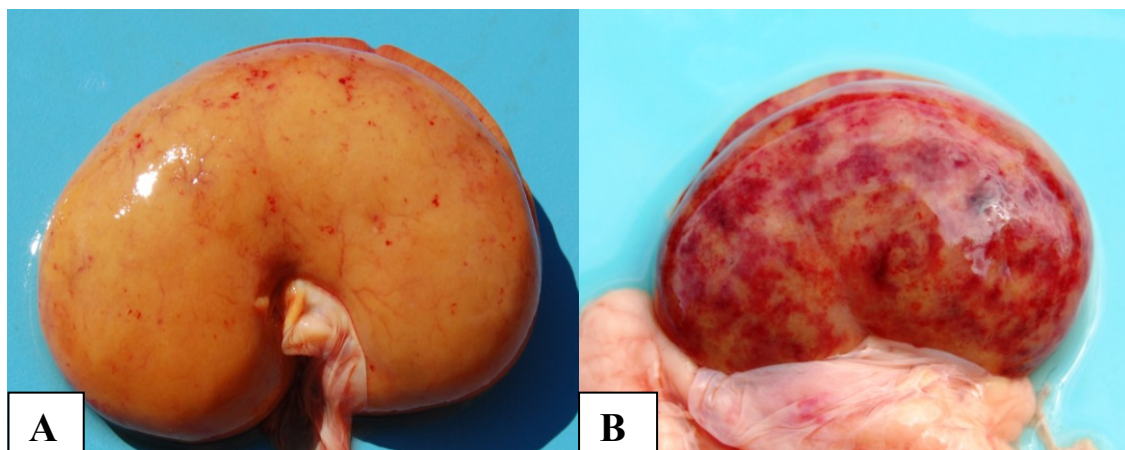


Figura 6 – rins de cães com leptospirose. A. Rim icterico e com petéquias na superfície capsular. B. Rim com icterícia e acentuada hemorragia na superfície cortical.

Lesões pulmonares foram comumente identificadas durante as necropsias, estando presentes em 95 animais (84,82% dos cães). O achado pulmonar mais característico foi a hemorragia pulmonar distribuída difusamente ou em grande parte do parênquima em 83 necropsias (74,11%), apresentando-se em padrão difuso ou em grande parte do parênquima (Figuras 7 e 8). Quando cortados, visualizou-se fluido hemorrágico em brônquios e no parênquima pulmonar. Em 7 animais (6,25%), relatou-se a ocorrência de pulmões firmes ao toque e ao corte compatíveis com pulmões em “pedra-pomes”. As lesões pulmonares dos cães com leptospirose estão apresentadas na tabela 8 com suas respectivas frequências.

Tabela 8 - Distribuições dos achados macroscópicos pulmonares identificados em 112 cães necropsiados com leptospirose canina.

Alteração macroscópica	Número	%
Pulmões hemorrágicos	83	74,11
Edema hemorrágico	63	56,25
Pulmões não colapsados	59	52,68
Pulmões em “pedra pome”*	7	6,25

*Pulmões em “pedra pome”: achado patológico compatível com mineralização pulmonar devido à uremia.



Figura 7 – pulmões não colapsados e vermelho-escuros de um cão com leptospirose.



Figura 8 – pulmões não colapsados com áreas vermelhas e ictéricas, cão com leptospirose.

Ascite de grau leve foi descrita em 12 casos (10,7%). Hemorragias em diferentes graus e locais anatômicos ocorreram em 92 cães (82,1%), observando-se hemorragia gastrointestinal em 65 animais (58,04%). Intussuscepção ocorreu em 16 caninos (14,29%).

Alterações compatíveis com uremia foram visualizadas em 72 cães (64,29%). Lesões compatíveis com gastropatia urêmica ocorreram em 59 casos (52,68%). Nesses casos, observaram-se na abertura do estômago diferentes tipos de alterações, identificando-se conteúdo gástrico hemorrágico ou grande quantidade de muco no lúmen, mucosa vermelha, hemorragia na mucosa (Figura 9), espessamento da parede, odor amoniacal, erosões e úlceras. Lesões orais encontradas em casos de uremia foram observadas em 4 caninos (4,46%). Lesões macroscópicas sugestivas de mineralização tecidual foram descritas em 29 necropsias (25,89%). Essas caracterizadas pela identificação de estriações brancas transversais na pleura parietal dos espaços intercostais, na superfície endocárdica (Figura 10) ou serosa de órgãos intestinais.

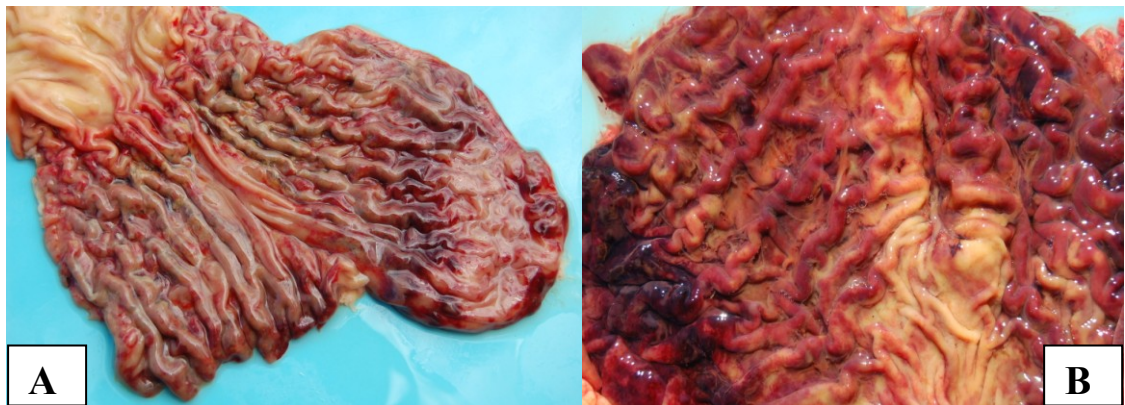


Figura 9 – estômagos de cães com leptospirose. **A.** mucosa icterícia com extensa área hemorrágica. **B.** mucosa gástrica hiperêmica, icterícia e com extensa hemorragia.

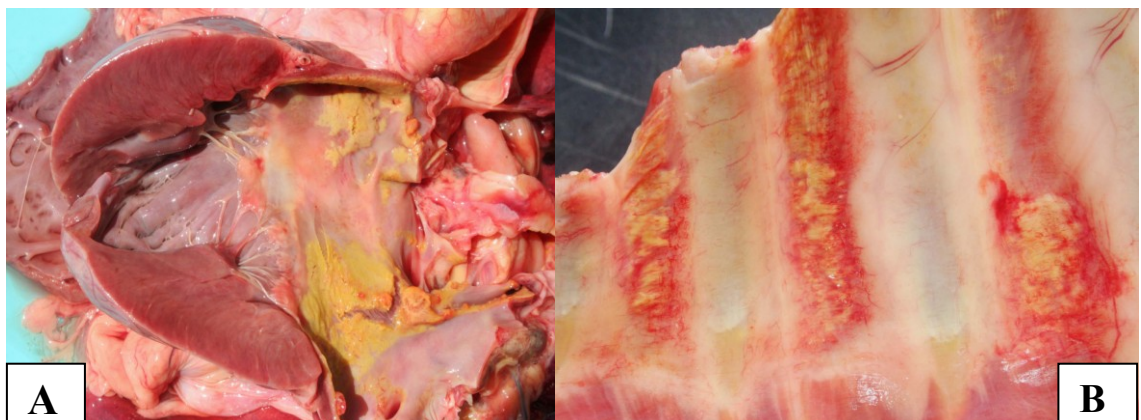


Figura 10 – exame macroscópico de cães com leptospirose. **A.** coração com endocárdio do átrio esquerdo com mineralização (endocardite mural urêmica) e icterícia. **B.** mineralização e icterícia na pleura parietal dos espaços intercostais.

4.4.3 Achados microscópicos

A análise histológica demonstrou que a principal lesão encontrada no fígado foi a dissociação de hepatócitos (Figuras 11 e 12). Lesão caracterizada pela desestruturação das placas de hepatócitos, com separação acentuada das células, resultando na perda da arquitetura lobular. Identificou-se colestase discreta em 51 cortes histológicos analisados, caracterizada pela identificação de pigmento acastanhado entre hepatócitos, no interior de hepatócitos e de canaliculos biliares. Necrose individual de hepatócitos e hepatócitos binucleados (Figura 12) observaram-se em um número menor de células. Áreas focais de hemorragia foram identificadas em parte dos casos. Reduzido número de animais apresentaram hepatite de grau leve, com infiltrado neutrofílico ou misto. As frequências das lesões histológicas hepáticas estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 – Frequências das alterações histológicas hepáticas identificadas nos 112 cães com leptospirose.

Alteração microscópica	Número	%
Dissociação de hepatócitos	112	100
Tumefação de hepatócitos	69	61,61
Congestão	66	58,93
Colestase	51	45,54
Hepatócitos binucleados	43	38,39
Necrose	34	30,36
Vacuolização	28	25
Hemorragia	25	22,32
Hepatite	4	3,57

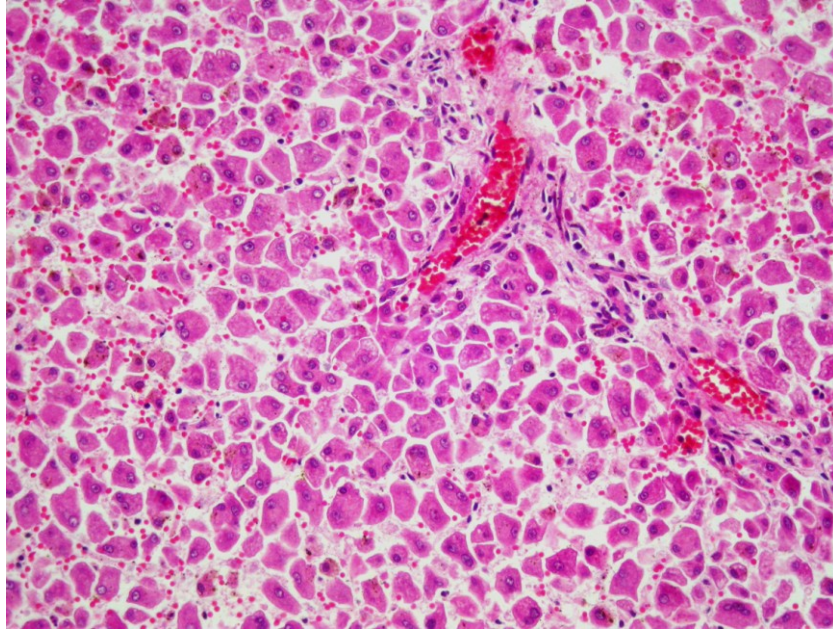


Figura 11 – corte histológico de fígado com dissociação de hepatócitos, em cão diagnosticado com leptospirose (HE, obj. 10).

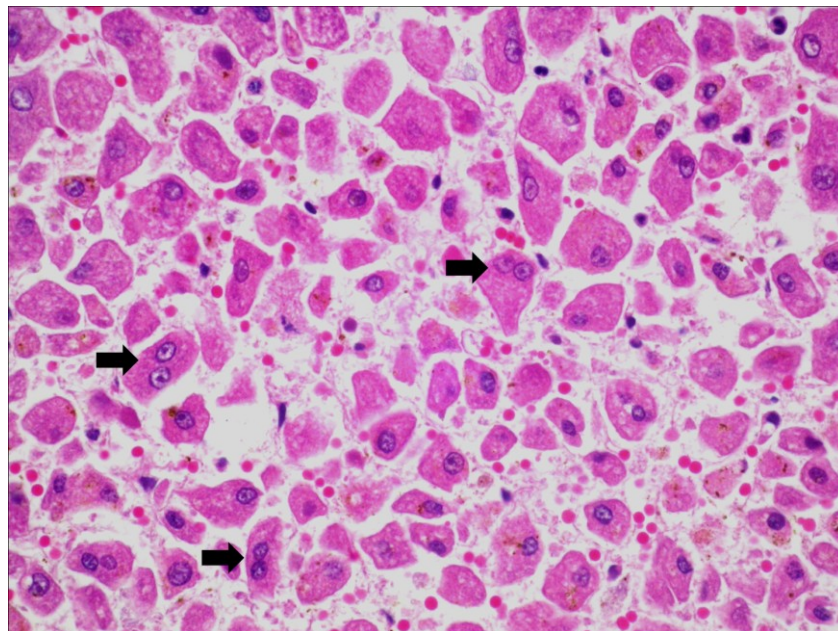


Figura 12 – corte histológico de fígado com dissociação de hepatócitos e células binucleadas (setas), em cão com leptospirose (HE, obj. 20).

Degeneração e necrose tubulares em diferentes graus ocorreram como as principais lesões histológicas renais. Nefrite intersticial mononuclear foi o segundo achado mais encontrado, identificando-se em grau leve (63,93% - 39/112), moderado (11,48% - 7/112) e acentuado (24,59% - 15/112) (Figuras 13 e 14). Pigmento acastanhado no lúmen de túbulos ou no interior de células tubulares renais foram identificados em grau leve (Figura 14). A mineralização renal caracterizava-se pela deposição de material basofílico, principalmente em túbulos renais necróticos e também na parede de vasos e cápsula glomerular. Observaram-se glomerulonefrite membranosa acometendo um pequeno número de glomérulos em 9 animais (8,04%). As frequências das lesões histológicas renais estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10 - Frequências das alterações histológicas renais identificadas nos 112 cães com leptospirose.

Alteração microscópica	Número	%
Degeneração e necrose	85	75,89
Nefrite intersticial	61	54,46
Bilirrubina	35	31,25
Hemorragia	25	22,32
Mineralização	20	17,86
Glomerulonefrite	9	8,04

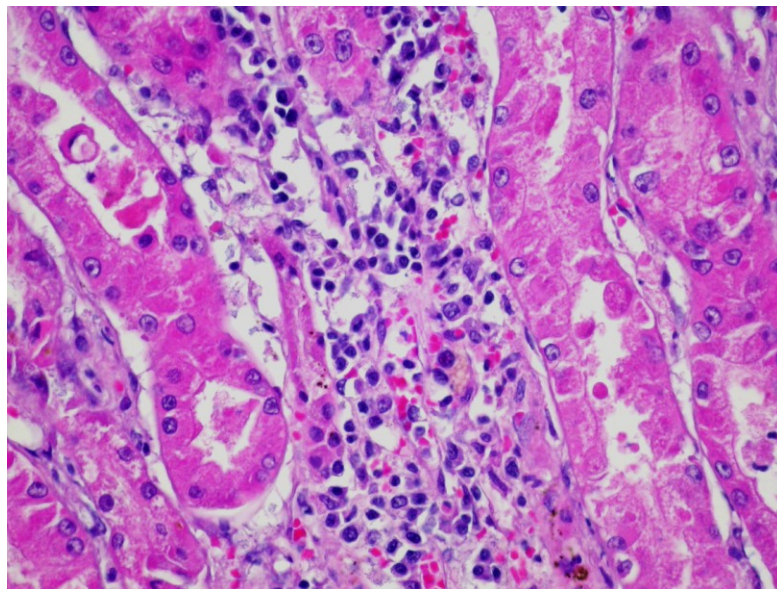


Figura 13 - corte histológico de rim de um cão com leptospirose. Degeneração tubular e infiltrado intersticial mononuclear moderado (HE, obj. 40).

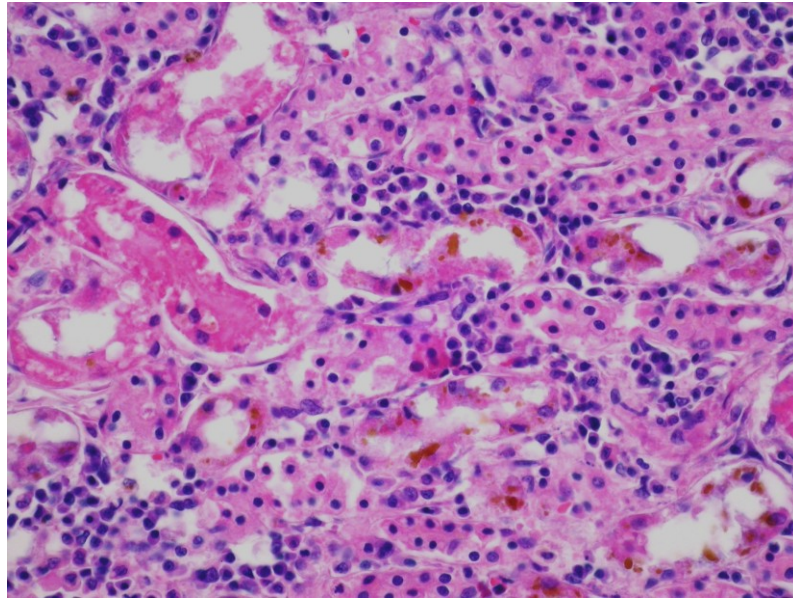


Figura 14 - corte histológico de rim, canino com leptospirose. Necrose tubular, infiltrado intersticial mononuclear e acúmulo de pigmentos acastanhados no epitélio tubular (HE, obj.20).

Diferentes alterações microscópicas pulmonares ocorreram em todos os animais analisados. Os dois achados patológicos mais identificados foram congestão (88/112), hemorragia intra-alveolar (76/112) e edema alveolar (69/112). As hemorragias pulmonares (Figura 15) se apresentavam em um quadro moderado a acentuado, formando múltiplos focos ou caracterizando-se por um quadro hemorrágico difuso. Em parte dos cães (41/112), diagnosticou-se pneumonia supurativa (56,1% - 23/41) ou mononuclear (43,9% - 18/41) de grau leve a moderado. Em alguns pulmões, encontrou-se mineralização em grau variado de septos alveolares (Figura 15) e também em alguns vasos. As frequências dos achados microscópicos pulmonares estão apresentadas na tabela 11.

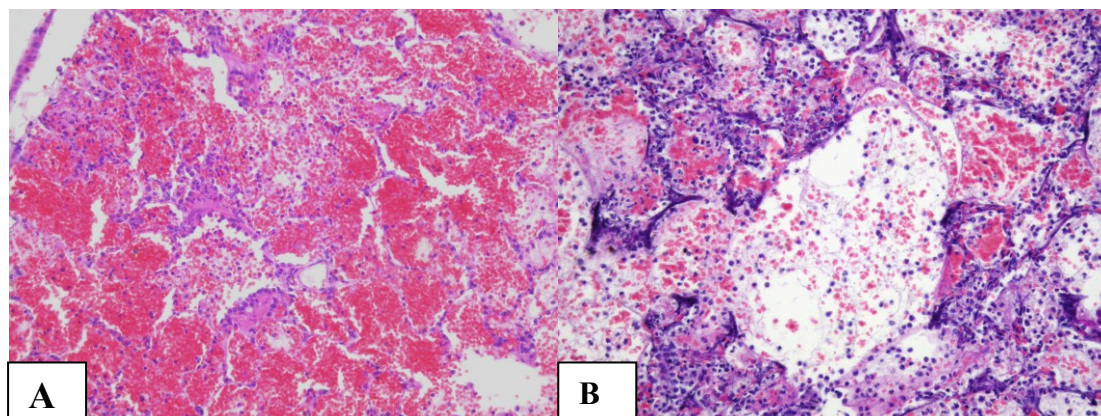


Figura 15 – cortes histológicos de pulmões de cães com leptospirose. **A.** hemorragia intra-alveolar acentuada (HE, obj. 20). **B.** mineralização de septos alveolares, pneumonia e hemorragia (HE, obj. 20).

Tabela 11 - Frequências das alterações histológicas pulmonares identificadas nos 112 cães com leptospirose.

Alteração microscópica	Número	%
Congestão	88	78,57
Hemorragia	76	67,86
Edema alveolar	69	61,61
Enfisema agudo	61	54,46
Pneumonia	41	36,61
Edema perivascular	22	19,64
Mineralização	19	16,96
Necrose alveolar	11	9,82
Membranas hialinas	10	8,93
Trombo	9	8,04
Alteração fibrinoide vascular	3	2,68

Encontraram-se alterações microscópicas cardíacas em 17 cães (15,18%). Focos de hemorragia no miocárdio em grau variável e miocardite neutrofílica (6/9) ou mononuclear (3/9) foram as lesões mais encontradas. Mineralização do miocárdio e de alguns vasos foram observadas. Endocardite mural, compatíveis com um quadro de uremia, se caracterizavam por infiltrado neutrofílico acentuado com necrose do miocárdio superficial e mineralização. A tabela 12 descreve as lesões histológicas cardíacas dos cães com leptospirose.

Tabela 12 - Frequências das alterações histológicas cardíacas identificadas nos 112 cães com leptospirose.

Alteração microscópica	Número	%
Hemorragia	9	8,04
Miocardite	9	8,04
Alteração fibrinoide vascular	6	5,36
Necrose	5	4,46
Vasculite	3	2,68
Mineralização	3	2,68
Endocardite mural	2	1,79
Trombo em vaso miocárdio	1	0,89

Analisaram-se 40 cortes histológicos de estômago. Identificou-se em parte dos casos uma necrose discreta ou extensa da mucosa gástrica (Figura 16). Edema acentuado da submucosa foi um achado frequente na necropsia. Observou-se mineralização em diferentes graus na mucosa, nos vasos ou na camada muscular. Hemorragia moderada a acentuada foram observadas na mucosa, submucosa ou camada muscular. A tabela 13 descreve as lesões microscópicas do estômago de 40 caninos com leptospirose.

Tabela 13 - Frequência das alterações histológicas de estômagos analisados em 40 cães com leptospirose canina.

Alteração microscópica	Número	%
Necrose da mucosa	20	50
Edema da submucosa	20	50
Mineralização	18	45
Congestão	18	45
Hemorragia	14	35
Gastrite	11	27,5
Alteração fibrinoide vascular	6	15
Erosão	3	7,5
Vasculite	2	5
Úlcera	1	2,5
Trombo	1	2,5

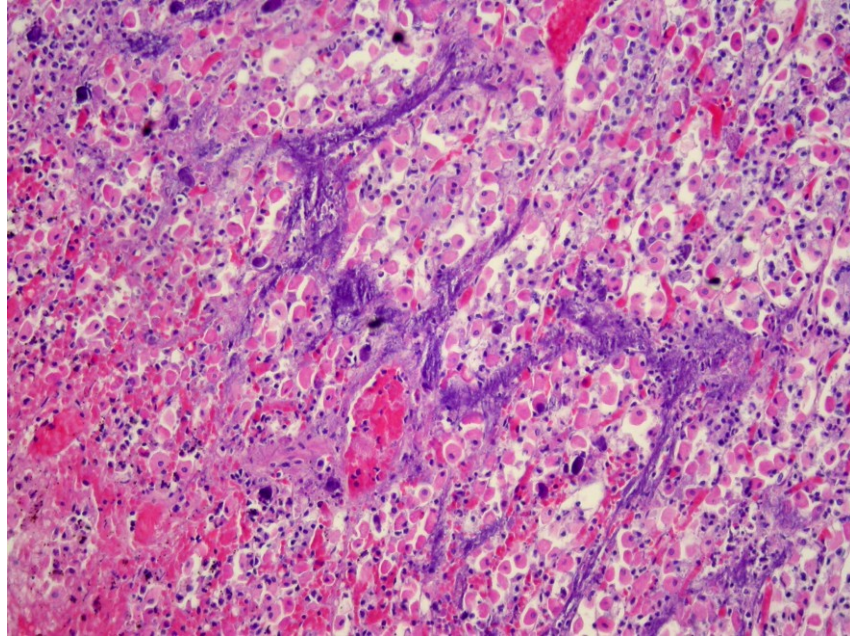


Figura 16 – corte histológico do estômago de um cão com uremia por leptospirose. Visualização de necrose, mineralização e hemorragia da mucosa gástrica. (HE, obj, 20).

5. DISCUSSÃO

O trabalho desenvolvido encontrou diferentes hepatopatias em cães entre as necropsias diagnosticadas do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pela análise das doenças encontradas no período de 10 anos, identificou-se um número maior de óbitos por enfermidades com origem inflamatória/infecciosa. Entre as doenças observadas, a leptospirose canina destacou-se como a principal hepatopatia de cães. Estudo retrospectivo realizado em 4.488 cães necropsiados, também apresentou a leptospirose como a doença hepática mais diagnosticada (108 casos - 2,2% dos diagnósticos) (FIGHERA et al., 2008).

A avaliação da idade nos animais com leptospirose canina revelou uma maior frequência de cães com até um ano de idade (55% dos cães). Greene et al. (2006) descrevem que os sinais clínicos mais graves são identificados em animais mais jovens, esta observação indica que pode haver maior taxa de mortalidade nesta faixa etária. Fighera (2008) identificou 37,9% dos cães necropsiados com até um ano de idade, 56,3% como adultos e 5,8% classificados como idosos. Miller et al. (2007) avaliaram clinicamente 40 cães com leptospirose, encontrando 37,5% animais com menos de um ano de idade. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada por Miller et al. (2007) na análise dos óbitos de acordo com a idade. O acometimento de filhotes pode estar relacionado com a imaturidade do sistema imune e a frequente observação de falhas no programa vacinal presente nos históricos clínicos desses animais. Outros trabalhos não realizaram detalhada avaliação da faixa etária dos cães. Esses trabalhos observaram apenas a média de idade dos cães com leptospirose, com idades de 2 anos (MILLER et al., 2007), 4 anos (CARTER et al., 2003), 4,8 anos (GEISEN et al., 2007), 7 anos (GOLDSTEIN et al., 2006) e 7,4 anos (BIRNBAUM et al., 1998). Com relação a raça dos animais, o estudo encontrou um maior número de cães sem raça definida e diferentes raças acometidas com leptospirose. Porém, nenhuma relação de predisposição racial na leptospirose é identificada (VAN DE MAELE et al., 2008).

Pela análise dos achados patológicos apresentados, os cães acometidos por leptospirose canina apresentaram lesões sistêmicas, atingindo principalmente o fígado, rins e pulmões. Entre os achados macroscópicos, a icterícia, hemorragias e os pulmões vermelhos foram as principais lesões encontradas durante os exames de necropsia. Os achados de necropsia do fígado e rins, embora tenham grande importância na

leptospirose canina, demonstraram variadas frequências nas lesões macroscópicas, sem o predomínio de um tipo de alteração. Dessa forma, somente com a avaliação histológica hepática e renal o diagnóstico de leptospirose será obtido. A icterícia, identificada em muitos animais, foi classificada como de origem hepática com base nas observações de acentuadas lesões histológicas e pela ausência de achados patológicos de anemia hemolítica ou de lesões obstrutivas pós-hepáticas. Apenas dois cães apresentaram infarto hemorrágico renal. Esses infartos renais, ocorrendo em baixa frequência também foram encontrados por Figuera (2008). O infarto pode estar relacionado à alteração vascular provocada por *Leptospira* através da ação direta ou pela ação de toxinas no endotélio vascular com consequente isquemia (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

A dissociação de hepatócitos foi a principal lesão histológica nos cães analisados, caracterizando-se como o achado mais característico da leptospirose canina. Esse achado microscópico é descrito comumente em cães, bovinos, caprinos, equinos, cobaias e no homem (HIGGIN; COUSINEAU, 1977; BRITO et al., 2006; CULLEN, 2007; JAMSHIDI et al., 2008; SMYTHE, 2008). Essa perda da arquitetura hepática é identificada no período *post mortem*, mas pode aparecer na fase aguda da doença ou durante o período terminal da vida de doentes com leptospirose (BRITO, 1968). Brito et al. (1967) identificaram preservação da arquitetura do fígado, hepatócitos com citoplasma claro, com poucas figuras de mitose e células binucleadas em biópsias hepáticas de pacientes com leptospirose.

Histologicamente, a degeneração e necrose de túbulos renais e nefrite intersticial mononuclear foram as principais lesões nos rins. Estes achados também foram descritos e/ou comumente identificados por outros autores na avaliação microscópica renal (PRESCOTT et al., 2002; FIGHERA, 2008; SCHWEIGHAUSER et al., 2009). Em seres humanos, insuficiência renal tem sido identificada em 16% a 40% dos pacientes com leptospirose (CERQUEIRA et al., 2008). Sua observação tem sido relacionada com o maior risco de óbito (MCBRIDE et al., 2005). Como principais causas da lesão renal aguda são sugeridas: efeito tóxico direto de toxinas produzidas pela bactéria sobre o epitélio tubular renal, hipovolemia ou isquemia pela hipotensão (CERQUEIRA et al., 2008). A hipotensão ocorre pela hemorragia, vômito, diarreia e febre (ABDULKADER; SILVA, 2008). Além disso, o acúmulo de pigmentos contribui para a insuficiência renal aguda devido ao efeito nefrotóxico da bilirrubina (ABDULKADER; SILVA, 2008). No

diagnóstico *post mortem* de pacientes humanos foi sugerido que a nefrite intersticial seja secundária a necrose tubular (CERQUEIRA et al., 2008). Tal observação é baseada na identificação de necrose tubular aguda e edema intersticial em pacientes que morreram entre 2 a 3 semanas com sinais clínicos de leptospirose, enquanto em óbitos com mais de 3 semanas da doença identificou-se nefrite intersticial (CERQUEIRA et al., 2008).

Identificou-se um grande número de animais com lesões pulmonares significativas, revelando os pulmões órgãos comumente acometidos e com achados patológicos que contribuem para a gravidade da leptospirose canina. As alterações histológicas encontradas nos pulmões (hemorragia, edema, congestão e pneumonia) também foram descritas em outros trabalhos (BIRNBAUM et al., 1998; LANGSTON; HEUTER, 2003; FIGHERA, 2008). No homem, os sinais respiratórios são amplamente relatados e estudados na leptospirose (LUKS; LAKSHMINARAYANAN; HIRSCHMAN, 2003; MAROTTO et al., 2010). Nas últimas décadas, relaciona-se o comprometimento respiratório com uma maior morbidade e mortalidade na leptospirose humana (FONTES et al., 2010). Estudos clínicos em pacientes com leptospirose apontam alta taxa de comprometimento pulmonar, podendo variar de 15% a 70% (CARVALHO; BETHLEM, 2002; SILVA et al., 2002; TATTEVIN et al., 2005; FONTES et al., 2010). Neste quadro clínico da leptospirose humana, pior prognóstico é observado com alta taxa de casos fatais, podendo ser superior a 50% (CARVALHO; BETHLEM, 2002; MCBRIDE et al., 2005; DOLHNIKOFF et al., 2007). Divate et al. (2005) avaliou os achados *post mortem* de 62 pacientes humanos com leptospirose, encontrando 85% dos casos com hemorragia pulmonar e somente 5% com broncopneumonia. A fisiopatologia das lesões pulmonares na leptospirose é pouco compreendida. Uma possibilidade é a ação direta ou de toxinas produzidas pela leptospira, atuando sobre o endotélio vascular provocando vasculite, com consumo de fatores de coagulação e plaquetas, levando a uma diátese hemorrágica (PEREIRA et al., 2007). Outra possibilidade, para a lesão vascular da leptospirose, é a resposta imune do hospedeiro com a formação de imunocomplexos e deposição no endotélio vascular (DUTTA; CHRISTOPHER, 2005). Também é sugerida, como causa da hemorragia pulmonar, a insuficiência renal aguda provocada pela leptospirose (KISHIMOTO et al., 2004). Diferentes parâmetros foram analisados por Marotto et al. (2010) em pacientes com Síndrome Pulmonar Hemorrágica Associada à Leptospirose. Neste trabalho, cinco fatores clínicos foram associados ao quadro hemorrágico pulmonar na leptospirose, encontrando-se aumento sérico de potássio, aumento de creatinina, aumento da

frequência respiratória, choque circulatório e nível de consciência (*Glasgow Coma Scale Score*). A formação de edema pulmonar pode estar associada à alteração vascular direta pela ação da bactéria, ou ser secundária a miocardite e insuficiência renal encontradas na leptospirose (CARVALHO; BETHLEM, 2002). Em casos de uremia, o edema pulmonar com ou sem congestão, ocorre pelo aumento de permeabilidade vascular (MAXIE; NEWMAN, 2007). Outra complicação possível na leptospirose canina é a pneumonia (LANGSTON; HEUTER, 2003). Pneumonias podem ser secundárias a uremia, provocada pela aspiração do conteúdo gástrico gerado pelo vômito urêmico ou pela imunossupressão através do efeito tóxico dos produtos nitrogenados retidos na insuficiência renal sobre órgãos linfoides (MAXIE; NEWMAN, 2007).

Lesões hemorrágicas se apresentaram comumente nos caninos analisados. Esta característica também foi observada em outros trabalhos (GOLDSTEIN et al., 2006; FIGHERA, 2008). A hemorragia ocorre após lesão de vasculite, com trombocitopenia e alguns casos formação de coagulação intravascular disseminada (CID) (GREENE et al., 2006). Prescott et al. (2002) em estudo clínico e patológico em 31 cães com leptospirose observou que um terço dos animais apresentava trombocitopenia. Em humanos, hemorragias são comuns em pacientes com leptospirose, devido à trombocitopenia que ocorrem em 50% a 95% dos pacientes, estando relacionadas com um pior prognóstico (DAHER et al., 2010). Entretanto, a observação de CID não é identificada na leptospirose humana como consequência da trombocitopenia (LEVETT, 2001).

Lesões sistêmicas compatíveis com um quadro de uremia ocorreram comumente durante as necropsias e nas análises histológicas. A mineralização tecidual é ocasionada pela calcificação distrófica e calcificação metastática, respectivamente, pela necrose isquêmica da uremia e pelo hiperpatireoidismo renal secundário em resposta à retenção do fósforo na lesão renal. Lesões orais ou gástricas se desenvolvem por alterações vasculares que provocam necrose isquêmica, devido à vasculite e necrose do endotélio vascular (NEWMAN; CONFER; PANCIERA, 2009). Desta forma, alterações vasculares e circulatórias na leptospirose podem ser relacionadas à ação da bactéria combinada à uremia.

A ocorrência de intussuscepção em cães com leptospirose também foi observada em outros estudos (GREENLEE et al., 2004; FIGHERA 2008; SCHWEIGHAUSER et al., 2009). Fighera (2008), em sua análise de cães com leptospirose, encontrou seis

animais com intussuscepção em 108 diagnósticos, 5,6% dos casos analisados. Em outro trabalho, Schweighauser et al. (2009) identificaram intussuscepção do intestino delgado e insuficiência renal aguda em 5 caninos com leptospirose. Neste trabalho, foi sugerida a associação da intussuscepção com a uremia provocada pela leptospirose. Ideia baseada em trabalhos que descreveram insuficiência renal aguda por etilenoglicol em cães com intussuscepção e na observação de aumento de motilidade em animais com insuficiência renal crônica (SCHWEIGHAUSER et al., 2009).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que as doenças hepáticas infecciosas foram representadas por um grande número de necropsias do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS no período de 2000 a 2009.

A leptospirose foi a principal doença hepática de cães necropsiados em nosso laboratório. Provocando achados patológicos sistêmicos que se caracterizaram pelas lesões hepáticas e renais, pulmonares e hemorrágicas.

Importantes lesões foram encontradas nos pulmões de cães com leptospirose, sugerindo a contribuição das alterações pulmonares para o óbito. A intussuscepção pode ser uma complicação em casos de leptospirose.

Na hepatite infecciosa canina, as lesões se caracterizaram pela necrose hepática, identificação de corpúsculos de inclusão intranucleares e pela ocorrência de hemorragias. Entretanto, a observação de icterícia, edema de vesícula biliar e o material fibrinoso sobre a superfície capsular hepática apresentaram menores frequências.

O diagnóstico complementar aos achados patológicos de hepatite infecciosa canina através da imuno-histoquímica foi eficaz na identificação do adenovírus canino tipo 1.

Cães acometidos por herpesvírus canino tipo 1 apresentaram lesões necróticas e hemorrágicas em diferentes órgãos. Durante as necropsias, os achados macroscópicos mais importantes foram pulmões não colapsados e firmes, hemorragias na superfície cortical dos rins e esplenomegalia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKADER, R. C. R. M.; SILVA, M. V. The kidney. **Pediatric Nephrology**, v. 23, p. 2111-2120, 2008.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis – Do we have a problem. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 19-24, 2006.

BENTUBO, H. D. L.; et al. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.

BHARTI, A. R.; et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BIRNBAUM, N.; et al. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, p. 231-236, 1998.

BLOGG, J. R. Corneal oedema after vaccination of dogs with canine adenovirus vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 12, p. 384, 1983.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.

BONNET, B. N. ; et al. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. breed-, gender-, age-, and cause-specific rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n. 3, p. 105-120, 2005.

BOOMKENS, S. Y.; et al. PCR screening for candidate etiological agents of canine hepatitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 49-55, 2005.

BRITO, T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 238-241, 1968.

BRITO, T.; et al. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of the liver and kidney in human leptospirosis. *Virchows Archives*, v. 448, n. 5, p. 573-583, 2006.

BRITO, T.; et al. Liver biopsy in human leptospirosis: a light and electron microscopy study. *Virchows Archives Pathological Anatomy*, v. 342, p. 61-69, 1967.

BURR, P.; LUNN, K.; YAM, P. Current perspectives on canine leptospirosis. *In Practice*, v. 31, p. 98-102, 2009.

BYRNE, R. J. Canine leptospirosis and public health. *Public Health Reports*, v. 70, n. 12, p. 1229-1236, 1955.

CARMICHAEL, L. E.; BARNES, F. D.; PERCY D. H. Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *Journal of Infectious Disease*, v. 120, n. 6, p. 669-678, 1969.

CARMICHAEL, L. E.; SQUIRE, R. A.; KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *American Journal of Veterinary Research*, v. 26, n. 113, p. 803-814, 1965.

CARTER, C. N.; et al. A diagnostic laboratory update on canine leptospirosis in Texas. *Texas Veterinarian*, abril, p. 30-43, 2003. Disponível em: <http://tvmdl.tamu.edu/articles/canine_lepto/index_canine_lepto.php>. Acesso em: 20 de julho de 2010.

CARVALHO, C. R. R.; BETHLEM, E. P. Pulmonary complications of leptospirosis. *Clinics in Chest Medicine*, v. 23, p. 469-478, 2002.

CAUDELL, D.; et al. Diagnosis of infectious canine hepatitis virus (CAV-1) infection in puppies with encephalopathy. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, p. 58-61, 2005.

CENTER, S. A. Hepatobiliary infections. In: GREENE, C. E. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3th ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. chap. 90, p. 912-935.

CERQUEIRA, T. B.; et al. Renal involvement in leptospirosis – new insights into Pathophysiology and treatment. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 3, p. 248-252, 2008.

CHATURVEDI, U.; et al. Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 260-263, 2008.

CORNWELL H.J.C. & WRIGHT N.G. The pathology of experimental infectious canine hepatitis in neonatal puppies. **Research in Veterinary Science**. v. 10, p. 156-160, 1969.

CRAWFORD, P. C.; SELTON, R. K. Canine viral diseases. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Veterinary Internal Medicine Diseases of the Dog and the Cat**. 7th ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2010. v. 1. chap. 216. p. 958-971.

CHOUINARD, L., et al. Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis or cirrhosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 10, p. 320-325, 1998.

CULLEN, J. M. Liver, biliary, and exocrine pancreas. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2007. chap. 8, p. 393-461.

CURTIS, R.; BARNETT, K. C. The 'blue eye' phenomenon. **The Veterinary Record**, v. 112, p. 347-353, 1983.

DAHER, E. F.; et al. Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. **Brazil Journal of Infections Diseases**, v. 14, n. 1, p. 3-10, 2010.

DAVIS, M. A.; et al. Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington State. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 436-442, 2008.

DECARO, N.; et al. Infectious canine hepatitis: an "old" disease reemerging in Italy. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 269-273, 2007.

DECARO, N.; MARTELLA V.; BUONAVOGLIA C. Canine adenoviruses and herpesvirus. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 38, p. 799-814, 2008.

DIVATE, S. H. P.; et al. A study of sutopsy findings in 62 cases of leptospirosis in a Metropolitan City in India. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p. 169-173, 2005.

DOLHNIKOFF, M.; et al. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 142-148, 2007.

DUTTA, T. K.; CHRISTOPHER, M. Leptospirosis – an overview. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 53, p. 545-551, 2005.

FAVERO, A. C. M.; et al. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de baubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos, e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 7, p. 613-619, 2002.

FIGHERA, R. A.; et al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FIGHERA, R. A. **Causas de morte e razões para eutanásia de cães**. 2008. 171 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, 2008.

FONTES, A. P. A.; et al. Aspectos funcionais respiratórios na leptospirose canina. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 161-165, 2010.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. cap. 17, p. 433-488.

GALOSI, C. M. Herpesvirus canino 1: agente etiológico y enfermedad. **Analecta Veterinaria**, v. 27, p. 5-12, 2007.

GANCHEVA, G.; et al. Haemorrhagic syndrome in leptospirosis. **Trakia Journal of Sciences**, v. 3, n. 4, p. 10-12, 2005.

GARG, S. P.; MOULTON, J. E.; SEKHRI, K. K. Histochemical and electron microscopic studies of dog kidney cells in the early stages of infection with infectious canine hepatitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 28, n. 124, p. 725-730, 1967.

GEISEN, V.; et al. Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p. 324-328, 2007.

GOLDSTEIN, et al. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 489-494, 2006.

GREENLEE, J. J.; et al. Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 8, p. 1100-1107, 2004.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. 1387p.

GREENE, C. E.; CARMICHAEL, L. E. Canine herpesvirus infection. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. chap. 5, p. 47-53.

GREENE, C. E.; et al. Leptospirosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. chap. 44, p. 402-417.

HASHIMOTO, A.; et al. Naturally occurring canine herpesvirus infection in Japan. **Japanese Journal of Veterinary Science**. v. 40, p. 157-169, 1978.

HERVÁS, J.; et al. Focal mesangial-sclerosing glomerulonephritis and acute-spontaneous infectious canine hepatitis: structural, immunohistochemical and subcellular studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, p. 25-32, 1997.

HIGGIN, R.; COUSINEAU, G. The pathogenesis of leptospirosis II. Jaundice in experimental leptospirosis in guinea pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 41, p. 182-187, 1977.

HILL, H.; MARÉ, C. J. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 669-672, 1974.

HUTSON, L. R. Further observations on canine leptospirosis in Antigua, B. W. I. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 19, n. 12, p. 326-330, 1945.

INKELMANN, M. A.; et al. Hepatite infecciosa canina: 62 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 8, p. 325-332, 2007.

INKELMANN, M. A.; et al. Aspectos imunoistoquímicos da hepatite infecciosa canina. **Ciência Rural**. v. 38, p. 2636-2640, 2008.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **Mapas de condições registradas**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/clima.php#>>. Acesso em: 04 de novembro de 2008.

JAMSHIDI, S. H.; et al. Isolation of *Leptospira canicola* from a dog in Iran: first report. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 9, n. 3, p. 291-294, 2008.

JANSEN, A.; et al. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1048-1054, 2005.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. Barueri: Manole, 2000. 1415 p.

KEARNS, S. Infectious hepatopathies in dogs and cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 189-198, 2009.

KISHIMOTO, M.; et al. Leptospirosis misdiagnosed as pulmonary-renal syndrome. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 328, n. 2, p. 116-120, 2004.

KOPTOPOULOS, G.; CORNWELL, H. J. C. Canine adenovirus: a review. **The Veterinary Bulletin**, v. 51, n. 3, p. 135-142, 1981.

KUMAR, V.; et al. Fígado, vesícula biliar e vias biliares. In: ____ (Ed.). **Robbins Patologia Básica**. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2008. cap. 16, p. 689-736.

LANGSTON, C. E., HEUTER, K. J. Leptospirosis A re-emerging zoonotic disease. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 791-807, 2003.

LEFEBVRE, R. B. Spiral-curved organisms V: *Leptospira*. In: HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. (Eds.). **Veterinary Microbiology**. 2nd ed. Iowa: Blackwell, 2004. chap. 26, p. 148-152.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LOVE, D. N.; HUXTABLE C. R. R. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. **The Veterinary Record**. v. 99, p. 501-503, 1976.

LOVE, D. N. Review of canine viral disease. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 567-570, 1972.

LUKS, A. M.; LAKSHMINARAYANAN, S.; HIRSCHMAN, J. V. Leptospirosis presenting as diffuse alveolar hemorrhage. **Chest**, v. 123, n. 2, p. 639-643, 2003.

MAROTTO, P. C. F.; et al. Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. **Journal of Infection**, v. 60, n. 3, p. 218-223, 2010.

MAXIE, M. G.; NEWMAN, S. J. Urinary system. In: MAXIE, M. G. (Ed.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2007. chap. 4, p. 425-522.

MCBRIDE, A. J. A.; et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MILLER, R. I.; et al. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 1-2, p. 13-19, 2007.

MOORE, G. E.; et al. Canine leptospirosis, United States, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 501-503, 2006.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. Adenoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. cap. 16, p. 413-431.

NEWMAN, S. J.; CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. Sistema urinário. In: MACGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds.). **Bases da Patologia em Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 11, p. 613-691.

NGUYEN, T. T.; LINGAPPA V. R. Liver disease. In: McPHEE, S. J.; GANSONG W. F. (Eds.). **Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine**. 5th ed. New York: Lange Medical, 2006. chap. 14, p. 389.

OLIVEIRA, R. C. et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em cão utilizando diferentes técnicas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 111-113, 2005.

PALANIAPPAN, R. U. M; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

PERCY, D. H.; et al. Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 1, p. 145-156, 1970.

PEREIRA, J. C. B.; et al. Leptospirose pulmonar. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 13, n. 6, p. 827-839, 2007.

PRESCOTT, J. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 4, p. 397-398, 2008.

PRESCOTT, J. F.; et al. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 955-961, 2002.

PROSCHOWSKY, H. F.; RUGBJERG, H.; ERSBØLL, A. K. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 1-2, p. 63-74, 2003.

SAGLAM, Y. S.; et al. Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. **Small Ruminant Research**, p. 74, p. 119-122, 2008.

SALKADE, H. P. et al. A study of autopsy findings in 62 cases of leptospirosis in a metropolitan city in India. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p. 169-173, 2005.

SCHULZE C.; BAUMGÄRTNER W. Nested polymerase chain reaction and situ hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 209-217, 1998.

SCHWARTZ W. L.; MARTIN W. D. Canine herpesvirus infection of puppies. **Veterinary Medicine**. v. 61, p. 1171-1173, 1966.

SCHWEIGHAUSER, A.; et al. Small intestinal intussusception in five dogs with acute renal failure and suspected leptospirosis (*L. australis*). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 4, p. 363-368, 2009.

SILVA, J. J. P.; et al. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 395-339, 2002.

SILVA, M. C. **Estudo retrospectivo de lesões hepáticas crônicas em cães**. 2005. 165 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, 2005.

SILVA, M. C. ; et al. Cirrose hepática em cães: 80 casos (1965-2003). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 471-480, 2007.

SMYTHE, L. D. Leptospirosis. **Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure**, ago., p. 1-17, 2008. Disponível em:
<http://www.scahls.org.au/__data/assets/pdf_file/0003/1280820/leptospirosis.pdf>.
Acesso em: 17 de julho de 2010.

STOKES, J. E.; DRU FORRESTER, S. New and unusual causes of acute renal failure in dogs and cats. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 34, p. 909-922, 2004.

STUART, R. D. Leptospirosis in dogs and other animals. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 16, n. 7, p. 257-259, 1952.

STUDDERT, M. J.; STUDDERT V. P. Recovery of infectious canine hepatitis virus from dogs with different clinical syndromes. **Australian Veterinary Journal**. v. 48, p. 554-557, 1972.

SZEREDI, L.; HAAKE, D. A. Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infections. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 5, p. 755-760, 2006.

TATTEVIN, P.; et al. Respiratory manifestations of leptospirosis: a retrospective study. **Lung**, v. 183, p. 283-289, 2005.

TIMONEY, J. F.; et al. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**. 8th ed. New York: Cornell University, 1988. 951 p.

VAN DE MAELE, I.; et al. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **The Veterinary Record**, v. 163, p. 409-413, 2008.

VAN DEN INGH, T. S. G. A. M.; et al. Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. In: ROTHUIZEN, J., et al. (Eds.). **WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. chap. 7, p. 85-101.

WATT, D. A.; SPRADBROW, P. B.; LAMBERTH J. L. Neo-natal mortality of puppies in Queensland caused by canine herpesvirus infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, p. 120-122, 1974.

WEBSTER, C. R. L. History, clinical signs and physical findings in hepatobiliary disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6th ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2005. vol. 2, chap. 225, p. 1422-1434.

WINKLE, T. V.; et al. Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. In: ROTHUIZEN, J., et al. (Eds.). **WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. chap. 8, p. 103-116.

WOUTERS, F.; VARASCHIN, M. S.; WOUTERS A. T. B. Herpesvírus canino: descrição de casos espontâneos. **10º Enapave**, Pirassununga, p.127, 2001.

WRIGHT, N. G. Canine adenovirus: its role in renal and ocular disease: a review. **Journal Small Animal Practice**, v. 17, p. 25-33, 1976.

ZEE, Y. C.; MACLACHLAN, N. J. Adenoviridae. In: HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. (Eds.). **Veterinary Microbiology**. 2nd ed. Iowa: Blackwell, 2004. cap. 53, p. 317-319.