

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JOSÉ EUGÊNIO DINIZ BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, ANATOMOPATOLÓGICA E
HEMATOLÓGICA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELO
VÍRUS DA CINOMOSE E SUA DETECÇÃO NO NÓ SINOATRIAL
PELA TÉCNICA DE PCR**

DOUTORADO

**UBERLÂNDIA
2018**

JOSÉ EUGÊNIO DINIZ BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, ANATOMOPATOLÓGICA E
HEMATOLÓGICA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELO
VÍRUS DA CINOMOSE E SUA DETECÇÃO NO NÓ SINOATRIAL
PELA TÉCNICA DE PCR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

**UBERLÂNDIA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B327c
2018

Bastos, José Eugênio Diniz, 1947

Caracterização clínica, anatomo-patológica e hematológica de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose e sua detecção no nó sinoatrial pela técnica de PCR / José Eugênio Diniz Bastos. - 2018.

56 f. : il.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.459>

Inclui bibliografia.

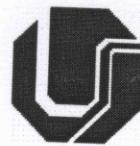
1. Veterinária - Teses. 2. Cinomose - Teses. 3. Cão - Doenças - Teses.
4. - Teses. I. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: **TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/004/2018**

Data: **15/03/2018**

Discente: **José Eugênio Diniz Bastos** – Matrícula – 11323VET003

Título da Tese: **CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, ANATOMOPATOLÓGICA E HEMATOLÓGICA DE CAES NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE E SUA DETECÇÃO NO NÓ SINOATRIAL PELA TÉCNICA DE PCR**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

Projeto de Pesquisa de vinculação: HEMATOLOGIA CLÍNICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM MEDICINA VETERINÁRIA

Aos 15 dias do mês de Março do ano de 2018 às 14:00 horas não sala 2D54 –Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Antonio Vicente Mundim** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Fernando Antonio Ferreira** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Humberto Eustáquio Coelho** – UNIVERSIDADE DE UBERABA; **Matheus Matioli Mantovani** – CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS DE MINAS e **Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 17 horas e 15 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho
UNIVERSIDADE DE UBERABA

Prof. Dr. Fernando Antonio Ferreira
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. Matheus Matioli Mantovani
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS DE MINAS

Profa.Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
ORIENTADORA

*Ao meu pai, Sinésio Ribeiro Bastos (EM MEMÓRIA)
que dizia que somente a Educação seria o
instrumento de mudanças para uma sociedade bem
aventurada.*

AGRADECIMENTOS

À minha companheira Virgínia pelo apoio em todos os anos de vida juntos.

Aos meus filhos Maria, Emiliano e Camila, cada qual com suas características e habilidades contribuíram para concretização de etapas importantes deste trabalho.

Aos meus genros Giovanni e Maurício e minha nora Camila pelas boas trocas e amizade que tanto me acrescentam.

Às minhas queridas netas Marina e Anna que me divertem e trazem alegrias em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão mais velho, Fernando Antônio Ferreira, cujas virtudes dispensam comentários, mas graças a elas e ao afeto imensurável que nos une, fortaleceram minha jornada acadêmica - profissional e de vida.

Ao Professor João Batista Ferreira dos Santos, o Joãozinho, pelas inúmeras viagens e ainda tantas a serem feitas em busca de um "Bartoldo" e pela amizade fraterna.

Ao Professor Antônio Vicente Mundin, de cuja fonte de sabedoria bebi, aprendendo a aprimorar o meu profissionalismo no trabalho de pesquisa.

Ao Professor Fernando Cristina Barbosa, companheiro de tantas aulas práticas em caminhos desconhecidos, por onde nos perdemos algumas vezes. Porém, graças a sua dedicação e paciência, pudemos trilhar este caminho pleno de companheirismo e afeto.

À Professora Anna Lima que, com delicadeza e presteza, esteve sempre disponível para uma explicação cordata.

À Professora Mara, pela sua sensatez, amizade e a busca perene por uma Educação Humanista.

Aos colegas amigos Gustavo e Alisson, por suas considerações certeiras nos meus momentos de dúvidas, juntamente com Cristina Mendonça e seu esposo Niltinho, sempre prestativo e contemplativo no Plano Espiritual.

Ao Valdelino Fernandes..... Ah, Seo Valdelino!!

Aos Professores Frederico Ozanan, Renato Severino, Sérgio Salazar, André Luiz Quagliatto e o técnico Antônio. Sempre prontos para esclarecer conhecimentos esquecidos.

Ao Professor Humberto Eustáquio Coelho: à gênese deste trabalho. Milton Nascimento compôs a música que diz: "Amigo é coisa pra se guardar..." a qual me faz lembrar sempre deste companheiro.

À Professora Neide Maria da Silva com a sua simplicidade e vasto conhecimento, bem como sua orientanda Marisol Pallete Briceñoque, que gentilmente realizaram os exames de PCR para o diagnóstico das peças que foram incluídas no presente estudo.

À Professora Daise Aparecida Rossi, Coordenadora do Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, sempre prestativa e solícita nas orientações que se fizeram necessárias.

Ao Amado, amigo solidário em muitos momentos conflitantes. Seu nome diz tudo.

À Professora Eneida, colega de Mestrado e amiga. Foi ótimo ter dividido experiências acadêmicas. E que turma!!

Ao Professor Matheus. Ontem mesmo era Residente. Hoje é Doutor que já colhe reconhecimentos do seu desempenho profissional.

À amiga Cristiane Faria Teixeira pelas boas opiniões e ajuda nas questões relacionadas a gramática da língua inglesa.

À Mary Ellen, com quem comentei durante todo este período as dificuldades do Batman, enquanto salvávamos os animais em estado crítico. Não é que eles saravam?

À Susana, Veterinária completa. Quanta simplicidade e disponibilidade!

À Solange, Raquel, João e Sandra que fazem o dia a dia mais bonito e fácil de vencer as dificuldades e intempéries com a bondade e otimismo inerente a cada um.

À Célia Regina Macedo, que nos momentos difíceis me olhava e dizia: - "Oh, Zé..." - pronto, estava resolvida a dúvida.

À Helena, que sempre achou um tempinho para me ajudar nos meus afazeres, resultado dos meus esquecimentos.

À Vânia Amaral, pedagoga e amiga por quem devoto grande admiração pelo seu conhecimento e sensibilidade sobre a Educação. Imagino que as leituras do nosso mestre Paulo Freire a encantaram.

Ao Igor, que muito me ajudou com a sua paciência oriental.

Na pessoa do Professor Duvaldo Eurides, os meus agradecimentos a todos os colegas que se aposentaram.

Aos colegas que partiram para o Oriente Eterno, deixando uma luz de recordações e esperanças.

Aos meus alunos de Graduação e Residência, que me possibilitaram que eu, ao ensinar, aprendesse.

Agradeço a todos os colegas da Patologia Animal que me abriram suas portas para a execução deste trabalho e para a construção do conhecimento. Incluo aqui, Professores e Residentes.

À Professora Alessandra, de quem tenho orgulho de ser orientando. Ensinou-me através do diálogo Socrático, dividindo as responsabilidades. Sempre atenta, deixando que seguisse o meu ritmo próprio. Disponível em tempo integral para ensinar. Os meus sinceros e especiais agradecimentos.

*Ao Ser Humano é facultado o direito à expressão,
bem como o respeito a ela, ainda que o acordo não
reflita o mesmo fluxo de ideias.*

— JOSÉ EUGÊNIO

RESUMO

A cinomose é uma doença sistêmica viral e endêmica que acomete mamíferos terrestres e aquáticos e grandes felinos, sendo que a espécie mais acometida é o cão. Outras doenças, como a Erlichiose Canina (EC) pode ocorrer concomitantemente com a cinomose pelo seu caráter imunossupressor. Objetivou-se analisar os achados clínicos e hematológicos (leucograma, plaquetograma e eritrograma) de cães sorologicamente positivos para cinomose, e avaliar a ocorrência concomitante de cinomose e EC. Outro objetivo foi identificar o vírus da cinomose canina no nó sinoatrial (NSA) de cães sorologicamente positivos para cinomose, através da reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), além de analisar os achados macroscópicos e histológicos da cinomose no coração e outros tecidos. Foram selecionados 22 cães com sintomatologia sugestiva de cinomose. Amostras de sangue foram coletadas e submetidas à análise automatizada. Realizou-se ainda testes sorológicos para confirmação do diagnóstico de cinomose e EC. Todos os 22 cães que foram selecionados apresentando sintomatologia sugestiva de cinomose foram soropositivos e, destes, cinco (29,41%) foram soropositivos para erlichiose concomitantemente. Os dados hematológicos dos 17 cães soropositivos somente para a cinomose demonstraram que estes animais apresentaram discreta anemia normocítica normocrômica e leucocitose com neutrofilia. Animais com cinomose e erlichiose eram jovens e apresentaram valores de leucócitos dentro da normalidade e leve trombocitopenia. Quanto à vacinação, 5/22 (22,7%) possuía vacinação completa, segundo protocolo estabelecido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Dos cães estudados, 7/22 (31,8%) não eram vacinados. 6/22 (27,2%) dos cães, possuía vacinação incompleta e 4/22 (18,18%) não possuía informação a este respeito. Alterações cardíacas macroscópicas e microscópicas, principalmente dilatação cardíaca e miocardite, são frequentemente observadas em cães com cinomose. Somente um (5,88%) cão apresentou fragmento alvo de 319 bp para cinomose utilizando os primers VCC1 e VCC2, no nó sinoatrial. Conclui-se que o VCC pode localizar-se no nó sinoatrial de cães naturalmente infectados, como demonstrado neste estudo pela técnica de RT-PCR, reforçando a hipótese de que o VCC é capaz de provocar lesões inflamatórias no nó sinoatrial dessa espécie. Inclusões virais nas células epiteliais da bexiga são importante achado microscópico para diagnóstico da cinomose.

Palavras-chave: Canina. Cinomose. Erliquiose. Nô-sinoatrial.

ABSTRACT

Distemper is a systemic viral disease and endemic that affects terrestrial and aquatic mammals and big felines, but the most affected species is the dog. Other diseases, such as Canine Ehrlichiosis (CE) can occur concomitantly with distemper due to its immunosuppressive character. The objective was to analyze the clinical and hematological findings (leukogram, plaque, and erythrogram) of dogs serologically positive for distemper, and to evaluate the concomitant occurrence of distemper and CE. Another objective was to identify the canine distemper virus in the sinoatrial node (SAN) of dogs serologically positive for distemper, through the polymerase chain reaction, preceded by reverse transcription (RT-PCR), and to analyze macroscopic and histological findings of distemper in the heart and other tissues. Twenty-two dogs with symptomatology suggestive of distemper were selected. Samples of blood were collected and submitted to automated analysis. Serological tests were also performed to confirm the diagnosis of distemper and CE. All 22 dogs that were selected presenting symptomatology suggestive of distemper were seropositive and, of these, five (29.41%) were seropositive for concomitant ehrlichiosis. The hematological data of the 17 seropositive dogs only for the distemper showed that these animals showed a mild normochromic normocytic anemia and leukocytosis with neutrophilia. Animals with distemper and ehrlichiosis were young and had leukocyte values within normal range and mild thrombocytopenia. Most dogs with distemper were not vaccinated. Right heart dilation was observed in 13 dogs (76.47%) and left concentric hypertrophy in two dogs (11.76%). Microscopically, lymphocytic myocarditis was observed in four (23.53%) dogs and 41.18% (7/17) presented viral inclusion corpuscles in the bladder epithelium. Only one (5.88%) dog presented a 319 bp target fragment for distemper using primers VCC1 and VCC2 at the sinoatrial node. It is concluded that VCC can be located in the sinoatrial node of naturally infected dogs, as demonstrated in this study by the RT-PCR technique, reinforcing the hypothesis that distemper virus is capable of causing inflammatory lesions in the sinoatrial node of this species. Macroscopic and microscopic cardiac changes, mainly cardiac dilation and myocarditis, are frequently observed in dogs with distemper. Viral inclusions in bladder epithelial cells are an important microscopic finding for the diagnosis of distemper.

Keywords: Canina. Distemper. Ehrlichiosis. Sinoatrial node.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução -----	14
2. Revisão de Literatura-----	16
2.1. Nó Sinoatrial-----	16
2.2. Causas de Lesões no Nó Sinoatrial-----	17
2.3. Cinomose-----	18
2.4. Erlichiose-----	21
2.5. Tripanossomíase-----	23
3. Referências -----	24

CAPÍTULO 2 – Caracterização Clínica e Hematológica de Cães Naturalmente Infectados pelo Vírus da Cinomose Concomitante com Ehrlichiose -----	30
---	-----------

CAPÍTULO 3 – Lesões anatomico-histopatológicas em cães com cinomose e detecção do vírus em nó sinoatrial pela técnica de PCR -----	43
---	-----------

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença infectocontagiosa causada por vírus pertencente ao gênero *Morbillivirus*, família *Paramixoviridae*, envelopado, pleomórfico, com genoma viral de uma fita de RNA (MARTELA et al., 2008). Acomete canídeos domésticos e silvestres (GAMIZ et al., 2011) e extensa gama de hospedeiros, sendo o cão o seu principal reservatório (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Estudos prévios demonstraram que a população canina com cinomose encontra-se nas áreas urbanas endêmicas, com prevalência de 40,2% dos cães positivos no teste AT-PCR (BUDASZEWSKI et al., 2016). Trata-se de doença altamente contagiosa, com letalidade podendo chegar a 90%, quando há envolvimento do sistema nervoso e, em cães, somente a raiva apresenta letalidade mais elevada que a cinomose com manifestação neurológica (SWANGO, 1997).

Apesar de nenhum sinal clínico ser patognomônico da cinomose, a ocorrência simultânea de um grupo de sintomas facilita o diagnóstico da doença (APPEL; CARMICHAEL, 1979). A cinomose é caracterizada por imunossupressão seguida de infecções secundárias, devido hipotrofia de órgãos linfóides a partir do décimo dia de infecção (KRAKOWKA et al., 1980).

Assim como a cinomose, a erliquiose canina tem sido propósito de muitos estudos no Brasil (VIEIRA et al., 2011), visto ser endêmica em várias regiões. A cinomose e erliquiose são enfermidades de alta prevalência principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ESPINDOLA et al. 2015) e compartilham sinais clínicos, podendo ocorrer concomitantemente, devido ao caráter imunossupressor de ambas (MIRANDA et al., 2011; GIRARDI et al., 2014; VICENTE et al., 2011; SANTOS et al., 2012; ALMEIDA et al., 2009).

Casos de ocorrência concomitante de erliquiose e cinomose já foram descritos na literatura. Miranda et al. (2011) relataram caso de um cão sem alterações neurológicas que apresentava concomitantemente erlichiose, cinomose e babesiose. A ocorrência de cinomose, erlichiose e toxoplasmose também foi relatada por Girardi et al. (2014) e estes autores sugeriram que a imunossupressão causada pelo vírus da cinomose canina (VCC) resulta na reativação de uma infecção latente, pelo rompimento de cistos dormentes de *Toxoplasma gondii*.

Além da relação entre estas duas importantes enfermidades de alta prevalência no país, foi objeto desta tese o estudo de lesões cardíacas ocasionadas pelo VCC, uma vez que Nelson e Couto (2015) citam a possibilidade de que as viroses cardiotrópicas desempenham importante papel na patogenia da miocardite em várias espécies.

A infecção experimental de cães com menos de uma semana de idade com o VCC pode causar miocardite multifocal e necrose do miocárdio (SISSON; THOMAS, 1997; NELSON; COUTO, 2015). Higgins et al. (1981) relatam miocardite em cães jovens infectados experimentalmente pelo VCC.

Especificamente no nó sinoatrial, Mendonça e Coelho (2006) relataram lesões histológicas no miocárdio atrial e nó sinoatrial que compreendiam: infiltração linfocitária, infiltração gordurosa, degeneração hialina e hemorragia, em todos os cães soropositivos para cinomose estudados.

São escassas as publicações sobre microrganismos que parasitam o nó sinoatrial de canino e a possibilidade do VCC causar lesão especificamente neste local, como aventado por Mendonça e Coelho (2006), despertou o interesse em se verificar se o vírus pode estar nesta estrutura cardíaca.

Assim, considerando a importância destas doenças para os cães domésticos e com o intuito de fornecer dados que auxiliem no diagnóstico da cinomose e implementação de medidas terapêuticas no caso da ocorrência de ambas as doenças, os objetivos deste estudo foram:

- analisar aspectos clínicos e hematológicos (eritrograma, plaquetograma e leucograma) de cães sorologicamente positivos para cinomose, além de avaliar a ocorrência concomitante de cinomose e erliquiose;
- identificar o VCC no nó sinoatrial de cães sorologicamente positivos para cinomose, através do exame da PCR, além de analisar os achados macroscópicos e histológicos da cinomose no coração e outros tecidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

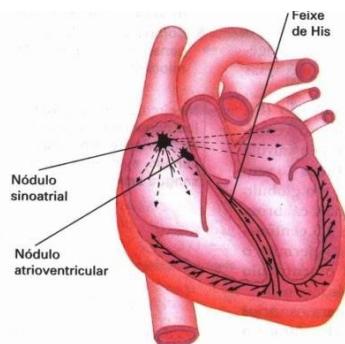
2.1 Nô Sinoatrial (NSA)

O nó sinoatrial no cão localiza-se na parede atrial direita no ponto onde a veia cava penetra no átrio direito. Apresenta células marca-passo que se despolarizam espontaneamente quando o coração inicia seus próprios potenciais de ação e contração muscular. Os neurônios motores não são necessários para iniciar as contrações cardíacas, o coração bate sem a influência simpática ou parassimpática. Cada batimento cardíaco normal é iniciado por um potencial de ação que surge espontaneamente em uma única célula marca passo do nó sinoatrial (CUNNINGHAN; KLEIN, 2008).

O nó sinoatrial, o átrio ventricular, os ramos do feixe de His e as fibras de Purkinge são, em conjunto, denominados sistema especializado de condução do coração (Figura 1). Este sistema é composto por células musculares cardíacas especializadas e não por nervos (CUNNINGHAN; KLEIN, 2008). O nó sinoatrial é o responsável pelo início do ritmo cardíaco e essencial para a fisiologia normal do coração (JOUNG et al., 2011).

Poucos estudos anatômicos têm sido conduzidos em cães. Nesta espécie tem sido descrito que o NSA é irrigado por um único ramo atrial originado na artéria coronária ou artéria circunflexa esquerda. Parece haver similaridade na origem e distribuição do NSA entre humanos e cães (ISUMISAWA et al., 1994).

Figura 1- Sistema de condução do estímulo cardíaco.



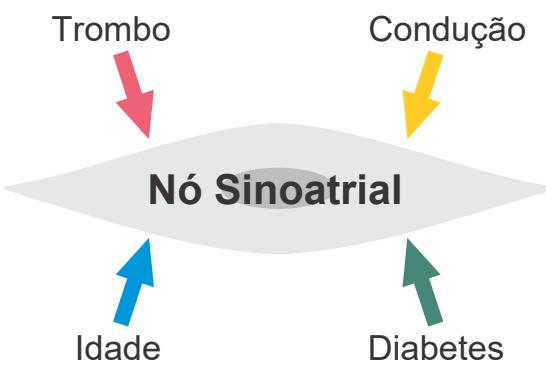
Fonte: CUNNINGHAN e KLEIN (2008).

2.2 Causas de Lesões no Nô Sinoatrial

A disfunção do nô sinoatrial tem etiologias multifatoriais (MONFREDI et al., 2010) (Figura 2).

Andrade et al. (1988) citaram que o nô sinoatrial também apresenta um adensamento do seu estroma com o avançar da idade e que sua disfunção pode ser considerada um fenômeno do envelhecimento.

Figura 2 - Etiologia multifatorial da disfunção NSA.



Fonte: adaptado de Monfredi et al. (2010).

Nakao et al. (2012) demonstraram que a síndrome do sinus doente (*sick sinus syndrome*) (SSS) é comum em cães machos de meia idade ou mais velhos da raça Schnauzer Miniatura e que outras raças como o Dachshund, West Highland e Cocker Spaniel, também são predispostas a SSS. Estes mesmos autores sugerem que há um processo degenerativo envolvendo o nô sinoatrial e fibrose do miocárdio atrial, gerando a síndrome bradicárdica e taquicárdica, que pode estar também associada a regurgitação crônica da valva mitral, que a maioria dos cães apresentaram o coração dilatado, globoso e com hipertrofia excêntrica esquerda.

Hamlem et al. (1994) relatam a aterosclerose no nô sinoatrial em duas cadelas da raça Beagle, de 11 meses de idade, com sintomas cardíacos. Microscopicamente observaram esclerose nas artérias que vascularizavam o nô sinoatrial, fibrose, estreitamento luminal,

hipertrofia da camada média e proliferação de células musculares lisas. O possível diagnóstico incluiu vasculite necrosante, poliarterite das coronárias e atheroscleroze.

2.3 Cinomose

O vírus da cinomose pertence ao gênero *Morbillivirus*, da família *Paramixoviridae* e é um vírus envelopado, pleomórfico e o seu genoma viral consiste de uma fita de RNA (MARTELA et.al.2008). É uma doença infecto-contagiosa de origem viral, que acomete canídeos domésticos e silvestres, Procionideos, Ursidaes, mamíferos aquáticos e, raramente, grandes felídeos e já foi descrita em porcos cateto. São descritas em primatas, em sistema de cativeiro no Japão e estão relacionadas com a doença de Paget em humanos (YOSHIKAWA et al., 1989; COUTO et al., 2010; GAMIZ et al., 2011).

O vírus da cinomose canina é o mais importante patógeno de cães e carnívoros silvestres e a sua ocorrência é relevante em todos os continentes e estando associada com alta mortalidade e morbidade. No cão leva a manifestações respiratórias, gastrointestinais, dermatológicas, oftálmicas e neurológicas (BUDASZEWSKI et al., 2016).

Rima et al. (1991) relataram que cães com cinomose que apresentam lesões em consequência da desmielinização e infecção provocadas pelo vírus no cérebro, demonstram pequena resposta humoral. Cães recuperados da infecção reagem a lesão desmielinizante e produzem anticorpos contra proteínas do vírus e essa reação é observada precocemente após a infecção. Alguns cães desenvolvem encefalite desmielinizante e não resistem, outros superam a infecção e sobrevivem, apresentando quadro subagudo ou crônico. Portanto, a habilidade do cão em superar a infecção causada pelo vírus da cinomose está associada a produção rápida de resposta humoral específica e da habilidade das células de defesa em reagirem contra o vírus.

Budaszewski et al. (2016) estudando a evolução do vírus da cinomose sugeriram evidências que a recombinação do vírus ocorre na população canina naturalmente, mas que esta recombinação pode ocorrer entre o vírus do campo e o da vacina.

Com relação às alterações laboratoriais de cães com cinomose, Tudury et al. (1997) acompanharam cães com manifestação clínica sistêmica e neurológica e relataram anemia (48,05%), leucocitose (33,77%), leucopenia (14,28%), neutrofilia (40,25%), neutropenia (2,59%) e linfopenia (51,95%). Já Silva et al. (2005) verificaram anemia (61%), leucopenia (46%), leucocitose acompanhada por neutrofilia (8%), desvio para a esquerda (54%),

linfocitopenia (85%) e trombocitopenia (69%), além de corpúsculo de inclusão de Lentz principalmente em neutrófilos, embora para Jain (1993) inclusão viral seja mais frequente em linfócitos.

A leucopenia pode ocorrer na fase inicial da cinomose, seguida por leucocitose devido a infecções bacterianas secundárias. A linfocitopenia presente é consequência da atrofia e necrose do tecido linfoide provocada pelo vírus. Os linfócitos T e B são depauperados e a imunidade celular e humoral suprimidas em alguns cães enfermos. Quanto ao corpúsculo de inclusão de Lentz, este é de ocorrência rara em eritrócitos imaturos e leucócitos e de frequência maior em linfócitos do que em neutrófilos (JAIN, 1993).

Quanto às lesões no sistema cardiovascular, apesar de serem descritas lesões miocárdicas em filhotes naturalmente infectados pelo vírus da cinomose desde 1970 (MAXIE, 2007), poucos pesquisadores investigaram a ação do vírus sobre este sistema.

Mendonça e Coelho (2006) estudaram o nó sinoatrial de 35 cães com cinomose e observaram dilatação cardíaca em 97,14% dos animais. As lesões microscópicas consistiram de infiltração linfocitária em 42,86% dos casos; infiltração gordurosa em 28,57%; degeneração hialina em 8,57%; hemorragia em 18,57%; ausência de lesões em 25,7%. As lesões foram de prevalência maior em cães machos e não houve influência da idade na frequência das lesões.

Bastos et al. (2007) estudaram as alterações histopatológicas no nó sinoatrial de 31 corações dilatados de cães que morreram naturalmente. Verificaram alterações microscópicas degenerativas vasculares e inflamatórias no nó sinoatrial de 45,3% dos corações. As alterações microscópicas observadas foram: inflamação linfocitária, degeneração hialina (26,2%), metamorfose gordurosa (9,5%), hemorragia (7,1%), inflamação fibrinosa (7,1%), inflamação supurada (24%) e trombose (2,4%).

Rezende et al. (2009) pesquisaram as alterações histopatológicas no miocárdio de 35 cães com cinomose e os achados foram: miocardite (42,8 %) preponderando a infiltração linfocitária, degeneração hialina (31,4%), hiperemia (14,3 %) e hemorragia (11, 4 %).

Quanto à profilaxia da doença é indiscutível que a utilização de vacina é a melhor alternativa para o controle da doença. Considerando que depois da raiva é a doença mais grave e letal para os cães (BUDASZEWSKI et al., 2014).

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar falências imunizatórias no caso da cinomose, como protocolos incorretos ou armazenamento impróprio das vacinas, resposta

insuficiente imune do hospedeiro, além de cepas emergentes com divergências antigênicas capazes de escapar da imunidade obtida nas vacinas (BUDASZEWSKI et al., 2014).

O uso de imunoestimulantes tem se demonstrado promissor para a cura do cão enfermo, principalmente em filhotes, os mais susceptíveis à letalidade do vírus, mas ainda apresentam falhas e contra indicações. Liu et al. (2016) relataram sucesso no tratamento de cães jovens infectados naturalmente com cinomose e tratados com altos títulos de anticorpos xenogênicos, utilizando antivírus da cinomose canina-suína. Ressaltaram ainda que o êxito do tratamento requer administração adequada do soro de forma imediata no início da doença.

Sobre o diagnóstico da enfermidade, Frisk et al. (1999) realizaram diagnóstico da cinomose canina pela técnica RT-PCR utilizando soro, sangue total e liquor cérebro espinhal e confirmou o RT- PCR como seguro e sensíveis para o diagnóstico do vírus da cinomose em cães.

Podem ser observadas inclusões nos linfócitos, neutrófilos e eritrócitos, que são núcleo capsídeos esféricos localizados centralmente nas células, ligeiramente azulados na coloração de Romanowski (BUSH, 2004). O corpúsculo de inclusão do vírus da cinomose embora conclusivo constitui-se um achado pouco freqüente e, nos resultados negativos, o diagnóstico torna-se inconclusivo (GEBARA et al., 2004).

Exames complementares como hemograma e métodos sorológicos não possibilitam a realização do diagnóstico diferencial conclusivo da infecção pelo vírus da cinomose em cães e a técnica RT-PCR realizada em urina, pode ser utilizada no diagnóstico ante-mortem da infecção pelo vírus da cinomose (GEBARA et al., 2004). Estes autores observaram que RT-PCR realizada em urina ante mortem pode sofrer interferências de vários fatores, como método de extração do RNA, padronização dos reagentes, forma de conservação e o tempo de estocagem, considerando que o RNA do vírus da cinomose é constituído de fita simples, facilmente degradável. Relataram ainda que RT-PCR de urina detectou positividade, mesmo em situações em que o isolamento viral e a imunohistoquímica foram negativas.

Negrão et al. (2007) avaliaram urina e leucócitos para detecção ante-mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados, verificaram que a urina deve ser incluída como material clínico de eleição para a realização do diagnóstico ante-mortem da cinomose canina por meio da RT-PCR, independente da apresentação clínica. A positividade para o vírus da cinomose encontrado na urina foi superior ao observado em leucócitos.

Frisk et al. (1999) estudaram diagnóstico da cinomose canina pela técnica RT- PCR utilizando soro, sangue total e liquor e confirmam ser o método RT- PCR como seguro e sensível para o diagnóstico do vírus da cinomose em cães.

Silva et al. (2010) avaliaram setenta cães com cinomose observando distribuição e tipos de lesões no sistema nervoso central. Verificaram que corpúsculos de inclusão no encéfalo são muito comuns nos astrócitos e com freqüência menor em neurônios, e são vistos, independentes da célula, predominantemente no núcleo.

2.3 Erliquiose

A erliquiose e anaplasmosse são doenças transmitidas pelo carapato, causadas por bactérias do gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma* e estão difundidos na natureza. Seus reservatórios incluem inúmeros animais silvestres e alguns animais domésticos. São pleomórficos, Gram negativos e parasitas obrigatoriamente intracelulares. Pertencem à família *Anaplasmataceae* ordem Rickettsiales. Várias espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* parasitam animais e um número limitado destes organismos tem sido identificado em humanos (CENTER FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2013).

O gênero *Ehrlichia* apresenta cinco espécies reconhecidas: *E. canis*, *E. chaffensis*, *E. ewingil*, *E. muris* e *E. ruminantium*. A *E. canis* causa a erliquiose monocítica canina e a *E. chaffensis*, causa doenças em cães e humanos. Nos humanos é chamada de erliquiose monocítica e a *E. canis* raramente causa doença nos humanos (CENTER FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2013).

A erhliquiose monocítica humana causada pela *E. chafensis* foi diagnosticada nos Estados Unidos em 1987. O gênero *Erhlichia* devido a afinidades genéticas entre as espécies é dividido em três gene grupos: Genegrupo I- Incorpora três espécies, *E. canis*, *E. chanffensis* e *E. ewingii*. Genegrupo II- Inclue *E. phagocytophila*, *E. equi* e o agente da erlichiose granulocítica humana. Genegrupo III: Abrange duas espécies: *E. senaetisu* e *E. risticii*. Muitos autores sugerem que a erhlichiose granulocítica humana, ocorre com a *E. chanffensis* e duas espécies adicionais, a *E. eninguii* e o agente da erlichiose granulocítica humana. É zoonótica e também ocorre em cães e cervídeos (CENTER FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2013).

Vieira et al. (2011) consideram que a *Ehrlichia canis*, é a principal espécie em cães no Brasil, embora a *E. ewingii* seja suspeita de parasitar cinco cães. Sugere a ocorrência da erliquiose humana no Brasil, mas o agente etiológico ainda não foi identificado. Seus estudos confirmam que em algumas áreas do Brasil a erliquiose é endêmica.

Ehrlichia canis, o agente etiológico da Erliquiose Canina (EC), uma bactéria Gram negativa pertencente à família Rickettsiales, gênero *Ehrlichia* (QUIN et al., 2005), de vida intracelular obrigatória de células hematopoiéticas maduras ou imaturas e de monócitos. Os animais infectados por *E. canis* podem apresentar sintomas clínicos variados, incluindo anorexia, perda de peso, hemorragias, linfadenomegalia e febre, além de anemia, trombocitopenia e aplasia medular (SILVA et al., 2009). A EC é uma doença de diagnóstico difícil por possuir várias manifestações atípicas, o que dificulta consideravelmente o diagnóstico clínico (ALMOSNY; MASSARD, 2002).

Nayak et al. (2013) consideraram a miocardite causada pela erliquiose monocítica em humanos incomum, mas estudos em cães com infecção aguda causada pela *Ehrlichia canis* apontam a possibilidade de provocar injúrias no miocárdio.

Keene (2002) estudou a epidemiologia dos fatores que podem provocar endocardite em cão citando a *Ehrlichia* e a *Bartonella* como agentes capazes de predispor a endocardite. Diniz et al. (2008) relataram que lesões em células do miocárdio ocorrem em cães infectados naturalmente com *Ehrlichia canis* no Brasil.

Guedes et al. (2015) ao estudando a epidemiologia da erliquiose no município de Itaberaba-BA, detectaram a presença de *Ehrlichia sp* no sangue. Compararam a sensibilidade e especificidade do esfregaço sanguíneos e testes sorológicos e moleculares. Foram estudados 379 cães, e os resultados foram: 12,4% positivos no esfregaço sanguíneo, 32,7% positivo no teste sorológico (Reação de Imunofluorescência Indireta) e 25% positivos nos testes de Reação em Cadeia da Polimerase. Concluíram que exames sorológicos complementam os exames de esfregaço e que combinados otimizam o diagnóstico da erliquiose.

Carlos et al. (2011), no município de Ilhéus e Itabuna no Estado da Bahia, verificaram que dos 100 caninos estudados na cidade de Ilhéus cinco apresentaram mórula no esfregaço e 43 possuíam anticorpos para erliquiose. Em Itabuna, dos 100 caninos estudados, 5 apresentaram mórula no esfregaço e 29 apresentaram presença de anticorpos. Os métodos utilizados para diagnóstico foram esfregaço sanguíneo, Dot-ELISA e Nested-PCR. O sequenciamento do DNA foi compatível com *Ehrlichia canis*.

2.5 Tripanossomíase

Com relação à ocorrência de tripanossomíase em cães, Leça et al. (2013) relataram infecção natural por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em dois cães, na área rural considerada endêmica no sul do estado da Bahia, diagnosticados pela técnica de PCR.

Também Maywald et al. (1996) estudaram a ocorrência de leishmaniose e doença de Chagas no município de Uberlândia- MG e Coromandel e dos 230 cães pesquisados no município de Uberlândia, um apresentou anticorpos anti *T. cruzi*.

Cabral et al. (1998) pesquisaram anticorpos anti *T. cruzi* em cães na área rural de Uberlândia, MG. Utilizaram reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e detectaram 2 (0,6%) cães positivos, concluindo que a região de Uberlândia não era endêmica à doença de Chagas.

Quanto às lesões cardíacas associadas ao *T. cruzi*, Morales- Rodrigues et al. (2001) citaram *T. cruzi* como responsável por lesões no nó sinoatrial dos animais domésticos e silvestres, incluindo cães, gatos e roedores, e menciona o cão como seu principal reservatório. Andrade et al. (1988) e Scalabrine et al. (1996) verificaram lesões diretas, funcionais e anatômicas do nó sinoatrial, a partir da extensão da miocardite pelo *T. cruzi*, após inoculação experimental.

Scalabrine et al. (1996) inoculou a forma tripomastigota do *T. cruzi* em quatro cães de raça não definida e observaram discreta inflamação linfoplasmocitária e infiltração de polimorfonucleares no nó sinoatrial.

3. REFERÊNCIAS

- ALEMAN, A. R. et al. Identification of intracytoplasmic inclusion bodies in mononuclear cells from the cerebrospinal fluid of a dog with canine distemper. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 84-85, 1992.
- ALMEIDA, R.K. et al. Cytological alterations of the bone marrow and peripheral blood of dogs with canine distemper. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.6, p. 1255-1260, 2009.
- ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L. Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: ALMOSNY, N.R.P. (Ed.): **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. LF Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, pp. 13-56, 2002.
- ANDERSON, N. V. **Veterinary Gastroenterology**. 2^a Ed. Filadelphieia, 1992.873p.
- ANDRADE, Z.; CÂMARA, N. J. E.; SADIGURSKI, M. Envolvimento do nó sinusal na doença de Chagas. **Arquivo Brasileiro Cardiologia**, v.50, n.3, p.153-158, 1988.
- APPEL, M.J.; CARMICHAEL, L.E. Systemic viral diseases. In: CATCOTT, E.J. (Ed.): **Canine Medicine**. American Veterinary Publications, Santa Barbara, pp. 17-48, 1979.
- BASTOS, J.E.D. et al. Alterações histopatológicas do nó sinoatrial em cães com dilatação cardíaca. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 13, n. 2, p. 15-21, 2007.
- BATISTA, V. S. et al. Ocorrência de Corpúsculo de Sineglaglia - Lentz em esfregaço sanguíneo de 70 cães com suspeita clínica de cinomose. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v.7, p. 15, suplemento, 2000.
- BUDASZEWSKI, R. F. et al. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. **Infection Genetics and Evolution**, v.41, p. 262- 269, 2016.
- BUDASZEWSKI, R.F. et al. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**, v.180, p.76–83, 2014.
- BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. Ed. Roca, São Paulo, 2004. 376 p.
- CABRAL, D. D. et al. Detecção de anticorpos anti *Leishmania* (VIANNIA) *brasiliensis* e *L. donovani*, anti *Tripanosoma cruzi* e anti *Toxoplasma gondii* em cães da Área Rural do Município de Uberlândia, MG, Brasil. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.4, n.1, p. 15- 19, 1998.
- CARLOS, R. S. A. et al. Risk factors and clinical disorders of canine Ehrliquiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n.3, p. 210-214, 2011.
- CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. **Erlichiosis and Anaplasmosis: zoonotic species**. College of Veterinary Medicine Loawa State University, 2013.

- CORREA, W. N.; CORREA, C. N. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** MEDSI. Rio de Janeiro, 1992. 843 p.
- CORTADELLAS, O. **Manual de nefrologia e urologia clínica canina e felina.** Ed. MedVet. São Paulo, 2012. 246 p.
- CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de fisiologia veterinária.** Rio de Janeiro: Elsevier. 4 ed. 2008. 710p.
- DEEN, S. L. et al. Canine distemper in terrestrial carnivores: A review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.31, n.4, p. 44-451, 2000.
- DINIZ, P. P. V. P., et al. Serum Cardiac Troponin I concentration in dogs with Ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, p.1136- 1146 , 2008.
- ESPINDOLA, P.P.; BELLINIA, M.L.; VICENTE, P.U.C. Correlation between thrombocytopenia and canine *Ehrlichia canis* during laboratory routine in a Veterinary Clinic. **Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.19. p. 163-169, 2015.
- FRISK, A. L. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription PCR using serum, whole blood and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 36-43. 1999.
- GAMIZ, C. et al. Identification of a new genotype of canine distemper disease circulating in America. **Veterinary Research Communications**, v.35, p. 381-390, 2011.
- GEBARA, C. M. S. et al. Detecção do gene da mucoproteína do vírus da cinomose por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.56, p. 480- 487, 2004.
- GIRARDI, A.F. et al. Ocurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and *Ehrlichia canis* antibodies in dogs with nervous alterations assisted at a veterinary teaching hospital. **Semina: Ciência Agricola**, v. 35, p.1913-1922, 2014.
- GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: GREENE, C.E. (Ed.): **Infectious Diseases of the Dog and Cat.** Elsevier Health Sciences, Philadelphia, pp. 25-42, 2012.
- GUEDES, P.E.B. et al. Canine erlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. **Journal Parasitology**, v.24, p.115-121, 2015.
- HANLEN, H. J. KARGAS, S.A., BLUN, Jr. Sinoatrial node arteriosclerosis in two young dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.1; 204 (5) p. 751-755. 1994.
- HIGGINS, R.J. et al. Canine distemper virus associated cardiac necrosis in the dog. **Veterinary Pathology**, v.18, p. 472-486, 1981.
- ISUMISAWA et al. Blood Supply of the sinus node artery in beagle dogs. **Heart Vessel.** V. 9. p. 96- 103. 1994.

- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology.** Lea & Febiger, Philadelphia, 1993. 417p.
- JANNUS, I. et al. Miocarditis in dogs: etiology clinical and histopathological features (11 cases: 2007- 2013). **Irish Veterinary Journal**, v.67, n.28, p.1- 8. 2014.
- JOUNG, B. et al. The role of the calcium and voltage clocks in sinoatrial node (dysfunction). **Yonsei Medical Journal**, v.52, n.2, p. 211-219, 2011.
- MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.** 6^a ed., Philadelphia: Elsevier, 2007. 2060p.
- KANESHIGE, T. et al, Complete atrioventricular block associated with lymphocytic miocarditis of the atrioventricular node in the two young adult dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.137, p. 146-150, 2007.
- KEENE, B. W. Infective Endocarditis. **Walthan® Diet OSU Symposium. Small Animal Cardiology**, 2002.
- KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.J.; KOESTNER, A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 284-292, 1980.
- KUBO, T. et al. Distribution of inclusion bodies in tissues from 100 dogs infected with canine distemper virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, p. 527-529, 2007.
- LEÇA, J.R. et al. First report of *Tripanosoma cruzi* infection in naturally infected dog from southern Bahia, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.182- 185, 2013.
- LIU, P.C. et al. Application of xenogeneic anti- canine distemper virus antibodies in treatment of canine distemper puppies. **Journal of Small Animal Practice**, p.1- 5, 2016.
- MARTELA, V.; ELIAS, G.; BOONO, C. Canine distemper virus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, p. 787- 797, 2008.
- MAYWALD, P.G. et al. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em município do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, n.3, p. 321- 328, 1996.
- MENDONÇA, C. S.; COELHO, E. H. Alterações anatomo-histopatológicas no coração de cães com cinomose. **Bioscience Journal**, Uberlândia., v. 22, p.169- 179, 2006.
- MIRANDA FJB, et al. Infecção simultânea por *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e vírus da cinomose canina - Relato de Caso. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 3, p.238 – 246, 2011.
- MONFREDI, O. et al. The anatomy and physiology of the sinoatrial node. A contemporary review. **Pacing and Clinical Electrophysiology**, v. 33, p.1392-1406, 2011.

MORALES-RODRIGUES, O. et al. *Tripanosoma cruzi* connatal transmission in dogs with Chagas diseases: Experimental case report. **Vector Born and Zoonotic Diseases**, v. 1, n.10, p.1365-1370, 2011.

NAKAO, S. et al. The anatomical basis of bradycardia- tachycardia, syndrome in elderly dogs with chronic degenerative valvular disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p.175-182, 2012.

NAYAK, S. U.; SIMON, G. L. Myocarditis after trimethoprim- sulfametohcazoli treatment for Ehrlichiosis. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.12, p.1975- 1977, 2013.

NEGRAO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.59, p.253-257, 2007.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. Elsevier, 5^a. Ed., Rio de Janeiro, 2015. 1512 p.

QUIN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed, São Paulo. 2005, 512 p.

REZENDE. R. S. et al. Análise microscópica do miocárdio ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.2, p.117- 119, 2009.

RIMA, B. K., et al. Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dog experimentally infected with canine distemper virus. **Archive of Virology**, v. 128, p.1- 8, 1991.

ROBINSON, W. F.; THOMPSON, R. R.; CLARK, W. T. Sinoatrial arrest associated with primary atrial myocarditis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, p.99-107, 1981.

SANTOS, J. P. et al. Estudo retrospectivo de cães positivos para cinomose em ensaio imunocromatográfico atendidos no Hospital Veterinário de Uberaba-MG. **Veterinária Notícias**, v.18, p. 31-36, 2012.

SCALABRINI, A. et al. Correlação clínico-patológica na forma indeterminada da Doença de Chagas do cão. **Arquivo Brasileiro Cardiologia**, v.67, n.6, p. 385- 388, 1996.

SILVA, I.N.G. et al. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.57, p.136-139, 2005.

SILVA, F. M. P. et al.. Ehrlichioses. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 290- 302, 2009.

SILVA, J. N., et al. Soroprevalência de anticorpos anti *Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. Perfil Hematológico em Cães Infectados Naturalmente por Cinomose com Presença de Corpúsculo de, Jaboticabal, v.19, n.2, p.108- 111, 2010.

SILVA, M. C. et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005- 2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p. 643-652, 2009.

SISSON, D. D.; THOMAS, W. P. Afecções do miocárdio. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, Seção 9, cap. 96, p. 1383-1394.

SONNE, L. et al. Achados patológicos e imunohistoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.2, p.143-149, 2009.

SWANGO, L. J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap.69, p. 573-588.

TAMS. T.R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. Ed. Roca, 454 p. 2005.

TUDURY, E. A. et al. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 229- 235, 1997.

VICENTE, A.F.; ABREU, A.P.M.; PASSOS, A.A.M.S. Perfil Hematológico em Cães Infectados Naturalmente por Cinomose com Presença de Corpúsculo de Sinegaglia Lentz, em Vassouras – RJ. **Revista de Saúde**, v.1, p.49-54, 2010.

VIEIRA, F. C., et al. Ehrliquiosis in Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** Jaboticabal, v.20, n.1, p. 1- 12, 2011.

WOOLLEY, R. et al. Atrial myocarditis as a cause of sinus arrest in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, p. 455-457, 2007.

YOSHICAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MACHUBARA, Y. et al. Natural infection with canine distemper virus in a Japonese monkey. **Microbiology**, v. 20, p. 193- 205, 1989.

CAPÍTULO 2 - Artigo a ser submetido no periódico Acta Veterinaria Brno

**“Caracterização Clínica e Hematológica de Cães Naturalmente Infectados pelo
Vírus da Cinomose Concomitante com Ehrlichiose”**

Resumo

A cinomose é uma doença sistêmica viral e endêmica que acomete mamíferos terrestres e aquáticos e grandes felinos, porém a espécie mais acometida é o cão. Outras doenças, como a Erlichiose Canina (EC) pode ocorrer concomitantemente com a cinomose pelo seu caráter imunossupressor. Objetivou-se analisar os achados clínicos e hematológicos (leucograma, plaquetograma e eritrograma) de cães sorologicamente positivos para cinomose, e avaliar a ocorrência concomitante de cinomose e EC. Foram selecionados 22 cães com sintomatologia e sorologia sugestiva de cinomose. Amostras de sangue foram coletadas e submetidas à análise automatizada. Realizou-se ainda testes sorológicos para confirmação do diagnóstico de cinomose e EC. Todos os 22 cães que foram selecionados apresentando sintomatologia sugestiva de cinomose e, destes, cinco (29,41%) também foram soropositivos para erlichiose. Nenhum dos 22 cães apresentou corpúsculos de inclusão de Lentz ou mórlulas no esfregaço de sangue periférico. Os dados hematológicos dos 17 cães soropositivos somente para a cinomose demonstraram que estes animais apresentaram discreta anemia normocítica normocrônica e leucocitose com neutrofilia. Animais com cinomose e erlichiose eram jovens e apresentaram valores de leucócitos dentro da normalidade e leve trombocitopenia. A maioria dos 17 cães com cinomose não eram vacinados ou não apresentavam atualização. As enfermidades apresentam relativa similaridade entre si, tanto no aspecto clínico quanto laboratorial no que se refere aos achados hematológicos. Dificultando em algumas situações o diagnóstico clínico diferencial.

*Hemograma, vírus cinomose, *Erlichia canis*, sinais clínicos, ocorrência*

A cinomose é uma doença infectocontagiosa de origem viral que acomete canídeos domésticos e silvestres, procionídeos, ursídeos, mamíferos aquáticos e, raramente, grandes felídeos (Gamiz et al. 2011). Tem uma gama extensa de hospedeiros, sendo o cão o seu principal reservatório (Greene and Vandervelde 2012). O vírus da cinomose pertence ao gênero *Morbillivirus*, família *Paramixoviridae*, é um vírus envelopado, pleomórfico e o seu genoma viral consiste de uma fita de RNA (Martela et al. 2008).

As manifestações clínicas são sistêmicas, abrangendo principalmente o sistema respiratório, gastrintestinal e neural. Trata-se de uma doença caracterizada por imunossupressão seguida de infecções secundárias, com os órgãos linfóides sofrendo hipotrofia a partir do décimo dia de infecção (Krakowka et al. 1980). Apesar de nenhum sinal

clínico ser patognomônico da cinomose, a ocorrência simultânea de um grupo de sintomas facilita o diagnóstico da doença (Appel e Carmichael 1979).

Ehrlichia canis, o agente etiológico da Erliquiose Canina (EC), uma bactéria *Gram negativa* pertencente à família Rickettsiales, gênero *Ehrlichia* (Quim et al. 2005), de vida intracelular obrigatória de células hematopoiéticas maduras ou imaturas e de monócitos. Os animais infectados por *E. canis* podem apresentar sintomas clínicos variados, incluindo anorexia, perda de peso, hemorragias, linfadenomegalia e febre, além de anemia, trombocitopenia e aplasia medular (Silva et al. 2009). A EC é uma doença de diagnóstico difícil por possuir várias manifestações atípicas, o que dificulta consideravelmente o diagnóstico clínico (Almosny e Massard 2002).

A cinomose e EC são enfermidades de alta prevalência principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Espindola et al. 2015) e compartilham sinais clínicos, podendo ocorrer concomitantemente, devido ao caráter imunossupressor de ambas.

Considerando a importância destas doenças para os cães domésticos e com o intuito de fornecer dados que auxiliem no diagnóstico da cinomose e implementação de medidas terapêuticas no caso da ocorrência de ambas as doenças, objetivou-se analisar os aspectos clínicos e hematológicos (eritrograma, plaquetograma e leucograma) de cães sorologicamente positivos para cinomose, além de avaliar a ocorrência concomitante de cinomose e EC.

Material e Métodos

No período de junho a dezembro de 2016, foram selecionados para o estudo 22 cães que apresentaram sintomatologia sugestiva de cinomose. Estes animais foram encaminhados voluntariamente ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFG) por seus proprietários responsáveis para atendimento clínico.

Quanto à idade, os animais foram agrupados em: jovens (animais até um ano de idade), adultos (1 a 10 anos de idade) e idosos (maiores de 10 anos) (Fighera et al. 2008). Os sinais clínicos considerados sugestivos para cinomose foram: anorexia, hipertemia, conjuntivite, uveíte, coriorretinite, queratoconjuntivite seca, descarga nasal mucopurulenta, pneumonia, gastroenterite hemorrágica ou não, rigidez cervical, convulsões, mioclonia, ataxia, paresia, tetraparesia, pústulas, hiperqueratose nasal e/ou dos coxins plantares (Greene e Vandervelde 2012).

Foram coletadas amostras de sangue da veia safena utilizando agulhas descartáveis 21g. O sangue colhido em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K3) foi submetido à análise automatizada em contador automático de células ABC Vet Animal Blood Counter (Horiba ABX Diagnostic Ltda, São Paulo – SP). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por microscopia óptica, em extensões sanguíneas coradas pelo MayGrünwald Giemsa (Matos e Matos 1988). Os resultados do hemograma foram confrontados com os valores de normalidade descritos por Rizzi et al. (2010). A pesquisa de corpúsculo de Lentz foi realizada em esfregaço de sangue de ponta da orelha corado pelo Giemsa.

Coletou-se ainda amostra de sangue em tubos plásticos sem anticoagulante para obtenção do soro a ser utilizado para sorologia de cinomose e EC. O diagnóstico sorológico da cinomose e erliquiose foi realizado utilizando-se teste de imunoensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos (IgG e IgM) para *Erlichia canis* (Alere Erliquiose AcTest®) e cinomose (Alere Cinomose AgTest®), seguindo instruções do fabricante.

Na análise estatística dos dados, as médias dos parâmetros avaliados no hemograma foram comparadas entre os animais com cinomose e animais com cinomose e erlichiose. Teste de Lilliefors foi utilizado para verificação da normalidade.

Para análise das variáveis não paramétricas foi utilizado teste de Mann Whitney e para as variáveis paramétricas análise de variância com o teste F. Um $p < 0,05$ foi utilizado com significância.

Resultados

Vinte e dois cães foram selecionados para estudo, sendo cinco machos (22,73%) e 17 (77,27 %) fêmeas. Quanto à idade, oito (36,36%) cães eram jovens, sete (31,82%) adultos e sete (31,82%) idosos, sendo que 19 (86,3%) cães eram sem raça definida (SRD) e um da raça Poodle (4,54%), outro Cocker Spaniel (4,54%) e Pastor Alemão (4,54%).

Todos os 22 cães selecionados apresentaram sintomatologia sugestiva de cinomose foram soropositivos e, destes, cinco (22,73%) foram soropositivos para erlichiose concomitantemente.

A frequência de sinais clínicos em 17 cães soropositivos para cinomose e em cinco cães positivos para cinomose e erliquiose, concomitantemente, estão demonstrados na Tabela 1. Todos os cães apresentaram mioclonia, sendo o achado clínico mais frequente e somente cães de até oito meses de idade apresentaram pústulas abdominais.

Corpúsculos de inclusão de Lentz não foram observados no esfregaço sanguíneo dos 22 cães soropositivos para cinomose. Com relação a presença de mórlula, os cinco animais soropositivos para erliquiose e cinomose não apresentaram mórlulas no esfregaço sanguíneo.

Os valores médios do número de hemácias, teor de hemoglobina e do volume globular, tanto nos cães soropositivos para cinomose como naqueles soropositivos para cinomose e erliquiose foram inferiores aos valores de referência confrontados (Tabela 2).

Na comparação das médias dos parâmetros avaliados no hemograma entre os animais com cinomose e animais com cinomose e erlichiose, somente a variável HCM foi diferente entre os grupos ($p=0,0379$), sendo a média menor no grupo com cinomose.

Os valores médios de plaquetograma (Tabela 2) nos cães soropositivos para cinomose permaneceram dentro dos limites de referência, enquanto que nos cinco cães soropositivos para cinomose e erliquiose foram ligeiramente inferiores aos valores de referência confrontados.

Os valores médios dos leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes dos 17 cães soropositivos apenas para cinomose permaneceram acima dos limites fisiológicos (Tabela 3), caracterizando leucocitose por neutrofilia e desvio nuclear de neutrófilos para a esquerda (DNNE). Dez cães (58,82%) apresentaram desvio nuclear neutrofilico para a esquerda e 12 neutrofilia (70,59%). Linfopenia foi observada em quatro (23,13%) cães. A plaquetopenia foi evidenciada em oito cães (47,06%).

No eritrograma, 10 animais com cinomose apresentaram anemia, predominando do tipo normocítica normocrômica ($n=7$; 70,0%). Anemia normocitica hipocromica foi observada em três cães (23,08%) e macrocítica hipocromica em apenas um cão(10,0%).

Com relação aos cães que apresentaram concomitantemente cinomose e erlichiose, dois (40%) eram jovens, dois (40%) adultos e um (20%) idoso, ou seja, a intercorrência das duas enfermidades ocorreu principalmente em animais jovens e adultos.

Quanto às alterações hematológicas, dois (40%) cães soropositivos para cinomose e erliquiose apresentaram anemia normocítica normocrômica, dois (40%) anemia normocítica hipocrômica e um (20%) microcítica normocrômica.

Neste estudo, os animais com cinomose e erlichiose apresentaram, em média, valores médios de leucócitos dentro da normalidade e discreta plaquetopenia observada em três (60%) cães.

No leucograma, 2 cães (40%) apresentaram leucocitose. Um cão (20%) apresentou leucocitose por neutrofilia (DNNE) e o outro leucocitose com DNNE por linfocitose (20%).

Um cão (20%) apresentou leucopenia e os demais apresentaram valores de neutrófilos dentro da normalidade. Três cães (60%) apresentaram linfopenia e um (20%) linfocitose.

Quanto à imunização, cinco (5/22 - 22,7%) cães possuíam histórico de vacinação completa, segundo protocolo estabelecido no HV-UFU, de três doses a partir de 45 dias e reforço anual. Sete animais estudados (31,8%) não eram vacinados, seis (27,2%) possuíam vacinação incompleta e quatro (18,18%) não possuíam informação.

Discussão

A maioria dos cães com cinomose eram SRD, assim como relatado por Vicente et al (2010) que encontraram em seu estudo 41% dos cães SRD. Porém, a maioria dos autores confirma que não há predileção por sexo e raça (Headley e Graça 2000, Greene e Vandeveld 2012). Esta discordância se dá pelo número de cães atendidos no HV-UFU ser predominantemente SRD.

Silva et al. (2009) e Santos et al (2012) relataram que a cinomose é mais frequente em cães com mais de um ano, fato também observado neste estudo, com a maioria dos cães na faixa etária de adultos e idosos. Entretanto, Correa e Correa (1992) citam que a incidência é mais alta entre os 60 e 90 dias de vida, período em que diminui a taxa de anticorpos maternos e que, no entanto, cães até os dois anos podem ser afetados em função da não vacinação, falhas imunológicas ou ausência de contato com o vírus. Estes autores ainda relatam que cães a partir dos 7-9 anos também podem desenvolver a doença.

Apesar da mioclonia ser o sinal clínico mais frequente nos animais com cinomose, ela não é uma manifestação clínica específica da cinomose, podendo estar presente em enfermidades causadas por outros paramixovírus, como a parainfluenza canina (Greene e Vandeveld, 2012). Caninos com doença renal crônica e uremia também podem apresentar manifestações neurológicas e entre elas a mioclonia (Polzin et al, 1992). Além disto, os cães com cinomose e EC também apresentaram mioclonia.

Nenhum sinal clínico pode ser considerado patognomônico da cinomose, porém a ocorrência simultânea de distúrbios neurológicos multifocais acompanhados de febre, transtornos respiratórios, diarréia, corrimento ocular, hiperqueratose, mioclonias, linfopenia, coriorretinite e história de não vacinação são indicativos de cinomose (Farrow e Love 1983).

Neste estudo corpúsculos de Lentz não foram observados nos cães soropositivos para cinomose. Inclusões são raras em esfregaços sanguíneos de cães com cinomose (Jain 1993). Silva et al. (2005) relataram que somente 21% dos cães com cinomose apresentaram

corpúsculo de Lentz e Schweigert et al. (2008) verificaram 38,8 %. Um cão macho, 2 anos de idade, SRD, soronegativo para erliquiose, apresentou mórula no monócito.

O diagnóstico de cinomose baseado somente na presença de inclusões deve ser avaliado com precaução, pois as inclusões são inespecíficas. A presença de inclusões de Lentz deve ser associada aos sinais clínicos sugestivos da afecção para estabelecimento do diagnóstico. Granulações azurófilas em linfócitos e fagocitose nuclear podem confundir com a inclusão celular pela *Ehrlichia* sp (Greene e Vandevelde, 2012).

Do mesmo modo, nenhum dos cinco cães com cinomose e EC apresentou mórulas no esfregaço sanguíneo. Guedes et al (2015) encontraram mórulas em esfregaço sanguíneo de 12,4% dos cães com EC. Entretanto, Espindola et al. (2015) relataram que a frequência de mórulas em cães com EC é menor que 1%. Estas podem ser confundidas com inclusões decorrentes de infecções bacterianas severas do corpúsculo de Duhle, vírus (inclusive o da cinomose) ou doenças autoimunes (Sonne et al. 2009).

Anemia normocítica normocrômica e leucocitose com neutrofilia foram os principais achados hematológicos nos cães com cinomose. Outros autores também observaram estas alterações, como Almeida et al. (2009) que observaram discreta à moderada anemia normocítica normocrômica, linfopenia e desvio dos neutrófilos para a esquerda.

A anemia é um achado frequente no hemograma de cães com cinomose (Silva et al. 2005, Greene e Vandevelde 2012, Vicente et al 2010, Santos et al 2012). Segundo Tvedten e Weiss (2000), as anemias discretas geralmente são arregenerativas, podendo ser resultantes de doença inflamatória. Na doença inflamatória, a liberação de interleucina-1 pelos macrófagos torna o ferro pouco disponível para a produção de hemácias, além de ocorrer diminuição da sobrevida dos eritrócitos com aumento da sua destruição pelos macrófagos. Há ainda diminuição da resposta à anemia devido à baixa produção de eritropoetina, diminuição da resposta da medula óssea à eritropoetina e falta de ferro, levando à limitação da eritropoiese (Waner e Harrus 2000).

A leucocitose com neutrofilia também foi relatada por Tudury et al. (1997) em cães com cinomose e apresentando sintomatologia nervosa. No presente estudo, a predominância da leucocitose está relacionada ao fato dos animais selecionados já estarem em fase terminal e com infecção bacteriana secundária. A leucopenia ocorre no início da infecção (4 a 6 dias), sendo que o cão com cinomose desenvolve linfopenia, monocitose e leve neutrofilia com a doença instalada (Greene e Vandevelde 2012). Já a leucocitose pode ocorrer devido à infecção bacteriana secundária (Jain, 1993).

Desvio nuclear neutrofilico para a esquerda regenerativo também foi relatado por Almeida et al. (2009), com 88,9% apresentando aumento da contagem de bastonetes, que segundo Stockham e Scott (2002) pode caracterizar resposta neutrofílica à inflamação.

Vários autores citam a linfopenia como achado hematológico relevante na cinomose (Tudury et al. 1997, Silva et al. 2005, Negrão et al 2007, Vicente et al 2010, Santos et al 2012) em virtude do vírus da cinomose provocar atrofia do tecido linfóide na fase inicial da doença (Jain 1993). Neste estudo 23,52% dos cães apresentaram linfopenia e a maioria dos animais apresentou numero de linfócitos dentro da normalidade. Este fato pode estar associado ao fato de cães estarem em estágios diferentes da doença e à reação do sistema imune na tentativa de estabelecer a cura.

A maioria dos cães com cinomose apresentaram plaquetotomia. Resultados relatados por Silva et al (2005) e Vicente et al (2010) também demonstraram este achado, com percentuais de 69% e 36,7% respectivamente.

A intercorrência da cinomose e EC ocorreu em 29,41% dos cães e principalmente em animais jovens. A cinomose canina pode ocorrer concomitante com a erliquiose, considerando-se que o vírus da cinomose é um agente imunossupressor, predispondo o cão enfermo a infecções secundárias (Almeida et al. 2009, Miranda et al 2011, Vicente et al. 2011, Santos et al. 2012, Girardi et al. 2014).

Casos de ocorrência concomitante de erlichiose e cinomose já foram descritos na literatura. Miranda et al. (2011) relataram caso de um cão sem alterações neurológicas que teve diagnóstico confirmado de erlichiose, cinomose e babesiose. A ocorrência de cinomose, erlichiose e toxoplasmose também foi relatada por Girardi et al. (2014) e estes autores sugeriram que a imunossupressão causada pelo vírus da cinomose resulte na re-ativação de uma infecção latente, pelo rompimento de cistos dormentes de *Toxoplasma gondii*.

Cães com cinomose e EC apresentaram anemia normocítica hipocromica. A EC e cinomose evoluem com um quadro de anemia normocítica normocromica, plaquetotomia, leucopenia, linfopenia e monocitose (Negrão et al. 2007).

A plaquetotomia foi observada em três (60%) cães, valor abaixo do relatado por Mendonça et al (2005) em cães com erlichiose. Skotarczak (2003) afirmou que a plaquetotomia na erliquiose é de amplitude moderada, contudo, a plaquetotomia pode estar presente na cinomose e erliquiose isoladamente.

A plaquetotomia está frequentemente associada à infecção pelo *Anaplasma platys* e ocorre também na infecção pelo vírus da cinomose e pela *Erlchia canis* (Negrão et al. 2007).

A plaquetotomia não pode ser utilizada como critério para diagnóstico de erlichiose, considerando que infecções causadas por outros parasitas podem provocá-la.

Apesar de Thrall et al (2012) citar a neutropenia como achado importante na cinomose, tanto os animais com cinomose quanto aqueles que apresentaram as duas enfermidades conjuntamente, não apresentaram neutropenia.

Do ponto de vista hematológico, plaquetotomia e anemia são achados comuns na EC. As diferentes fases da EC, bem como a resposta imune individual e co-infecções podem influenciar o resultado de exames hematológicos (Mendonça et al. 2005).

Quanto à imunização, somente 5 (22,7%) cães possuíam histórico de vacinação completa. Tudury et al. (1997) relataram que apenas 18,52% dos cães com manifestação neurológica da cinomose foram submetidos a um correto programa de vacinação.

Neste estudo, apesar da vacinação completa, cinco animais adoeceram. Fatores como a qualidade da vacina, a sua manutenção inadequada, o estado imune do cão e cepas variantes, podem comprometer o estado imunológico do cão tornando-o suscetível à doença (Martella et al. 2011, Fischer et al. 2016) e cães vacinados corretamente podem adquirir a doença. Outro fator a ser considerado é a ocorrência de mutação do vírus (Budaszewski et al. 2014), tornando a vacina inócuia.

Cães não vacinados ou com vacinação incompleta são passíveis de contraírem o vírus da cinomose (Fischer et al. 2016) sendo que os cães jovens, desprovidos de vacinas são mais suscetíveis quando comparados aos adultos e idosos (Budaszewski et al. 2014).

Conclui-se que mioclonia é o achado clínico mais frequente na cinomose. A plaquetopenia foi um achado hematológico importante, tanto nos cães com cinomose quanto nos cães com cinomose e erlichiose. A cinomose canina pode ocorrer concomitantemente com a erlichiose, considerando que a *Erlichia* sp também é imunossupressora. Apesar dos agentes etiológicos serem de taxonomias diferentes, as enfermidades apresentam relativa similaridade entre si, tanto no aspecto clínico quanto hematológico, dificultando o diagnóstico clínico diferencial.

Referências

- Almeida RK, Vasconcelos AC, Carneiro RA, Paes PRO, Moro L 2009: Cytological alterations of the bone marrow and peripheral blood of dogs with canine distemper. Arq Bras Med Vet Zootec **61**: 1255-1260
- Almosny NRP, Massard CL 2002: Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonoses. In: Almosny NRP (Ed.): Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. LF Livros de Veterinária, Rio de Janeiro, pp. 13-56

- Appel MJ, Carmichael LE 1979: Systemic viral diseases. In: Catcott EJ (Ed.): Canine Medicine. American Veterinary Publications, Santa Barbara, pp. 17-48
- Budaszewski RDAF, Pinto LD, Weber MN, Caldart ET, Alves CD, Martella V, Ikuta N, Lunge VR, Canal CW 2014: Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Res* **13**: 76-83
- Correa WM, Correa CM 1992: Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. MEDSI, Rio de Janeiro, 843p.
- Espindola PP, Bellinia ML, Vicente PUC 2015: Correlation between thrombocytopenia and canine *Ehrlichia canis* during laboratory routine in a Veterinary Clinic. *Cienc Biol Agrar Saude* **19**: 163-169
- Farrow BRH, Love DN 1983: Bacterial, viral and other infectious problems. In: Ettinger SJ (Ed.): Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat. Saunders, Philadelphia, pp. 269-319
- Fighera RA, Souza MS, Silva MC, Brum JS, Graça DL, Kommers GD, Irigoyen LF, Barros CSL 2008: Causas de morte e razões para eutanásia de cães. [Portuguese] *Pesq. Vet. Brasileira* **28**: 223-230
- Fischer CDB, Graf T, Ikuta N, Lehmann FKM, Passos DT, Makiejczuk A, Silveira Jr MAT, Fonseca ASK, Canal CW, Lunge VR 2016: Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clad 1 reveals unique molecular signature of the local epidemic infection. *Gen Evol* **41**: 135-141
- Gamiz C, Martela V, Ullor R, Fajardo R, Hernandez QI, Martinez S 2011: Identification of a new genotype of canine distemper disease circulating in America. *Vet Res Comm* **35**: 381-390
- Girardi AF, Lima SR, Melo ALT, Sorte ECB, Almeida ABPF, Mendonça AJ, Aguiar DM, Sousa VRF 2014: Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and *Ehrlichia canis* antibodies in dogs with nervous alterations assisted at a veterinary teaching hospital. *Semina: Ciênc Agr* **35**: 1913-1922
- Greene CE, Vandervelde M 2012: Canine distemper. In: Greene CE (Ed.): Infectious Diseases of the Dog and Cat. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, pp. 25-42
- Guedes PEB, Oliveira TNA, Carvalho FS, Carlos RSAC, Albuquerque GR, Munhoz AD, Venceslau AA, Silva FL 2015: Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. *J Paras* **24**: 115-121
- Headley AS, Graça DL 2000: Canine distemper: Epidemiological findings of 250 cases. *Braz J Vet Res Anim Sci* **37**: 83-86
- Jain NC 1993: Essentials of veterinary hematology. Lea & Febiger, Philadelphia, 417p
- Krakowka S, Higgins RJ, Koestner A 1980: Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res* **41**: 284-292
- Martela, V. Elias, G. Buonovoglia, C. 2008: Canine distemper pervirus. *Vet. Clin. Small Anim.* **38**: 787-797.
- Matos MS, Matos PF 1988: Laboratório clínico médico veterinário. Atheneu, São Paulo, 238p
- Mendonça CS, Mundim AV, Costa AS, Moro TV 2005: Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Biosc J* **21**: 167-174
- Miranda FJB, Albernaz AP, Viestel MAD, Melo Jr OA, Machado JA, Alves RBM, Carvalho CB 2011: Simultaneously infection with *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and canine distemper virus – Case Report. *J Bras Ciênc An* **3**: 238 – 246
- Negrao FJ, Alfieri AA, Alfieri AF 2007: Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. [Portuguese] *Arq Bras Med Vet Zootec* **59**: 253-257
- Polzin DJ, Osborne CA, O'Brien T 1992: Moléstias do cão e gato. In: Ettinger SJ (Ed.): Tratado de medicina interna. Manole, São Paulo, pp.2068-2095

- Quim PJ, Markey BK, Carter ME Donnelly WJ, Leonard FC 2005: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Artmed, São Paulo, p.
- Rizzi TE, Meinkoth JH, Clinkenbeard KD 2010: Normal hematology of the dog. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (Ed.): Schalm's veterinary hematology. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 799- 810
- Santos JP, Borges CEF, Locce CC, Junior AF, Bittar ER, Ayres DR, Bittar JFF 2012: Estudo retrospectivo de cães positivos para cinomose em ensaio imuno-cromatográfico atendidos no hospital veterinário de Uberaba. [Portuguese] Vet Not **18**: 31-36
- Schweigert A, Cavalheri VM, Fernandes RR, Gebara CMS 2008: Frequência de corpúsculos de inclusão de Lentz em células sanguíneas e oculares de Cães suspeitos de cinomose atendidos no Hospital Veterinário da faculdade integrado de Campo Mourão-PR. [Portuguese]. Campo Dig **2**: 90-92
- Silva FMP, Teixeira MN, Lopes RS, Araujo Junior JP 2009: Ehrlíquioses. Vet Zootec **16**: 290-302
- Silva ING, Guedes MIF, Rocha MFG, Medeiros CMO, Oliveira LC, Moreira OC, Teixiera MFS 2005: Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. [Portuguese]. Arq Bras Med Vet Zootec **57**: 136-139
- Skotarczak B 2003: Canine erlichiosis. Ann Agric Environ Med **10**: 137-141
- Sonne L, Oliveira EC, Pescador CA, Santos AS, Pavarini SP, Carissimi AS, Driemeier D 2009: Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose. [Portuguese] Pes Vet Bras **29**: 143-149
- Stockham SL, Scott MA 2002: Fundamentals of veterinary clinical pathology. Blackwell, Iowa, 610p.
- Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell T 2012: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Iowa State University Press, Arnes, 776p.
- Tudury EA, Arias MVB, Bracarense APFL, Megid J, Junior RFD 1997: Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. [Portuguese]. Cien Rural **27**: 229-235
- Tvedten H, Weiss D 2000: Classification and laboratory evaluation of anemia. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (Ed.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1344p.
- Vicente AF, Abreu APM, Passos AAMS 2010: Perfil Hematológico em Cães Infectados Naturalmente por Cinomose com Presença de Corpúsculo de Sinegaglia Lentz, em Vassouras – RJ. [Portuguese] Rev Saúde **1**: 49-54
- Waner T, Harrus S 2000: Anemia of inflammatory disease. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC (Ed.): Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1344p.

Tabela 1. Frequência de sinais clínicos em 22 cães com cinomose e em cinco cães com cinomose e erlichiose, concomitantemente, Uberlândia, 2017.

SINAL CLÍNICO	ANIMAIS COM CINOMOSE (N=17)	ANIMAIS COM CINOMOSE E ERLICHIOSE (N=5)
Desidratação	11 (69,7%)	-
Mioclonia	17 (100%)	5 (100%)
Paresia flácida	10 (58,82%)	-
Ataxia	2 (11,76%)	-
Convulsão	3 (17,69%)	1 (20%)
Hiperqueratose nasal	2 (11,76%)	-
Hiperqueratose de	2 (11,76%)	-
Pústulas abdominais	3 (17,69%)	1 (20%)
Palidez de mucosas	9 (52,94%)	2 (40%)
Icterícia	3 (17,69%)	-
Conjuntivite purulenta	12 (70,58%)	4 (80%)
Secreção nasal	8 (47,5%)	-
Diarréia	4 (23,53%)	-
Epistaxe	1 (5,8%)	-
Arritmia cardíaca	2 (11,76%)	-

N= Número de Cães

Tabela 2. Frequência dos achados no eritrograma e plaquetograma de 17 cães soropositivos para cinomose e cinco cães soropositivos para cinomose e erliquiose.

Parâmetros		Cinomose	Cinomose e erliquiose
		(N=17)	(N=5)
Hemácias	normal	07 (41,18%)	01 (20,00%)
	aumentado	00 (00,00%)	00 (00,00%)
	diminuído	10 (52,82%)	04 (80,00%)
Hemoglobina	normal	07 (41,18%)	01 (20,00%)
	aumentado	00 (00,00%)	00 (00,00%)
	diminuído	10 (58,82%)	04 (80,00%)
Volume globular	normal	07 (41,18%)	01 (20,00%)
	aumentado	00 (00,00%)	00 (00,00%)
	diminuído	10 (58,82%)	04 (80,00%)
VCM	normal	15 (82,24%)	03 (60,00%)
	aumentado	02 (11,76%)	00 (00,00%)
	diminuído	00 (00,00%)	02 (40,00%)
CHCM	normal	14 (82,35%)	02 (40,00%)
	aumentado	00 (00,00%)	00 (00,00%)
	diminuído	03 (17,65%)	03 (60,00%)
Plaquetas	normal	06 (35,29%)	02 (40,00%)
	aumentado	03 (17,65%)	00 (00,00%)
	diminuido	08 (47,06%)	03 (60,00%)

Tabela 3. Frequência dos achados no leucograma de 17 cães soropositivos para cinomose e cinco cães soropositivos para cinomose e erliquiose.

Parâmetros		Cinomose (N=17)	Cinomose e erliquiose (N=5)
Leucócitos totais	normal	08 (47,06%)	02 (40,00%)
	aumentado	08 (47,06%)	02 (40,00%)
	diminuído	01 (5,88%)	01 (20,00%)
Neutrófilos em bastão	normal	07 (41,18%)	02 (40,00%)
	aumentado	10 (58,82%)	03 (60,00%)
	diminuído	00 (00,00%)	00 (00,00%)
Neutrófilos totais	normal	05 (29,41%)	04 (80,00%)
	aumentado	12 (70,59%)	01 (20,00%)
	diminuído	00 (00,00%)	00 (00,00%)
Eosinófilos	normal	06 (35,29%)	04 (80,00%)
	aumentado	01 (5,88%)	00 (00,00%)
	diminuído	10 (58,83%)	01 (20,00%)
Basófilos	normal	16 (94,12%)	05 (100,00%)
	aumentado	01 (5,88%)	00 (00,00%)
	diminuído	00 (00,00%)	00 (00,00%)
Monócitos	normal	06 (35,29%)	02 (40,00%)
	aumentado	03 (17,65%)	00 (00,00%)
	diminuído	08 (47,06%)	03 (60,00%)
Linfócitos	normal	12 (70,59%)	01 (20,00%)
	aumentado	01 (5,88%)	01 (20,00%)
	diminuído	04 (23,53%)	03 (60,00%)

CAPÍTULO 3 - Artigo a ser submetido no periódico Bioscience Journal

ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA CINOMOSE E DETECÇÃO DO VÍRUS EM NÓ SINOATRIAL

RESUMO

A cinomose canina é uma doença viral que afeta vários sistemas, dentre eles o cardiovascular. Objetivou-se identificar o vírus da cinomose canina no nó sinoatrial (NSA) de cães sorologicamente positivos para cinomose, através da reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), além de analisar os achados macroscópicos e histológicos da cinomose no coração e outros tecidos. Foram coletados fragmentos de tecidos e do NSA de 17 cães sorologicamente positivos para cinomose que vieram a óbito e foram necropsiados no período de outubro de 2015 a dezembro de 2016. No coração observou-se dilatação cardíaca direita em 13 cães (76,47%) e hipertrofia concêntrica esquerda em dois cães (11,76%). Microscopicamente observou-se miocardite linfocítica em quatro (23,53%) cães e 41,18% (7/17) apresentou corpúsculos de inclusão viral no epitélio vesical. Somente um (5,88%) cão apresentou fragmento alvo de 319 bp para cinomose utilizando os primers VCC1 e VCC2, no nó sinoatrial. Conclui-se que o VCC pode localizar-se no nó sinoatrial de cães naturalmente infectados, como demonstrado neste estudo pela técnica de RT-PCR, reforçando a hipótese de que o VCC é capaz de provocar lesões inflamatórias no nó sinoatrial dessa espécie. Alterações cardíacas macroscópicas e microscópicas, principalmente dilatação cardíaca e miocardite, são frequentemente observadas em cães com cinomose. Inclusões virais nas células epiteliais da bexiga são importante achado microscópico para diagnóstico da cinomose.

Palavras-chave: Nô-sinoatrial. Canina. Cinomose. Cardiopatias.

ABSTRACT

Canine distemper is a viral disease that affects several systems, including the cardiovascular system. The objective of this study was to identify canine distemper virus (CDV) in the sinoatrial node (SAN) of dogs serologically positive for distemper, through polymerase chain reaction, preceded by reverse transcription (RT-PCR), and to analyze the macroscopic and histological findings of distemper in the heart and other tissues. SAN and tissue fragments were collected from 17 serologically positive dogs that died and were necropsied from October 2015 to December 2016. In the heart, right heart dilatation was observed in 13 dogs (76.47%) and left concentric hypertrophy in two dogs (11.76%). Microscopically,

lymphocytic myocarditis was observed in four (23.53%) dogs and 41.18% (7/17) presented viral inclusion corpuscles of CDV in the bladder epithelium. Only one (5.88%) dog presented a 319 bp target fragment for distemper virus using primers CDV 1 and CDV 2 at the sinoatrial node. In conclusion, CDV can be located in the sinoatrial node of naturally infected dogs, as demonstrated in this study by the RT-PCR technique, reinforcing the hypothesis that CDV is capable of causing inflammatory lesions in the sinoatrial node of this species. Macroscopic and microscopic cardiac changes, mainly cardiac dilatation and myocarditis, are frequently observed in dogs with distemper. Viral inclusions of CDV in bladder epithelial cells are an important microscopic finding for the diagnosis of distemper.

Keywords: Sinoatrial node. Canina. Distemper. Cardiomyopathy.

1. Introdução

O nó sinoatrial (NSA) é o responsável pelo início do ritmo cardíaco e essencial para a fisiologia normal do coração (JOUNG et al., 2011). Juntamente com o nó atrioventricular, os ramos do feixe de His e as fibras de Purkinge são denominados sistema especializado de condução do coração (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

A disfunção do NSA tem etiologias multifatoriais. Manfred et al. (2008) e Andrade et al. (1988) citaram que o NSA também apresenta um adensamento do seu estroma com o avançar da idade e que a disfunção do nó sinoatrial pode ser considerada um fenômeno do envelhecimento.

São escassas as publicações sobre microrganismos que lesam o NSA de canino. A possibilidade do vírus da cinomose canina (VCC) causar lesão especificamente neste local, como aventado por Mendonça e Coelho (2006), despertou o interesse em se verificar a presença do vírus nesta estrutura cardíaca. Também Nelson e Couto (2015) relataram que viroses cardiotrópicas desempenham importante papel na patogenia da miocardite em várias espécies.

O vírus da cinomose canina é o maior patógeno de cães e carnívoros silvestres e a sua infecção é relevante em todos os continentes e está associada com alta mortalidade e morbidade. No cão, desenvolve manifestações respiratórias, gastrointestinais, dermatológicas, oftálmicas, neurológicas e pode causar miocardite [7].

Higgins et al. [8] inocularam cepa virulenta do VCC em cães e 36% apresentaram lesões cardíacas. Já Resende et al. 2009 [9] analisaram miocárdio do ventrículo esquerdo de cães soropositivos para cinomose e verificaram miocardite em 42,8% dos animais.

Araújo, 2017 [10] avaliou a influência do vírus da cinomose sob o sistema cardiovascular e verificou que há atuação do vírus no sistema excitatório e condutor especializado do coração. Mendonça e Coelho, 2006 [5] estudaram lesões no NSA de cães sorologicamente positivos para cinomose e observaram dilatação cardíaca em 97,14% dos animais, além de alterações inflamatórias e degenerativas. Bastos et al. 2007 [11] também verificaram lesões microscópicas degenerativas, vasculares e inflamatórias no NSA em corações dilatados de cães com suspeita clínica de cinomose.

O VCC pertence ao gênero Morbillivirus da família Paramixoviridae [12] e é um vírus RNA fita simples de polaridade negativa. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para diagnóstico da cinomose e as principais vantagens dessa técnica, precedida por uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR) para os vírus RNA, incluem a rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da infecciosidade da partícula viral e os altos níveis de sensibilidade e especificidade. Frisk et al. 1999 [13]. Gebara et al. 2004 [14].

Assim, objetivou-se identificar o VCC no NSA de cães sorologicamente positivos para cinomose, através do exame da RT-PCR, além de analisar os achados macroscópicos e histológicos da cinomose no coração e outros tecidos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e local do estudo

Foram selecionados casos de cães necropsiados no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (HV – FMV – UFU), no período de outubro de 2015 a dezembro de 2016. Os animais haviam recebido o diagnóstico clínico e sorológico de cinomose, porém não responderam à terapêutica convencional para a doença e vieram a óbito natural.

O diagnóstico clínico foi realizado com base nos sinais: anorexia, hipertemia, conjuntivite, neurite óptica, uveíte, coriorretinite, queratoconjuntivite seca, inflamação do trato respiratório alto com descarga nasal mucourulenta, pneumonia, gastroenterite hemorrágica ou não, rigidez cervical, convulsões, mioclonia, ataxia de origem cerebelar ou vestibular, paresia, tetraparesia, pústulas vesiculares, hiperqueratose nasal e/ou dos coxins

plantares, linfocitopenia, trombocitopenia e anemia Deem et al. 2000[15]; Greene et al. 1990 [16]. O diagnóstico sorológico da cinomose foi realizado utilizando-se teste de imunoensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos (IgG e IgM) para cinomose (Alere Cinomose AgTest®).

Com relação à idade, os animais foram divididos em três grupos: jovens (até um ano de idade); adultos (de um à nove anos de idade) e idosos (dez anos de idade ou mais), segundo Fighera et al. 2008 [17]. Dados como raça, idade, sexo e lesões macroscópicas observadas durante a necropsia foram registrados.

A necropsia foi realizada em até 30 minutos após o óbito e na impossibilidade da realização o corpo era mantido sob refrigeração em câmara fria por um período máximo de três horas. No início do procedimento necroscópico, incidiu-se as articulações costochondrais e a cavidade torácica foi exposta. Procedeu-se à retirada do coração e, utilizando-se material estéril, coletou-se fragmento de 2 cm da porção inicial da veia cava cranial caudal, próximo a região do sulco terminal, onde está localizado o NSA. O fragmento contendo o NSA foi imediatamente acondicionado em criotubo estéril e mantido em recipiente contendo gelo picado até o armazenamento em ultrafreezer -80°C.

A técnica de necropsia foi realizada seguindo-se a sequência de inspeção de órgãos da ficha de necropsia do Laboratório de Patologia Animal (HV – FMV – UFU). Foram coletados fragmentos de miocárdio, pulmão, pâncreas, fígado, bexiga (para pesquisa de corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose), rim e de outros tecidos que apresentavam alterações macroscópicas. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado 10% por 48 horas e rotineiramente processados para confecção de lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Tolosa et al. 2003[18].

2.2 Detecção do vírus da cinomose pela RT-PCR

Os fragmentos contendo o nó sinoatrial mantidos em ultrafreezer -80°C foram utilizados para extração de RNA viral utilizando o reagente Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante, no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia.

A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada de 2 µg de RNA total. Inicialmente foi adicionado 25pmol do primer reverso CDV cepa Onderstepoort VCC02 (5'-GATTGCTTAGGACCAGTAGC-3') a 2 µg de RNA e foi feita desnaturação a 70°C por 10 minutos. Logo após foi adicionada a transcriptase reversa Impron II (Promega, Madison, WI,

USA), 2 μ l; 250 μ M de dNTP mix, 8 μ l de tampão da RT, cloreto de magnésio 3mM, 2 μ l de Dithiothreitol (DTT) a 20mM e água livre de RNase para completar o volume final de 40 μ l. A reação foi incubada a 42° C por 1 hora, depois foi resfriada a 4°C e mantida a -80°C até o uso.

O cDNA do nucleocapsídeo do vírus da cinomose canina e o gene constitutivo de cão (b-actina) foram amplificados em amostra de papa de leucócitos de cão clinicamente doente e também o vírus RNA da vacina contra cinomose que foram utilizados como controle positivo da reação. Primers específicos que amplificavam o gene do nucleocapsídeo foram utilizados, conforme Del Puerto et al. [19]: VCC01, forward, (5'-CAGCACCGTACATGGTTATC-3') e VCC02 reverso (5'-GATTGCTTAGGACCAGTAGC-3') que amplifica um fragmento de 319pb; e primers específicos para μ -acinta: F (5'-CACCTTCTACAACGAGCTGCG-3') e R (5'-ATCTTCTCACGGTTGGCCTTG-3') que amplifica um fragmento de 93pb. Foi utilizado 5 μ l do cDNA de cada amostra; 25 pmol de cada primer; 250 μ M de dNTP mix (Promega, Madison, WI, USA); 2 mM MgCl₂; 1,25 U GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, USA) ou 0,25 μ l; tampão da Taq (10 μ l) e água ultra pura para completar o volume final de 50 μ L. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 93°C por 2 minutos, 1 ciclo e a seguir 40 ciclos de desnaturação a 93° C por 1 minuto, anelamento a 56° C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. Extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram separados por um sistema de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia LCH, São Paulo, SP, BR) em gel de agarose 1,5% e visualizados com SYBR SAFE DNA GEL STAIN (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

3. Resultados

3.1 Dados Gerais

3.1.1 Materiais e Métodos

Foram utilizados 17 cães sorologicamente positivos e com sintomatologia clínica compatível com cinomose. Quatro eram machos e 13 fêmeas, com relação à raça 15 eram cães sem raça definida (SRD), um Poodle e um Cocker. Quanto à idade sete (41,18%) eram jovens, três (17,64%) adultos e sete (41,18%) eram idosos.

3.2 Alterações Cardíacas

Com relação ao aspecto macroscópico do coração, as alterações evidenciadas foram: dilatação cardíaca direita em 13 cães (76,47%) (Figura 1) e hipertrofia concêntrica esquerda em dois cães (11,76%). Microscopicamente observou-se miocardite linfocítica em quatro (23,53%) cães (Tabela 1).

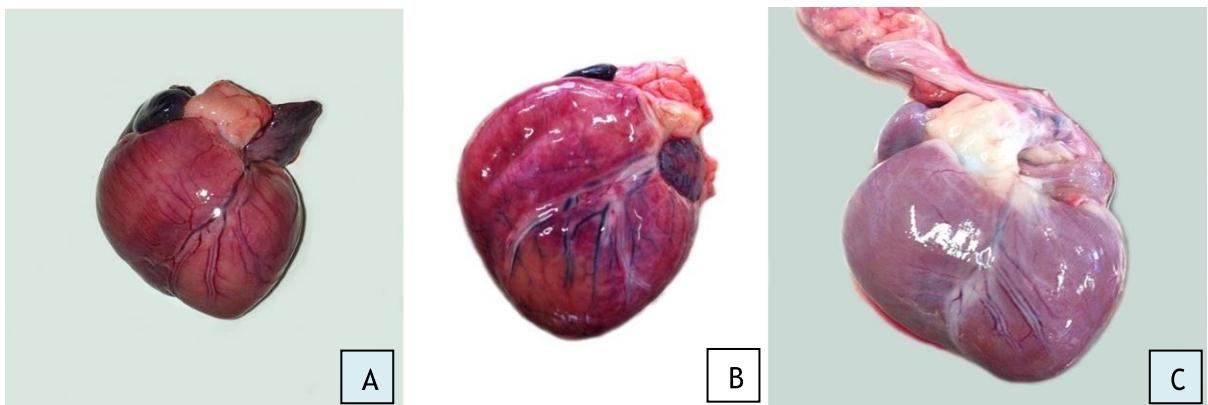


Figura 1. Corações de cães sorologicamente positivos para cinomose. (A) Coração globoso, com diâmetros longitudinal e transversal semelhantes; (B) hipertrofia concêntrica esquerda e vasos sanguíneos congestos; (C) dilatação cardíaca direita.

3.3 Alterações em outros órgãos

Macroscopicamente, esplenomegalia foi observada em 6/17 (35,29%) e hepatomegalia estava presente em 3/17 (17,64%) dos cães soropositivos para cinomose.

Microscopicamente, nefrite intersticial foi observada em 12/17 (70,58%) dos cães e em 41,18% (7/17) havia corpúsculos de inclusão viral no epitélio vesical (Figura 2). No sistema digestório as principais alterações foram lipidose hepática e enterite (8/17 - 47,05% dos cães) e em 5,88% (1/17) dos cães havia corpúsculos de inclusão viral nos hepatócitos. Pneumonia foi observada em nove cães (52,94%). No baço, atrofia linfoide foi observada cinco cães (29,41%) (Tabela 1).

Tabela 1. Achados microscópicos de 17 cães soropositivos para cinomose, Uberlândia, 2017.

ACHADOS MICROSCÓPICOS	N. ABSOLUTO (%)
<i>Sistema cardiovascular</i>	
Miocardite focal linfocítica	4 (23,52%)
<i>Sistema urinário</i>	
Nefrite interticial linfoplasmocitária	12 (70,58%)
Inclusão intranuclear epitélio vesical	7 (41,17%)
Cistite linfocitária	2 (11,76%)
<i>Sistema digestório</i>	
Lipidose Hepática	8 (47,05%)
Enterite	8 (47,05%)
Hepatite linfoplasmocitária	7 (41,16%)
Pancreatite linfoplasmocitária	3 (17,64%)
Necrose hepática	1 (5,88%)
Inclusão intranuclear em hepatócitos	1 (5,88%)
Hemorragia capsular do pâncreas	1 (5,88%)
<i>Sistema respiratório</i>	
Pneumonia linfoplasmocitária	7 (41,16%)
Pneumonia purulenta	2 (11,76%)
<i>Sistema hematocitopoietico</i>	
Atrofia linfóide baço	5 (29,4%)
Hemossiderose baço	2 (11,76%)

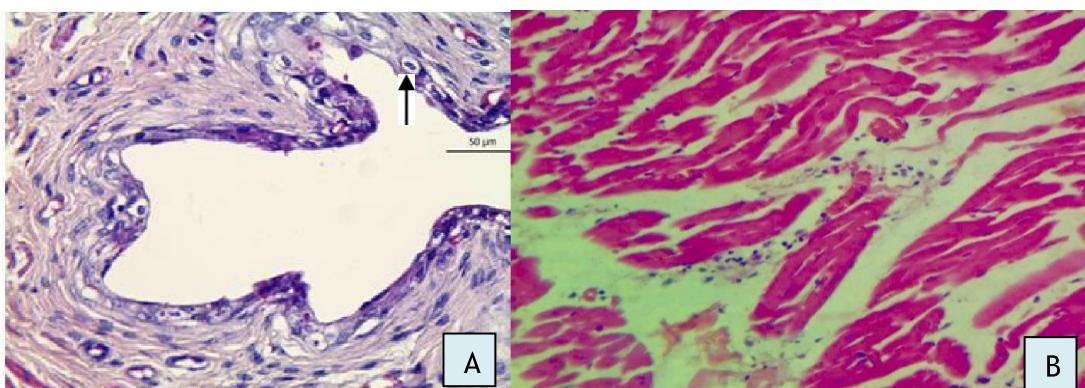


Figura 2. (A) Corpúsculos de inclusão intranucleares (seta preta) do vírus da cinomose em epitélio de bexiga de cão naturalmente infectado. (B) Miocardite em cão naturalmente infectado pelo vírus da cinomose.

3.4 RT-PCR

Dos 17 cães soropositivos para cinomose, um (5,88%) apresentou fragmento alvo de 319 bp para cinomose utilizando os primers VCC1 e VCC2, no nó sinoatrial através da técnica RT-PCR (Figura 3).

Este animal era uma cadela de quatro meses de idade, SRD e com esquema vacinal incompleto. Clinicamente apresentou mioclonia, pústula abdominal, paraqueratose nos

cochins plantares e plano nasal. À necropsia apresentou dilatação cardíaca direita, pancreatite histioplasmocitária, pneumonia linfoplasmocitária, atrofia linfoide no baço e plaquetopenia (12.000 plaquetas). μL de sangue.

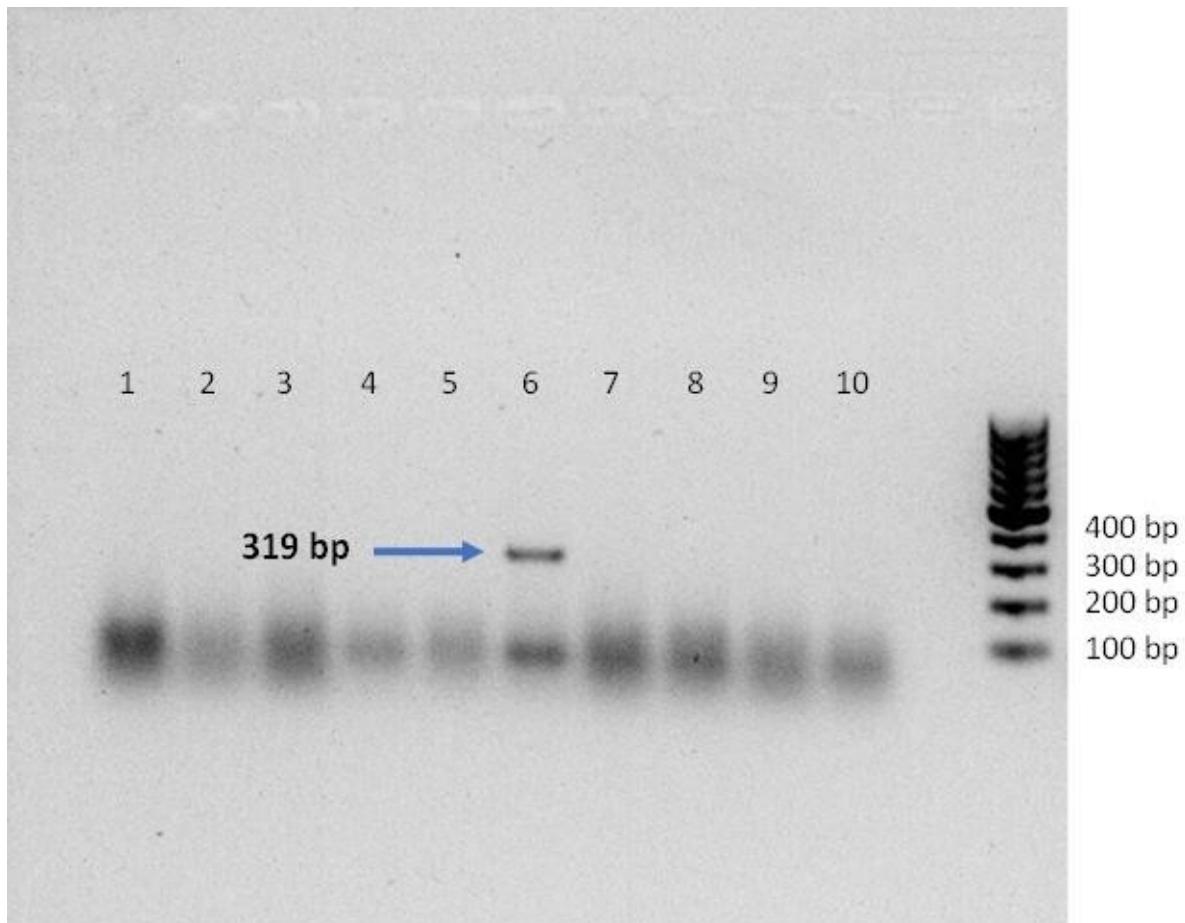


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de produtos de RT-PCR utilizando primers específicos para a proteína do nucleocapsídeo do vírus da cinomose (319pb). Colunas 1 a 10 amostras de fragmento de nó sinoatrial. PM: padrão de peso molecular. Os produtos foram visualizados com SYBR SAFE DNA GEL STAIN. Das 10 primeiras amostras testadas, uma delas (Amostra 6 - código 96708) apresentou fragmento alvo de 319 bp para cinomose utilizando os primers VCC1 e VCC2.

4. Discussão

No presente estudo a maioria dos cães com cinomose eram adultos ou idosos. Silva et al. 2009 [19] e Santos et al. 2012 [20] relataram que a cinomose é mais frequente em cães com mais de um ano de idade, assim como observado em nossos achados. Porém a doença pode atingir cães de idades variadas, como relatado por Correia e Correia. 1992 [21] ao afirmarem ser a incidência da cinomose maior entre 60 e 90 dias de idade. Porém, estes mesmos autores relataram que a doença pode se desenvolver em animais a partir de 7 a 9

anos, idade observada no presente estudo. Já a letalidade é maior em cães jovens. Correia e Correia. 1992 [21], principalmente quando o vírus atua no sistema nervoso central.

Embora a doença tenha sido observada mais freqüentemente em fêmeas (76,47%) e em cães sem raça definida (88,23%), nenhuma predisposição sexual ou racial é comprovada na cinomose canina. Headley e Graça. 2000 [23] e Greene. 2012 [24].

No presente estudo 76,47% dos cães apresentaram dilatação cardíaca. Vários são os agentes capazes de provocar a dilatação cardíaca. Januz et al. 2014 [25] acompanharam cães cardiopatas e observaram 63,63% com dilatação cardíaca, identificando a presença da *Borrelia burgdorferi* 54,54% cães. Estes autores citaram ainda a cinomose e a erliquiose como possíveis agentes responsáveis pela miocardite e a dilatação cardíaca.

O vírus da cinomose é pantrópico e pode afetar a musculatura cardíaca e a sua associação com lesões cardíacas já foi citada por Mendonça e Coelho. 2007 [5] e Resende et al. 2009 [9]. Mendonça e Coelho. 2007 [5] avaliaram cães soropositivos para cinomose e identificaram 97,14% dos corações com dilatação cardíaca e Resende et al. 2009 [7] 88,57%. Higgins et al. 1981 [8] estudaram cães inoculados com o VCC e constataram dilatação cardíaca em somente um cão (9,09%).

A miocardite linfocítica, observada no presente estudo, pode estar associada a presença do vírus no tecido. A resposta imunológica do hospedeiro contribui para instalação do processo inflamatório e consequentemente lesão do miocárdio. Nelson e Couto. 2010 [26], Mendonça e Coelho. 2007 [27].

A miocardite linfocítica é relatada por vários autores. Wooley et al. 2007 [8; 28; 5; 31; 29; 9] como lesão associada ao vírus da cinomose. Resende et al. 2009 [9] estudando cães com cinomose, encontraram 42,8% com miocardite linfocitária, além de degeneração hialina (31,4%), hiperemia (14,3%) e hemorragia (11,4%). Porém, Sonne et al. 2009 [28] não observaram alterações microscópicas significativas no coração de cães com cinomose.

Kaneshige et al. 2007 [29] citaram como possíveis viroses associadas à miocardite a cinomose e parvovirose, além de bactérias e protozoários como o *Tripansosoma cruzi*. Scalabrini et al. 1996 [30] estudaram cães infectados com *Tripansosoma cruzi* e observaram miocardite e inflamação no nó sinoatrial. Já Woolley et al. 2007 [31] relataram o vírus da cinomose canina como responsável por miocardite, além de parvovírus, bactérias, *Borrelia burgdorferi* e a leishmaniose.

No presente estudo, não foi possível avaliar microscopicamente a região do nó sinoatrial, uma vez que o mesmo foi colhido para identificação do VCC pela RT-PCR. No entanto, Bastos et al. 2007[11] verificaram lesões microscópicas no nó sinoatrial de cães com

dilatação cardíaca, tais como inflamação linfocitária (45,3%), degeneração hialina (26,2%), degeneração gordurosa (9,5%) e hemorragia (7,1%).

Mendonça e Coelho. 2006 [5] também estudaram lesões no nó sinoatrial de cães sorologicamente positivos para cinomose e observaram infiltração linfocitária em 42,86%; infiltração gordurosa em 28,57%; degeneração hialina em 8,57%; hemorragia em 18,57% e ausência de lesões em 25,7%.

Araújo. 2017 [10] avaliou a influência do vírus da cinomose sob o sistema cardiovascular e verificou que há atuação do vírus no sistema excitatório e condutor especializado do coração. Cães positivos para o vírus da cinomose apresentaram diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e a negatividade de arritmias ao holter.

Vários agentes têm sido incriminados como causadores de lesões no nó sinoatrial, porém não há relatos de identificação do agente nesta estrutura anatômica. No presente estudo foi possível detectar o vírus da cinomose no NSA pela técnica de RT-PCR comprovando que este vírus pode localizar-se no nó sinoatrial de cão. Estudos realizados até o momento citam processo inflamatório nesta estrutura cardíaca, porém sem identificação do o agente etiológico responsável pela inflamação. Da mesma maneira, até o momento há relatos da presença do VCC, detectado por RT-PCR, em vários tipos de amostras biológicas e tecidos, porém não especificamente no nó sinoatrial.

VCC foi detectado em baixos níveis ($2,79 \times 10^4$ cópias de RNA / μL) no coração de cão positivo para cinomose e em níveis elevados em outros tecidos, tais como pele, músculo e mucosa oral, com carga viral variando de $2,10 \times 10^6$ a $4,25 \times 10^8 \mu\text{L}$. Elia et al. 2006 [32].

Estudos anteriores utilizando a técnica de RT-PCR haviam demonstrado RNA do VCC em outros tecidos e fluidos. VCC foi detectado por RT-PCR em 86% de amostras de soro e 88% de amostras de sangue total e líquido cerebroespinal de cães com cinomose confirmados imuno-histoquimicamente. Frisk et al. 1999 [13], Gebara et al. 2004 [14] obtiveram amplificação do gene da nucleoproteína do VCC 47,1% das amostras de urina provenientes de cães com sinais clínicos sugestivos de cinomose.

Na dependência da forma de apresentação clínica e da evolução da cinomose canina, o VCC pode estar presente em uma variedade de amostras biológicas. Nos diferentes estádios da infecção, urina, sangue total, leucócitos, fezes, saliva, secreção respiratória e líquor podem apresentar o vírus em títulos variados Frisk et al. 1999. Elia et al. 2006. Santos et al. 2006 [13, 32, 33]. Negrão et al. 2007 [35] obtiveram a amplificação de um fragmento do VCC, a partir da urina ou de leucócitos de 66,5% dos animais com cinomose e afirmaram que as diferentes formas de apresentação clínica e de evolução da cinomose canina podem dificultar a eleição

de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico etiológico ante mortem.

Entretanto, a RT-PCR apresenta limitações e pode apresentar resultados falso-negativos. Vários fatores podem interferir nos resultados, como seleção da sequência alvo de nucleotídeos a ser amplificada, método de extração do RNA, padronização dos reagentes empregados na técnica, seleção do material biológico a ser utilizado, forma de conservação e tempo de estocagem, uma vez que trata-se de um vírus cujo genoma é constituído por RNA de fita simples, que pode facilmente sofrer degradação. Frisk et al. 1999. Gebara et al. 2004. Kim, et al. 2001 [13,14, 34].

Quanto aos achados microscópicos, no presente estudo inclusões do vírus foram identificadas nas células epiteliais da bexiga em 41,18% dos animais, podendo ser considerado importante achado microscópico para diagnóstico da cinomose.

Kubo et al. 2007 [36] observaram inclusões virais na bexiga de caninos infectados pelo vírus da cinomose em 73,0% dos casos e Sonne et al. 2009 [28] em 27,8% dos cães e estes autores associaram a baixa frequência de inclusões na bexiga à descamação observada no epitélio da mesma, impossibilitando a visualização dos corpúsculos de inclusão.

Com relação a ausência dos corpúsculos em outros órgãos, Sonne et al. 2009 [28] pondera que estes corpúsculos podem ser identificados em outros órgãos ou não, não sendo portanto uma obrigatoriedade. Batista, Moura e Reis. 2000 [37] e Aleman, Christopher e Steiner. 1992 [38] relataram ainda a baixa frequência de corpúsculos de inclusões em cães com cinomose.

O sistema digestório foi o mais afetado nos cães com cinomose neste estudo, em especial fígado e pâncreas. Kaneshige et al. 2007 [29] observaram congestão hepática e necrose dos hepatócitos em cães com cinomose e citaram que o VCC pode provocar injúrias no fígado.

Considerando que o VCC é agente multissistêmico, este pode ser capaz de provocar hepatite [29], observada em 41,16% dos cães neste estudo. A lipideose hepática foi frequente neste estudo e pode ser associada à insuficiência cardíaca. Anderson. 1992 [39], Tams. 2005 [40], uma vez que a maioria dos animais apresentou alteração cardíaca macroscópica ou microscópica. Entretanto, diferente deste estudo, Sonne et al. 2009 [28] não identificaram alterações microscópicas significativas no fígado.

Lesões pancreáticas foram frequentes neste estudo e Tams. 2005 [41] cita que o vírus da cinomose canina pode provocar pancreatite, reforçando os achados deste trabalho. Atrofia linfoide foi observada em 29,4% dos cães, assim como relatado por Kubo et al. 2007 [36].

Deem et al. 2000 [42] citaram pneumonia em cães com cinomose como um dos achados importantes post-mortem e neste estudo 52,92% dos cães apresentou pneumonia. Sonne et al. 2009 [28] verificaram 44,4% dos animais com pneumonia e Kubo et al. 2007 [36] citaram que o principal achado em 100 cães com cinomose foi a pneumonia. Também Tudury et al. 1997[43] relataram 12,34% dos cães com cinomose apresentando broncopneumonia.

Alterações cardíacas macroscópicas e microscópicas, principalmente dilatação cardíaca e miocardite, são frequentemente observadas em cães com cinomose. Inclusões virais nas células epiteliais da bexiga são importante achado microscópico para diagnóstico da cinomose.

Conclui-se que o VCC pode localizar-se no nó sinoatrial de cães naturalmente infectados, como demonstrado neste estudo pela técnica de RT-PCR, reforçando a hipótese de que o VCC é capaz de provocar lesões inflamatórias no nó sinoatrial dessa espécie e desordens na dinâmica cardíaca, comprometendo sua fisiologia normal e levando o cão a óbito.

Estudos investigativos de lesões no nó sinoatrial devem ser continuados não somente nos cães, mas nas outras espécies domésticas e silvestres.

Conflito de interesses

Os autores declaram não existir conflito de interesses.

Referências

- [1] B. Joung, P. Chen, SF Lin, The Role of the Calcium and the Voltage Clocks in Sinoatrial Node Dysfunction, *Yonsei Med J.* 52 (2) (2011) 211-219.
- [2] C. J. Cunningham, G. B. Klein, *Tratado de fisiologia veterinária*, Saunders- Elsevier, Rio de Janeiro (2008).
- [3] O. Monfredi, H. Dobrzynski, T. Mondal, M. R. Boyett, G.M. Morris, The anatomy and physiology of the sinoatrial node, *A contemporary review*, *PACE* 33 (2010) 1392–406.
- [4] Z. Andrade, N. J. E. Câmara, M. Sadigurski, Envolvimento do nó sinusal na doença de Chagas, *Arq. Bras. Cardiol.* 50 (3) (1988) 153–158.
- [5] C. S. Mendonça, E. H. Coelho, Alterações anatomo-histopatológicas no coração de cães com cinomose, *Biosci, J.* 22 (2006) 169–179.
- [6] R. W. Nelson, C. G. Couto, *Medicina interna de pequenos animais*. Elsevier, 5^a. Ed., Rio de Janeiro (2015).

- [7] R.F. Budaszewski, L.D. Pinto, M.N. Weber, E.T. Caldart, C.D.B.T. Alves, V. Martella, C.W. Canal, Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012, *Virus Res.* 180 (2014) 76–83.
- [8] R. J. Higgins, S. Krakowka, E. A. Metzler, A. Koestner, Canine distemper virus associated cardiac necrosis in the dog, *Vet. Pathol.* 18 (1981) 472–486.
- [9] R. S. Resende, H. E. Coelho, R. Kamimura, R. S. Severino, P. C. L. Oliveira, A. A. Medeiros, A. O. C. Magalhães, Análise microscópica do miocárdio ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose, *Pesq. Vet. Bras.* 29(2) (2009) 117–119.
- [10] J. B.C. Araújo, avaliação cardíaca em cães com cinomose, Dissertação (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu (2017) 63.
- [11] J. E. D. Bastos, H. E. Coelho, R. O. C. Magalhães, R. Kamimura, , G. M. Cunha, M. C. Santos, Alterações histopatológicas do nó sinoatrial em cães com dilatação cardíaca, *Veterinária Notícias* 3 (2007), 15–21.
- [12] M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop et al., Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viroses, REPORT of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 7, Academic, (2000) 1167pp.
- [13] A. L. Frisk, M. König, A. Moritz, Baumgärtner, Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription PCR using serum, whole blood and cerebrospinal fluid from dogs with distemper, *Journal of Clinical Microbiology* 3(1999) 36-43.
- [14] C. M. S. Gebara, S. R. Wosiacki, F. J. Negrão, D. B. Oliveira, S. N. E. Beloni, A. A. Alfieri, A. F. Alfieri, Dectecção do gene da mucoproteína do vírus da conomose por RT- PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56 (2004) 480- 487 p.
- [15] S. L. Deem, L. H. Spelman, R. A. Yates, J. R. Montale, Canine distemper in terrestrial carnivores, A review, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31(4) (2000) 441–451.
- [16] C. E. Greene, Infection and diseases of the dog and cat. C. E. Greene, M. A. Appel, *Canine distemper*. W. B. Saunders Company, Philadelphia Pensylvânia (1990) 934.
- [17] R. A. Fighera, T. M. Souza, M. C. Silva, J. S. Brum, D. L. Graça, G. D. Kimmers, L. F. Irigoyen, C. S. L. Barros, Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965–2004), *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(4) (2008) 223–230.
- [18] E. M. C. Tolosa, C. J. Rodrigues, O. A. Behmer, A. G. Freitas-Neto, Manual de técnicas para histologia normal e patológica, 2. ed., Manole, São Paulo (2003).
- [19] M. C. Silva, R. A. Fighera, A. Mazzante, J. S. Brum, F. Pierezan, C. S. L. Barros, Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005–2008), *Pesq. Vet. Bras.* 29 (2009) 643–652.

- [20] J. P. Santos, C. E. F. Borges, C. C. Locce,,A. F. Júnior,,E. R. Bittar, D. R Ayres, J. F. F. Bittar, Estudo retrospectivo de cães positivos para cinomose em ensaio imunocromatográfico, atendidos no Hospital Veterinário de Uberaba-MG, *Vet. Not.* 18 (2012) 31–36.
- [21] W. M. Correa, C. N. M. Correa, Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. 2^a ed., Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda (1992) 843.
- [23] S.A. Headley, D.L. Graça, Canine distemper: Epidemiological findings of 250 cases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37 (2000) 83-86.
- [24] C.E. Greene,; M. Vandevelde Canine distemper In: C.E GreenE., (Ed.), Infectious Diseases of the Dog and Cat, Elsevier Health Sciences, Philadelphia (2012) 25-42.
- [25] I. Janus, A. N. Nowak, M. Nowak, A. Cepiel, R. Ciaputa, U. Pasławska, P. Dzięgiel, K. Jabłońska, Myocarditis in dogs: etiology, clinical and histopathological features (11 cases: 2007–2013) *Irish Veterinary Journal* (2014) 67:28.
- [26] R. W. Nelson, C. G. Couto, Medicina interna de pequenos animais, Elsevier, Rio do Janeiro (2010).
- [27] W. F. Robinson, R. R. Thompson, W. T. Clark, Sinoatrial arrest associated with primary atrial myocarditis in a dog, *J. Small Animal Pract.* 22 (1981) 99–107.
- [28] L. Sonne, E. C. Oliveira, C. A. Pescador, A. S. Santos, S. P. Pavarini, A. S. Carassimi, D. Driemeier, *Pesq. Vet. Bras.* 29(2) (2009) 143–149.
- [29] T. Kaneshige, N. Machida, S. Nakao, O. Doiguchi, S. Katsuda, Y. Yamane, Complete atrioventricular block associated with lymphocytic myocarditis of the atrioventricular node in the two young adult dogs, *J. Comp. Path.* 137 (207) 146–150.
- [30] A. C. Scalabrini,, A. Andrade, S. G. Andrade, Correlação clínico-patológica na forma indeterminada da Doença de Chagas do cão, *Arq. Bras. Cardiol.* 67(6) (1996) 385- 388.
- [31] R. Woolley, R. Blundel, R. Else, B. Corcoran, C. Devine, A. French,, Atrial myocarditis as a cause of sinus arrest in a dog, *Journal of Small Animal Practice*, 48 (2007) 455–457.
- [32] G. Elia, N. Decaro, V. Martella, F. Cirone, M. S. Lucente, E. Lorusso, L. Trani, C. Buonavoglia, Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR, *Journal of Virological Methods* 136 (2006) 171–176.
- [33] T.B. Saito, A.A. Alfieri, S.R. Wosiacki, F.J. Negrão, H.S.A. Morais, A.F. Alfieri, Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80 (2006) 116–119.
- [34] Y.H. Kim, K.W. Cho, H.Y Youn, H.S. Yoo, H.R. Han, Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR, *J. Vet. Sci.* 2 (2001) 59–63.
- [35] F.J. Negrão, A.A. Alfieri, A.F. alfieri, Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados, *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia* 59 (2007) 253-257.

- [36] T. Kubo, Y. Kagawa, Taniyama, H. A. Hasegawa, Distribution of inclusion bodies in tissues from 100 dogs infected with canine distemper virus, *J. Vet. Med. Sci.* 69 (2007) 527-529.
- [37] V. S. Batista, M. A. Moura, R. R. R. Reis et al., Ocorrência de corpúsculo de Sineglaglia-Lentz em esfregaço sanguíneo de 70 cães com suspeita clínica de cinomose, *Rev. Bras. Cienc. Vet.* 7 (2000), 15, suplemento.
- [38] A. R. Aleman, M. M. Christopher, O. A. Steiner et al., Identificação intracitoplasmática inclusions bodyes in mononuclear cells from the cerebroespinal fluid of dog with canine distemper, *Vet. Patol.* 29 (1992) 84–85.
- [39] N. V. Anderson, *Veterinary gastroenterology*, 2. ed., Lea e Febiger, Filadelphie(1992).
- [40] H. E. Coelho, *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole (2002) 250.
- [41] T. R. Tams, *Gastroenterologia de pequenos animais*, Roca, São Paulo (2005).
- [42] E. A. Tudury, N. V. B. Arias, A. P F. L. Bracarense, J. Megid, R. F. Dias Jr. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa, *Ciência Rural*, Santa Maria 27 (1997) 229–235.