

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS, LESÕES
MACRO E MICROSCÓPICAS, E
IMUNOISTOQUÍMICA DA HEPATITE INFECCIOSA
CANINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria Andréia Inkelmann

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS, LESÕES MACRO E
MICROSCÓPICAS, E IMUNOISTOQUÍMICA DA HEPATITE
INFECCIOSA CANINA**

por

Maria Andréia Inkelmann

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Claudio Severo Lombardo de Barros

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

Inkelmann, Maria Andréia, 1972-

I56e

Epidemiologia, sinais clínicos, lesões macro e microscópicas, e imunoistoquímica da hepatite infecciosa canina / por Maria Andréia Inkelmann ; orientador Cláudio Severo Lombardo de Barros. – Santa Maria, 2008
40 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2008.

1. Medicina veterinária 2. Doenças do fígado 3. Doenças virais 4. Doenças infecciosas 5. Patologia veterinária 6. Doenças de cães 7. Hepatite infecciosa canina 8. Imunoistoquímica I. Barros, Cláudio Severo Lombardo de, orient. II. Título

CDU: 619:636.7

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS, LESÕES MACRO E
MICROSCÓPICAS, E IMUNOISTOQUÍMICA DA HEPATITE
INFECCIOSA CANINA**

elaborada por
Maria Andréia Inkelmann

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD
(Presidente/Orientador)

David Driemeier, Dr. (URGS)

Glaucia Denise Kommers, PhD (UFSM)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Obrigado ao meu Deus por ter me encaminhado para um futuro de sucesso e por sempre guiar meus caminhos.

Obrigado aos meus familiares pela força diária e o amor, e ao meu esposo Alcindo pelo companheirismo, imenso amor e admiração.

Agradeço imensamente aos professores Dominguita, Luis Francisco e Claudio, por todos os ensinamentos e amizade.

Muitas vezes obrigada à professora Glaucia que além de um exemplo para mim, é também como irmã.

Agradeço aos colegas e amigos, Tessie, Marciane, Deise, Aline, Juliana, Eduardo, Adriano, Bruno, Fabiano, Felipe, Daniel e Márcia, pela amizade sincera.

Em especial eu agradeço com muito carinho às amigas, colegas, irmãs, Elisa e Drica, por estar sempre me dando força e incentivo todos os dias.

Um agradecimento também especial à Tati e o Fighera, por estarem sempre disponíveis e me ajudarem desde a minha entrada no laboratório.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS, LESÕES MACRO E MICROSCÓPICAS, E IMUNOISTOQUÍMICA DA HEPATITE INFECCIOSA CANINA

AUTOR: Maria Andréia Inkelmann
ORIENTADOR: Claudio Severo Lombardo de Barros
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 12 de fevereiro de 2008.

A presente dissertação consta de uma investigação sobre hepatite infecciosa canina e resultou na produção de dois trabalhos científicos que estão colocados ao final da dissertação. Os protocolos de necropsias realizadas em 5.361 cães durante um período de 43 anos (1964-2006) foram revisados em busca de casos de hepatite infecciosa canina (HIC) e sessenta e dois (1,2%) casos foram encontrados. Dados epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos desses 62 casos são apresentados e discutidos no primeiro trabalho. O segundo trabalho apresenta os resultados de um estudo imunoistoquímico (IHQ) realizado nos tecidos de 27 dos 62 cães pesquisados no primeiro trabalho. Os tecidos examinados incluíram fígado, rim, baço, linfonodos, tonsilas, pulmão, intestino delgado, encéfalo e medula óssea. Para cada órgão foram atribuídos graus crescentes (de leve a acentuada) de intensidade de imunomarcção. O antígeno de adenovírus canino tipo 1 foi marcado na maioria dos órgãos examinados, principalmente em células endoteliais.

Palavras chave: doenças do fígado, doenças virais, doenças infecciosas, patologia, doenças de cães, hepatite infecciosa canina, imunoistoquímica.

ABSTRACT

MS Dissertation
Graduate Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

EPIDEMIOLOGY, CLINICAL SIGNS, MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC LESIONS, AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF INFECTIOUS CANINE HEPATITIS

AUTHOR: Maria Andréia Inkelmann
ADVISER: Claudio Severo Lombardo de Barros
Santa Maria, February 12, 2008.

This dissertation consists of an investigation on infectious canine hepatitis (ICH) and resulted in two scientific papers which are placed in the final part of this dissertation. The necropsy reports of 5,361 dogs necropsied over a 43-year period (1964-2006) were reviewed in search for cases of infectious canine hepatitis (ICH). Sixty two (1.2%) cases of the disease were found. Epidemiological, clinical and anatomopathological data of these 62 cases are presented in the first paper. The second paper presents an immunohistochemistry (IHC) assay performed in the tissues of 27 dogs from the 62 cases surveyed in the first paper. Evaluated tissues by IHC included liver, kidney, spleen, lymph nodes, tonsils, lungs, small intestine, brain, and spinal cord. For each organ increasing degrees (from mild to marked) of intensity of immune staining were ascribed. The antigen of canine adenovirus type 1 was detected in most of evaluated organs, mainly in endothelial cells.

Key-words: Liver diseases, viral diseases, infectious diseases, pathology, diseases of dogs, infectious canine hepatitis, immunohistochemistry

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
SUMÁRIO.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3. TRABALHO 1.....	16
4. TRABALHO 2.....	25
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho abrange um estudo realizado no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Consiste de um estudo retrospectivo sobre hepatite infecciosa canina (HIC). A HIC é uma doença viral de cães e de outras espécies das famílias Canidae e Ursidae causada por adenovírus canino 1 (CAV-1). Cães afetados apresentam febre, anorexia, latidos freqüentes, dor abdominal, tonsilite, membranas mucosas pálidas e sinais clínicos de distúrbios neurológicos. A morte pode ocorrer de forma superaguda ou aguda. Na forma aguda a evolução pode ser de apenas algumas horas e os sinais clínicos podem não ser percebidos. Formas subagudas, leves e inaparentes são também descritas. A taxa de letalidade varia entre 12% e 25%.

O diagnóstico clínico de HIC é difícil devido ao curso superagudo ou agudo da enfermidade e a pouca especificidade dos sinais clínicos. Em razão disso, o presente estudo foi desenvolvido para investigar aspectos da HIC que possam facilitar seu diagnóstico tanto por clínicos como patologistas. Numa primeira parte do estudo, foram colhidos dados sobre a epidemiologia, os sinais clínicos, as lesões de necropsia e a histopatologia de 62 casos de HIC em cães necropsiados no LPV/UFSM. Numa segunda parte do estudo, os tecidos de 27 desses 62 cães foram processados para imunoistoquímica (IHC) usando um anticorpo monoclonal. O objetivo dessa segunda parte do estudo foi determinar a distribuição e intensidade do antígeno de CAV-1 pelos vários tecidos de cães afetados por HIC. Os resultados são apresentados em dois trabalhos científicos que estão colocados após uma revisão da literatura sobre o assunto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A hepatite infecciosa canina (HIC) é uma doença viral de cães e de outras espécies das famílias Canidae e Ursidae (INNES & SAUNDERS, 1962) causada por adenovírus canino 1 (CAV-1). A HIC foi originalmente descrita por Rubarth em 1947 como uma doença aguda, muitas vezes fatal, que causava lesões no fígado, tecido linfóide e endotélio vascular. Foi por ele chamada de hepatite contagiosa dos cães (PAY, 1950; PARRY 1950). Rubarth chamou atenção para o fato que o vírus da encefalite das raposas era idêntico ao vírus da hepatite canina (JONES et al., 2000).

O CAV-1 é um vírus DNA de fita dupla, não envelopado, com aproximadamente 70-90 nm de diâmetro, pertencente a família Adenoviridae (QUINN et al., 2002). Como outros adenovírus, CAV-1 é resistente à inativação pelo ambiente e também à maioria dos desinfetantes comuns, é sensível ao calor, podendo ser inativado após 5 minutos entre 56°C a 60°C. CAV-1 sobrevive por dias em fômites contaminados em temperatura ambiente e permanece viável por meses a temperaturas abaixo de 4°C (GREENE, 2006). CAV-1 tem demonstrado ser cultivável não somente em cultura de células com origem de cão, mas também em cultura de células de outras espécies como furão e suínos (KOPTOPOULOS & CORNWELL, 1981).

CAV-1 tem especial tropismo por endotélio vascular, mesotélio e parênquima hepático, e é a injúria a esses locais que é responsável pelo edema, hemorragia e necrose hepática. As células do tufo glomerular e as células de Kupffer no fígado são também alvos do vírus (PAY, 1950; GIVAN & JÉZÉQUEL, 1969; HERVÁS et al., 1997; CORDÓN et al., 2002; STALKER & HAYES, 2007).

O CAV-1 replica no núcleo das células alvo e vírions recém-montados formam agregados cristalinos, demonstráveis como inclusões basofílicas intranucleares em cortes histológicos (QUINN et al., 2005). Através de estudo ultraestrutural é possível observar alguns pontos de ruptura da membrana nuclear por onde são liberadas as partículas virais (GIVAN & JÉZÉQUEL, 1969). CAV-1 causa doença aguda, mas seus antígenos foram demonstrados também em casos de lesões inflamatórias e de doença hepática crônica (GOCKE et al., 1967; RAKICH et al., 1986). Há descrições do CAV-1 afetando várias espécies de carnívoros (WHETSTONE et al., 1988; ZARNKE & EVANS, 1989; PARK et al., 2007). Essas espécies, assim como os seus representantes, estão listados na Tabela 1.

Após localização oronasal, CAV-1 replica inicialmente nas tonsilas de onde se dissemina para os linfonodos regionais e vasos linfáticos, antes de atingir o sangue pelo ducto torácico (GREENE, 2006). Na tonsila, a inflamação induzida pelo vírus, pode ser grave e causar a morte se o edema de laringe for muito extenso (STALKER & HAYES, 2007). A viremia dura de quatro a oito dias, mas o vírus é liberado na urina por longos períodos (CULLEN, 2007).

Tabela 1 - Hospedeiros carnívoros não domésticos de adenovírus canino tipo 1 (CAV-1)

Família	Espécie afetada
Canidae	Raposa-vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)
	Raposa-cinzenta (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)
	Coiole (<i>Canis latrans</i>)
	Lobo (<i>Canis lupus</i>)
Ursidae	Urso-negro (<i>Ursus americanus</i>)
	Urso-polar (<i>Ursus maritimus</i>)
Procyonidae	Guaxinim (<i>Procyon lotor</i>)
Mustelidae	Jeritataka-malhada (<i>Mephitis mephitis</i>)
	Lontra-do-rio (<i>Lutra lutra</i>)

Fonte: PARK et al. Canine adenovirus type 1 infection of an eurasian river otter (*Lutra lutra*), **Veterinary Pathology** 44:536–539. 2007.

A doença pode ser subclínica em animais com boa imunidade (isso significa ter um título de anticorpos neutralizantes igual ou maior que 1/500). Cães que demonstram um título parcial de anticorpos (>1/16 e <1/500) nos dias 4-5 pós-infecção (PI), desenvolvem hepatite crônica e fibrose hepática. Necrose hepática centrolobular ou panlobular disseminada é freqüentemente fatal em cães infectados que tenham títulos persistentemente baixos (menor que 1/4) (GOCKE et al., 1967; GREENE, 2006).

Em alguns casos, vasos do encéfalo são afetados e os animais têm hemorragia e necrose vascular que pode culminar em morte precedida por sinais nervosos. Os relatos de encefalite por CAV-1 são geralmente em filhotes com poucas semanas a poucos meses de vida (CAUDELL et al., 2005; DECARO et al., 2006).

O dano endotelial induzido pelo vírus pode levar à coagulação intravascular disseminada (CID) e a diátese hemorrágica manifesta-se por petéquias e equimoses

disseminadas, epistaxe e sangramento contínuo de locais de punção venosa (GREENE, 2006; CULLEN, 2007). Em um modelo experimental animal de CID, cinco cães foram inoculados com CAV-1, desenvolveram CID e apresentaram alterações como trombocitopenia, função plaquetária anormal, tempo de protrombina prolongado, depressão da atividade do fator VIII da coagulação e aumento dos produtos de degradação da fibrina (WIGTON et al., 1976).

Alguns cães recuperados de infecção leve ou inaparente desenvolvem uveíte por complexo imune (hipersensibilidade tipo III ou reação de Arthus), o que produz degeneração e necrose endotelial, resultando em edema corneal conhecido clinicamente como “olho azul” (DECARO et al., 2006; CULLEN, 2007). Foi experimentalmente demonstrado que os vasos sanguíneos nos olhos de cães com opacidade corneal apresentaram aumento da permeabilidade, o que leva ao edema e ao acúmulo de anticorpos no humor aquoso. Anticorpos presentes no humor aquoso, íris e estroma corneal iniciam a reação de Arthus nas áreas onde o antígeno viral está presente. O infiltrado inflamatório observado em muitos casos contribui para o aumento da pressão intraocular e também do edema corneal (CARMICHAEL, 1964). A uveíte e edema são geralmente auto-limitantes a menos que complicações adicionais ou destruição endotelial massiva ocorra (GREENE, 2006).

A vacinação tem tornado a HIC rara em muitos países, mas ainda se tem relatos de surtos esporádicos (PRATELLI et al., 2001; CAUDELL et al., 2005; DECARO et al., 2006). Além disso, em locais onde a doença não é controlada com vacinação, é provável que muitos cães adquiram o agente até os dois anos de vida e sofram infecção inaparente ou doença febril leve com faringite e tonsilite (STALKER & HAYES, 2007). O CAV-1 afeta mais freqüentemente cães jovens com idade entre um mês e dois anos de vida (STALKER & HAYES, 2007). Em um levantamento que analisou o soro de cães (ABLET & BAKER, 1960), foi observado um maior nível de anticorpos para CAV-1 no soro de cães acima de 6 meses de idade. Aparentemente não há predileção por sexo ou raça, pois estudos de casos naturais ou experimentais descrevem a doença em ambos os sexos e variadas raças (LARIN, 1958).

Pesquisas de anticorpos neutralizantes para o CAV-1 têm demonstrado a presença do vírus na população de canídeos domésticos e selvagens, e também em ursídeos, comprovando que a infecção subclínica está presente com o passar dos anos (JAMISON et al., 1973; AMUNDSON & YUILL, 1981; STEPHENSON et al., 1982; ZARNKE & BALLARD, 1987; ZARNKE & EVANS, 1989; GREENE, 2006; DEZENGRINI et al.,

2007).

Observações em surtos de infecção por CAV-1 concomitante com outros agentes também demonstram que a vacinação correta e o cuidado com a desinfecção e higiene, são fatores determinantes na ocorrência dessa doença. Um grave surto ocorreu em um canil que abrigava duzentos cães adultos e trinta filhotes com menos de quatro meses de idade. Havia problemas de higiene e desinfecção, superlotação e um programa de vacinação não estava implantado. Vinte desses filhotes morreram uma semana após o início dos sinais clínicos. Neste caso foram isolados CAV-1 e coronavírus canino (CCV). Muitos cães desse canil foram testados por sorologia pareada e apresentavam aumento nos níveis de anticorpos para CAV-1 (PRATELLI et al., 2001). Outros vírus já foram descritos em infecções concomitantes com CAV-1, como por exemplo, o vírus da cinomose (KOBAYASHI & ITAKURA, 1993)

Quando a doença clínica fica evidenciada, seu curso é bastante variável, mas freqüentemente é hiperagudo, e os primeiros sinais se manifestam apenas algumas horas antes da morte do animal (JONES et al., 2000). Os sinais clínicos dos cães que sobrevivem ao período virêmico agudo incluem principalmente apatia, anorexia, vômito e diarreia com ou sem evidência de sangue. Avermelhamento e aumento de volume das tonsilas, associado com faringite e laringite, é comum. Dor abdominal e hepatomegalia são freqüentemente aparentes na doença aguda (GREENE, 2006; JONES et al., 2000). Inicialmente a temperatura está elevada, mas pode cair rapidamente até níveis subnormais (JONES et al., 2000). A icterícia é incomum na HIC aguda (PARRY, 1950; HODGMAN & LARIN, 1953; SWANGO, 1997), mas é encontrada em alguns cães que sobrevivem a fase fulminante da doença (JONES et al., 2000; GREENE, 2006). Icterícia leve foi observada 96 horas pós-inoculação (PI) em filhotes infectados experimentalmente com CAV-1 (WIGTON et al., 1976). Edema subcutâneo grave da cabeça, pescoço e aspectos ventrais do tronco é um sinal que pode ocorrer, mas é considerado raro (WIGTON et al., 1976; JONES et al., 2000). Muitas vezes os cães não apresentam sinais clínicos e morrem subitamente, o que faz com que os proprietários confundam a doença com intoxicação (SMITH, 1951; SWANGO, 1997; QUINN et al., 2005; GREENE, 2006).

Sinais clínicos de doença aguda do sistema nervoso central podem ser observados em filhotes e incluem ataxia, letargia, vocalização, pressão da cabeça, andar em círculos e cegueira (CAUDELL et al., 2005). Hemorragias multifocais na pele e membranas mucosas, e sangramento constante em locais de punção venosa, são sinais observados

em casos naturais e experimentais (WIGTON et al., 1976).

Na necropsia as principais lesões observadas incluem petéquias e equimoses disseminadas, líquido serossanguinolento na cavidade abdominal com fibrina, fígado aumentado de volume, com aspecto moteado e recoberto por película de fibrina, tonsilas aumentadas e avermelhadas, e linfonodos edematosos, congestos e, muitas vezes, hemorrágicos. Em alguns casos a quantidade de fibrina pode ser extensa e provocar aderência de vísceras a parede abdominal. Frequentemente a parede da vesícula biliar está espessada por edema (CORNWELL & WRIGHT, 1969; JONES et al., 2000; GREENE, 2006; STALKER & HAYES, 2007; CULLEN, 2007). Hemorragias podem ocorrer no pulmão, timo, e em uma pequena percentagem de casos no encéfalo ao nível do tálamo, mesencéfalo, tronco encefálico e cerebelo (CORNWELL & WRIGHT, 1969; GREENE, 2006; STALKER & HAYES, 2007). Em infecções experimentais hemorragias multifocais foram observadas mais frequentemente no aspecto ventral do encéfalo (PARRY, 1950). No estômago observa-se conteúdo líquido sanguinolento e a mucosa está congesta e com pétequias. No intestino há hemorragia subserosa e petéquias na mucosa (WIGTON et al., 1976).

As alterações histológicas incluem necrose hepática centrolobular a panlobular. Pode-se observar múltiplos focos de necrose em geral com distribuição predominantemente centrolobular ao segundo dia pós-infecção (CORNWELL & WRIGHT, 1969). Inclusões intranucleares basofílicas aparecem inicialmente em células de Kupffer e posteriormente em hepatócitos viáveis ou parcialmente degenerados adjacentes a áreas de necrose (JONES et al., 2000; GREENE, 2006). As inclusões intranucleares frequentemente são redondas, ocupando grande parte do diâmetro nuclear e causando a marginação da cromatina (PARRY, 1950). Esse tipo de inclusão intranuclear é chamado de Cowdry tipo A (WARD et al., 1971).

As inclusões intranucleares são também descritas no endotélio vascular da maioria dos órgãos (CORNWELL & WRIGHT, 1969) e o tipo de célula que desenvolve a inclusão parece estar relacionado à via de inoculação (STALKER & HAYES, 2007). Foi demonstrado experimentalmente que há inclusões intranucleares no endotélio corneal, trabécula e íris no olho, após a inoculação do antígeno de CAV-1 (CARMICHAEL, 1964).

Alterações histológicas disseminadas ocorrem em vários órgãos como resultado da lesão endotelial causada pelo vírus (GREENE, 2006). Nos rins, o principal local de ocorrência de inclusões intranucleares nas células endoteliais é o glomérulo. Essas

inclusões raramente estão associadas a qualquer lesão demonstrável no néfron (JONES et al., 2000; STALKER & HAYES, 2007). Porém há descrição de nefrite intersticial com predomínio de linfócitos e plasmócitos em cães infectados que sobreviveram. Nos linfonodos há necrose e depleção linfóide, degeneração vascular, edema e hemorragia (WIGTON et al., 1976). O baço muitas vezes tem aparência macroscópica normal, mas na histopatologia observa-se degeneração fibrinóide na muscular de artérias com grandes inclusões intranucleares basofílicas em células endoteliais (WIGTON et al., 1976). No encéfalo as alterações são essencialmente secundárias à injúria vascular e podem estar ausentes (STALKER & HAYES, 2007). Essas alterações incluem células endoteliais tumefeitas, descamadas em vasos meníngeos e contendo inclusões intranucleares. Vasculite necrosante de pequenas arteríolas e capilares do tálamo ou hemorragia perivascular são descritas ao terceiro dia PI em casos de infecção experimental (CORNWELL & WRIGHT, 1969). Nas meninges são descritos congestão vascular, hemorragia perivascular e inclusões intranucleares basofílicas em células endoteliais (CORNWELL & WRIGHT, 1969; PURSELL et al., 1983). Nos olhos geralmente há poucas inclusões intranucleares no endotélio corneal, porém alguns casos podem apresentar numerosas inclusões intranucleares, como observado em dois cães no 6º e 7º dias PI (CARMICHAEL, 1964).

Na rotina o diagnóstico da HIC é baseado na associação de sinais clínicos, achados de necropsia e histopatologia. Outros métodos de diagnóstico utilizados incluem a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), isolamento viral, imunofluorescência, microscopia eletrônica e imunoistoquímica.

A técnica de PCR é altamente sensível e específica e pode detectar baixo número de cópias de DNA (CHOVINARD et al., 1998). Em surtos de infecção pelo CAV-1 essa técnica foi utilizada para identificar o agente (KISS et al., 1996; PRATELLI et al., 2001; CAUDELL et al., 2005; DECARO et al., 2006; PARK et al., 2007).

O isolamento viral pode ser feito do sangue, secreção da orofaringe, urina e fezes, no período febril. Além disso, na urina há prolongada liberação do vírus por longos períodos após o início da infecção permitindo o isolamento viral (SWANGO, 1992). A imunofluorescência pode ser usada para demonstrar antígenos de CAV-1 em cortes histológicos ou em lâminas que contenham impressão de tecidos colhidos na necropsia, sendo o rim e fígado os órgãos escolhidos para a realização desta técnica (SWANGO, 1992).

Pela microscopia eletrônica (ME) observam-se partículas virais intranucleares

características de adenovírus, que ocorrem em grupos ou dispersas. Alguns grupos de partículas virais aparecem associadas com formações cristalinas que são formadas de proteínas. A membrana nuclear apresenta ruptura em alguns pontos e nessas áreas são liberadas partículas virais para o citoplasma (GIVAN & JÉZÉQUEL, 1969). A ME demonstrou a presença de locais de replicação viral nas células glomerulares de um filhote com HIC aguda (HERVÁS et al., 1997).

A imunistoquímica (IHQ) é uma técnica utilizada em muitos laboratórios veterinários para o propósito de diagnóstico e também pesquisa. O conceito fundamental na IHQ é a demonstração de antígenos dentro de seções de tecidos com a utilização de anticorpos específicos (RAMOS-VARA, 2005). Em casos de ocorrência natural de HIC, e também em infecção experimental, a confirmação da presença de CAV-1 foi feita por imunistoquímica (RAKICH et al., 1986; CAUDELL et al., 2005). Um estudo experimental avaliando a distribuição do antígeno de um adenovírus através da técnica de IHQ, foi realizado em cervos, e o resultado foi a imunomarcagem em células do endotélio vascular de diversos órgãos como língua, mucosa oral, tonsilas, pulmão, rim, rúmen, íleo e cólon (WOODS et al., 1999).

O objetivo dessa dissertação foi relatar a epidemiologia, os sinais clínicos, as lesões de necropsia e a histopatologia de 62 casos de HIC com a finalidade de orientar clínicos e patologistas no diagnóstico dessa doença. Adicionalmente, a técnica de imunistoquímica usando-se anticorpo monoclonal foi aplicada nos tecidos de 27 desses 62 casos para demonstrar a distribuição do antígeno viral. Em dois trabalhos colocados a seguir estão os resultados obtidos neste estudo, o qual faz parte de uma série que vem sendo desenvolvida em nosso laboratório com a finalidade de documentar as principais doenças que causam morte em cães.

3. TRABALHO 1

HEPATITE INFECCIOSA CANINA: 62 CASOS

**Maria A. Inkelmann, Daniela B. Rozza, Rafael A. Fighera, Glaucia D. Kommers,
Dominguita L. Graça, Luiz F. Irigoyen e Claudio S. L. Barros**

PUBLICADO EM V.27 (8), P.325-332.

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Hepatite infecciosa canina: 62 casos¹

Maria A. Inkelmann², Daniela B. Rozza², Rafael A. Fighera², Glaucia D. Kommers³,
Domingueta L. Graça³, Luiz F. Irigoyen³ e Claudio S.L. Barros^{3*}

ABSTRACT. Inkelmann M.A., Rozza D.B., Fighera R.A., Kommers G.D., Graça D.L., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2007. [**Infectious canine hepatitis: 62 cases.**] Hepatite infecciosa canina: 62 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(8):325-332. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: claudioslbarros@uol.com.br

Necropsy reports from 5,361 dogs necropsied over a 43-year period (1964-2006) were reviewed in search for cases of infectious canine hepatitis (ICH). Sixty two (1.2%) cases of the disease were found. Most of the 62 affected dogs (91.9%) were 2-year-old or less. Clinical signs were recorded in the necropsy files of 45 ICH affected dogs and included anorexia (55.6%), apathy (35.6%), diarrhea (35.6%) (often with blood [43.8%]), neurological signs (33.3%), vomiting (26.7%), petechiae and echymosis in the mucous membranes and/or skin (24.4%), hypothermia (20.0%), abdominal pain (15.6%), icterus (13.3%), enlargement and congestion of the tonsils (11.1%), fever (11.1%) and ascites (6.7%). The clinical courses lasted from few hours to 15 days. The most frequent necropsy findings included hepatic changes (87.1%), edematous, congested and hemorrhagic lymph nodes (51.6%), bloodstained fluid, clear fluid or whole blood in the abdominal cavity (35.5%), and petechial or paint-brush hemorrhages over the pleural (27.4%) and gastrointestinal (24.2%) serosal surfaces. In 12.9% of the cases there was a granularity to the intestinal serosa. Hemorrhages in the leptomeninges and in the substance of the brain were observed in 9.7% of the cases. Hepatic gross changes included moderately enlarged and more friable livers with marked lobular pattern, congestion and multifocal pale or hemorrhagic foci of necrosis. Films and strands of fibrin covered the hepatic surface in 20.4% of the cases and in 27.8% of the cases the gall bladder was thickened by edema. Zonal or randomly distributed multifocal hepatic necrosis (93.5%) associated with intranuclear inclusion bodies were the most consistent microscopic findings. Intranuclear inclusion bodies were found in the liver in every case and their detection was the criterium for confirmation of the diagnosis. The most significant microscopic extra-hepatic lesions included hemorrhages and intranuclear inclusion bodies in endothelial and reticuloendothelial cells of the renal glomeruli (50.0%) lymph nodes (47.8%), brain (27.8%), tonsils (25.0%) and spleen (10.0%).

INDEX TERMS: Liver diseases, viral diseases, infectious diseases, pathology, diseases of dogs, infectious canine hepatitis.

RESUMO. Os protocolos de necropsias realizadas em 5.361 cães durante um período de 43 anos (1964-2006) foram revisados em busca de casos de hepatite infecciosa canina (HIC) e sessenta e dois (1,2%) casos foram encontrados. A maioria dos

62 cães afetados tinha dois anos de idade ou menos (91,9%). Os sinais clínicos foram anotados nos protocolos de necropsia de 45 cães afetados por HIC e incluíam anorexia (55,6%), apatia (35,6%), diarreia (35,6%), freqüentemente com sangue (43,8% dos casos de diarreia), distúrbios neurológicos (33,3%), vômito (26,7%), petéquias e equimoses nas membranas mucosas e/ou pele (24,4%), hipotermia (20,0%), dor abdominal (15,6%), icterícia (13,3%), aumento de volume e congestão das tonsilas (11,1%), febre (11,1%) e ascite (6,7%). A duração do curso clínico variou de poucas horas a 15 dias. Os principais achados de necropsia incluíram alterações hepáticas (87,1%), linfonodos edematosos, congestos e hemorrágicos (51,6%), líquido sanguinolento, líquido claro ou sangue na cavidade abdominal

¹ Recebido em 8 de junho de 2007.

Aceito para publicação em 25 de junho de 2007.

Parte da tese de Mestrado do primeiro autor.

² Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), área de Concentração em Patologia Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

³ Depto Patologia, UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência: claudioslbarros@uol.com.br

(35,5%), víbices, sufusões e petéquias sobre a pleura visceral (27,4%) e superfície serosa das vísceras gastrintestinais (24,2%). Em 12,9% dos casos a serosa do intestino tinha aspecto granular. Hemorragias cerebrais nas leptomeninges e na substância do encéfalo foram observadas em 9,7% dos casos. As alterações hepáticas macroscópicas incluíam fígados moderadamente aumentados de volume, mais friáveis, com acentuação do padrão lobular, congestos e com múltiplos focos de necrose pálidos ou hemorrágicos. Películas e filamentos de fibrina cobriam a superfície hepática em 20,4% dos casos e em 27,8% dos casos a parede da vesícula biliar estava espessada por edema. Necrose hepática zonal ou aleatória (93,5% dos casos) associada a corpúsculos de inclusão intranucleares foi a lesão histológica mais regularmente encontrada. Os corpúsculos de inclusão intranucleares ocorreram no fígado em todos os casos e esse foi o critério para confirmação do diagnóstico. As lesões histológicas extra-hepáticas mais importantes incluíram hemorragias e corpúsculos de inclusão em células endoteliais do tufo glomerular renal (50,0%) dos linfonodos (47,8%), do encéfalo (27,8%), das tonsilas (25,0%) e do baço (10,0%).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças do fígado, doenças virais, doenças infecciosas, patologia, doenças de cães, hepatite infecciosa canina.

INTRODUÇÃO

A hepatite infecciosa canina (HIC) é uma doença viral de cães e de outras espécies das famílias Canidae e Ursidae (Innes & Saunders 1962) causada por adenovírus canino 1 (CAV-1). Cães afetados apresentam febre (39,4-41,1°C), anorexia, latidos frequentes, dor abdominal, tonsilite, membranas mucosas pálidas e sinais clínicos de distúrbios neurológicos (Swango 1997, Kelly 1993, Greene 2006). A morte pode ocorrer de forma superaguda ou aguda (Pay 1950, Parry & Larin 1951, Larin 1958). Na forma aguda a evolução pode ser de apenas algumas horas e os sinais clínicos podem não ser percebidos. Formas subagudas, leves e inaparentes são também descritas (Parry & Larin 1951, Hodgman & Larin 1953). A taxa de letalidade varia entre 12% (Parry 1950) e 25% (Kelly 1993).

O diagnóstico clínico de HIC é difícil devido ao curso superagudo ou agudo da enfermidade e à pouca especificidade dos sinais clínicos. O objetivo deste trabalho é relatar a epidemiologia, os sinais clínicos, as lesões de necropsia e a histopatologia de 62 casos de HIC com a finalidade de orientar clínicos e patologistas no diagnóstico dessa doença. Este estudo faz parte de uma série que vem sendo desenvolvida em nosso laboratório com a finalidade de documentar as principais doenças que causam morte em cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos de necropsia realizadas em cães de janeiro de 1964 a dezembro de 2006, no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foram revisados e dados referentes à idade e sexo foram anotados. Os cães foram distribuídos em três faixas etárias de acordo com esquemas de classificação de idade de cães publicados anteriormente (Hoskins 1993, Goldston &

Hoskins 1999): filhotes (até 1 ano de idade), adultos (de um a nove anos de idade) e idosos (dez anos de idade ou mais). Foram selecionados os protocolos de necropsia de todos os casos com o diagnóstico de hepatite infecciosa canina (HIC). Desses protocolos anotaram-se os seguintes dados: idade, sexo, evolução clínica, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatologia. As preparações histológicas de fígado dos casos de HIC foram revisadas para confirmação do diagnóstico. O método definitivo para a inclusão de um caso como HIC foi a presença das inclusões intranucleares características em hepatócitos.

RESULTADOS

Epidemiologia

Nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), correspondentes ao período entre janeiro de 1964 e dezembro de 2006 (43 anos), foram encontrados 5.361 protocolos de necropsia de cães. Desses, em 177 (3,3%) o sexo não foi informado. Dos 5.184 cães com sexo especificado nos protocolos, 2.928 (56,5%) eram machos e 2.256 (43,5%) eram fêmeas. Do total de 5.361 cães, 354 (6,6%) não tiveram suas idades anotadas nos protocolos. Dos 5.007 cães em que a idade foi informada, 1.893 (37,8%) foram incluídos como filhotes, 2.163 (43,2%) como adultos e 951 (19,0%) como idosos.

Dos 5.361 protocolos de necropsia de cães encontrados nesse período, 62 (1,2%) tinham o diagnóstico de hepatite infecciosa canina. Desses 62 cães, 38 (61,3%) eram machos e 24 (38,7%) eram fêmeas. Quarenta e cinco (72,6%) cães foram incluídos como filhotes e 17 (27,4%) como adultos. Dos 45 cães com HIC classificados como filhotes, 43 tinham idades que variavam entre um mês e um ano e dois tinham menos de um mês (ambos com nove dias de idade). Dos 17 cães incluídos como adultos, 12 tinham 1 ou 2 anos de idade; isso significa que 57 dos 62 (91,9%) cães que morreram em consequência de HIC tinham dois anos de idade ou menos. Dos cinco cães com mais de dois anos de idade, dois tinham quatro anos e outros três tinham seis, sete e oito anos de idade.

Sinais clínicos

Os sinais clínicos não constavam dos protocolos de necropsia de 17 dos 62 cães com HIC. Os sinais clínicos descritos nos restantes 45 cães com HIC incluíam, em ordem decrescente de frequência (Fig.1), anorexia (25/45 [55,6%]), apatia (16/45 [35,6%]), diarreia (16/45 [35,6%]) (Fig.2), frequentemente com sangue (43,8% dos casos de diarreia), sinais neurológicos (15/45 [33,3%]), vômito (12/45 [26,7%]), petéquias e equimoses nas membranas mucosas e/ou pele (11/45 [24,4%]), hipotermia (9/45 [20,0%]), dor abdominal (7/45 [15,6%]), icterícia (6/45 [13,3%]), aumento de volume e congestão das tonsilas (5/45 [11,1%]), febre (5/45 [11,1%]) e ascite (3/45 [6,7%]). Em apenas um caso havia dados do painel bioquímico no protocolo de necropsia, indicando uma elevação na atividade sérica de alanina aminotransferase. Os sinais neurológicos que afetavam 15 dos 45 cães foram anotados e estão especificados no Quadro 1.

O curso clínico da doença variou de algumas horas a 15 dias, nos 45 casos em que essa informação estava disponível (Fig.3). Dos 13 cães com evolução clínica menor que um dia

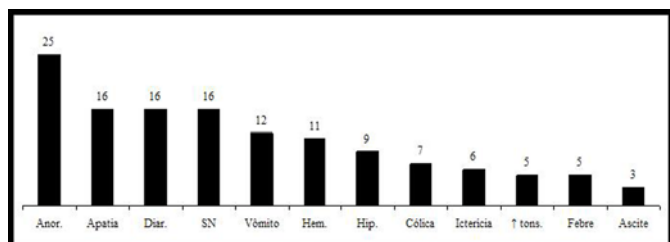


Fig.1. Sinais clínicos encontrados em 45 cães afetados por hepatite infecciosa canina. **SN**, sinais neurológicos; **Hem.**, hemorragias nas membranas mucosas e/ou pele; **Diar.**, diarreia; **Hip.**, hipotermia; **↑ tons.**; aumento de volume e hiperemia das tonsilas.

havia casos de evolução de seis horas (n=2), 12 horas (n=3) e em oito casos havia a anotação de “morte súbita”. Nesses oito casos, o proprietário não havia observado sinais clínicos e embora estivesse claro no histórico que os cães tiveram um curso clínico inferior a 24 horas, não era possível inferir a



Fig.2. Cão afetado por hepatite infecciosa canina com diarreia. Esse sinal clínico foi observado em cerca de um terço dos casos.

Quadro 1. Tipo do envolvimento do encéfalo em 25 cães com hepatite infecciosa canina

Protocolo	Sinal clínico neurológico	Alteração macroscópica no encéfalo	Alteração histológica no encéfalo
Vn-064-68	Dificuldade para caminhar, paralisia	Não observada	Encéfalo não coletado
Vn-076-68	Convulsões	Não observada	Encéfalo não coletado
Vn-067-72	Letargia, ataxia, convulsões	Não observada	Hemorragias perivasculares
Vn-089-73	Paralisia	Não observada	Hemorragias perivasculares
Vn-028-74	Convulsões	Não observada	Meningoencefalite não-purulenta
Vn-160-77	Sem sinais neurológicos	Não observada	INs ^a em células endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-103-78	Gritos, incoordenação, fraqueza nos membros pélvicos	Não observada	Sem alterações histológicas
Vn-180-82	Distúrbios da visão, dificuldade em beber água	Não observada	Necrose de células endoteliais, INs em células endoteliais, hemorragias perivasculares associadas a células inflamatórias
Vn-021-83	Incapacidade para andar, agressividade, reflexos podais diminuídos, miose	Não observada	Necrose de células endoteliais, INs em células endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-021-87	Fortes convulsões	Não observada	Marginação leucocitária em vênulas, necrose de células endoteliais
Vn-095-87	Sem sinais neurológicos	Petéquias no cerebelo	Encéfalo não coletado
Vn-209-89	Sem sinais neurológicos	Não observada	INs em células endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-228-92	Sem sinais neurológicos	Não observada	Necrose de células endoteliais, INs em células endoteliais, hemorragias perivasculares associadas a células inflamatórias
Vn-238-92	Convulsões	Não observada	Discretas hemorragias perivasculares, necrose de células endoteliais
Vn-101-94	Convulsões	Não observada	Sem alterações histológicas
Vn-252-96	Convulsões, sialorréia	Não observada	Encéfalo não coletado
Vn-067-97	Sem sinais neurológicos	Meninges com petéquias e sufusões. Hematoma no lobo occipital esquerdo	Encéfalo não coletado
Vn-090-97	Hiperestesia	Não observada	Encéfalo não coletado
Vn-180-97	“Sinais neurológicos”	Não observada	Sem alterações histológicas
Vn-241-02	Sem sinais neurológicos	Hemorragias no cerebelo	Meningite com fibrina, neutrófilos, macrófagos e hemorragias perivasculares no neurópilo e substância branca subcortical. INs em células endoteliais
Vn-305-05	Convulsões	Não observada	Necrose de células endoteliais, INs em célula endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-097-06	Sem sinais neurológicos	Não observada	Necrose de células endoteliais, INs em célula endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-098-06	Sem sinais neurológicos	Áreas multifocais de hemorragia	Necrose de células endoteliais, INs em célula endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-171-06	Sem sinais neurológicos	Áreas multifocais de hemorragia	Necrose de células endoteliais, INs em célula endoteliais, hemorragias perivasculares
Vn-173-06	Sem sinais neurológicos	Áreas multifocais de hemorragia	Hemorragias perivasculares

^aINs = inclusões intranucleares.

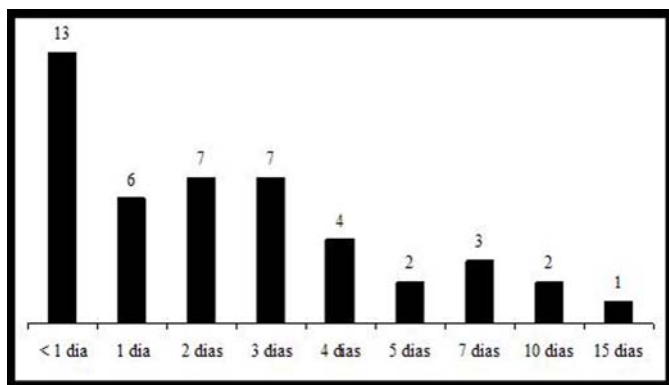


Fig.3. Distribuição da duração do curso clínico em 45 cães afetados por hepatite infecciosa canina.

evolução precisa da doença. Os 13 (28,9%) casos com evolução clínica até 24 horas foram considerados como super-agudos, os 26 (57,8%) casos com evolução de 1-5 dias foram considerados como agudos e os restantes seis (13,3%) casos com evolução de 7-15 dias foram considerados como subagudos.

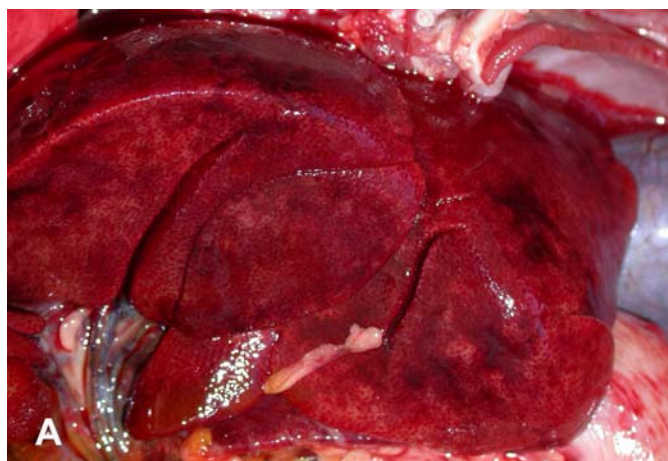


Fig.4. Aspecto macroscópico do fígado de cão afetado por hepatite infecciosa canina. **A.** O órgão está aumentado de volume e apresenta hemorragias irregulares na superfície capsular. **B.** Pontilhado claro na superfície de corte.

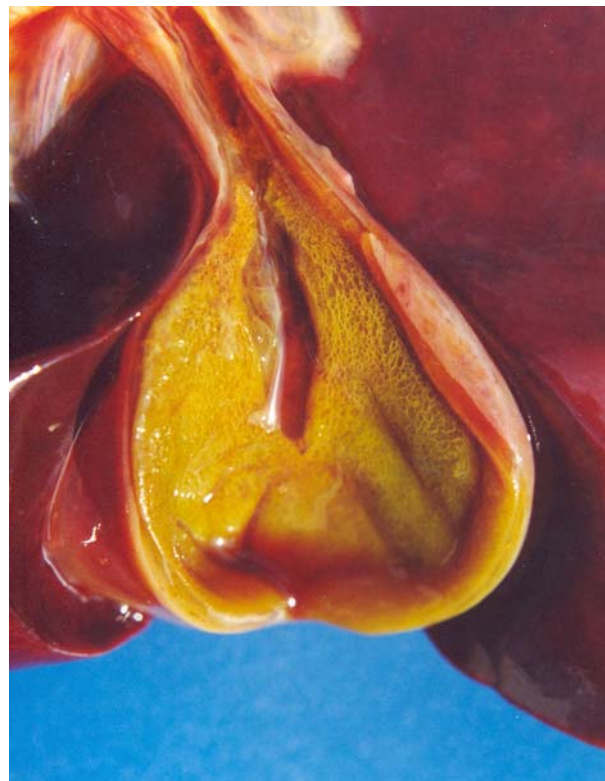


Fig.5. Edema da parede vesícula biliar como o observado aqui, ocorreu em 15 dos 62 cães afetados por hepatite infecciosa canina.

Achados de necropsia

Dos 62 protocolos de necropsia de cães com HIC, em oito casos (12,9%) não havia descrição do aspecto macroscópico do fígado. Em 39 dos 54 (72,2%) casos em que havia descrição de lesões hepáticas, o fígado foi descrito com o escuro, moderadamente aumentado de volume com áreas irregulares de hemorragia e pontilhado claro vistos na superfície natural e de corte (Fig.4). Em 13 desses 39 (33,3%) casos era mencionada acentuação do padrão lobular. Em 15 dos 54 casos (27,8%) casos o fígado foi descrito como mais claro, mais pálido ou amarelado e com pontilhado hemorrágico distribuído aleatoriamente pelo parênquima. Em cinco desses 15 (33,3%) casos havia infestação concomitante por *Ancylostoma caninum* e em seis (40,0%) havia icterícia. Na necropsia de 11 dos 54 (20,4%) cães havia uma película de fibrina depositada sobre a cápsula hepática, principalmente entre os lobos, causando aderências interlobares, mas também sobre a serosa de outras vísceras. Havia edema da parede da vesícula biliar (Fig.5) em 15 dos 54 (27,8%) casos em que foram descritas lesões hepáticas.

As lesões extra-hepáticas encontradas na necropsia dos 62 cães com HIC estão relacionadas no Quadro 2. Em 22 dos 62 (35,5%) casos, quantidades variáveis de líquido (10-700ml) foram observadas na cavidade abdominal. Em 10 desses casos o líquido era serossangüinolento e em 8 foi descrito como incolor ou amarelo-citrino. Esses 18 casos foram considerados como ascite. Em quatro casos, o líquido consistia de sangue total (hemoperitônio). Numa grande proporção dos casos (32/62 ou 51,6%) os linfonodos eram descritos como aumentados de vo-

lume e avermelhados. Ao corte eram macios e deixavam fluir abundante quantidade de líquido tingido de sangue; nesses casos, todos os linfonodos do cadáver estavam afetados, mas a lesão era mais proeminente nos linfonodos da cavidade abdo-

Quadro 2. Alterações extra-hepáticas encontradas na necropsia de 62 cães com hepatite infecciosa canina

Sistema	Alteração observada	Número de vezes observada (%)
Integumento e tecido subcutâneo	Mucosas anêmicas	13 (21,0)
	Mucosas ictericas	6 (9,7)
	Hemorragias na pele	5 (8,1)
	Edema subcutâneo	5 (8,1)
	Petéquiias na mucosa oral	4 (6,4)
Cardiovascular	Equimoses e petéquiias subepicárdicas e subendocárdicas	12 (19,4)
Hemolinfopoético	Linfonodos aumentados de volume, congestos e edematosos	32 (51,6)
	Hemorragias/edema do timo	7 (11,3)
	Tonsilas aumentadas de volume e hiperêmicas	5 (8,1)
	Hemorragias na pleura visceral	17 (27,4)
Respiratório	Pulmões avermelhados, pesados e úmidos	7 (11,3)
	Hidrotórax	1 (1,6)
Digestivo	Intestino com mucosa avermelhada e sangue na luz	25 (40,3)
	Ascite	18 (29,0)
	Hemorragias na serosa do estômago, do intestino e de outras vísceras da cavidade abdominal	15 (24,2)
	Sangue no conteúdo gástrico	9 (14,5)
	Serosa intestinal de aspecto granular	8 (12,9)
	Avermelhamento da mucosa gástrica	4 (6,4)
	Edema intersticial de aspecto gelatinoso no pâncreas	4 (6,4)
	Hemoperitônio	4 (6,4)
	Invaginação do intestino delgado	1 (1,6)
	Urinário	Sangue na urina
Pontilhado vermelho multifocal no rim		1 (1,6)
Nervoso	Hemorragias no encéfalo	6 (9,7)



Fig. 6. Extensas áreas de hemorragia na pleura visceral de um cão afetado por hepatite infecciosa canina.

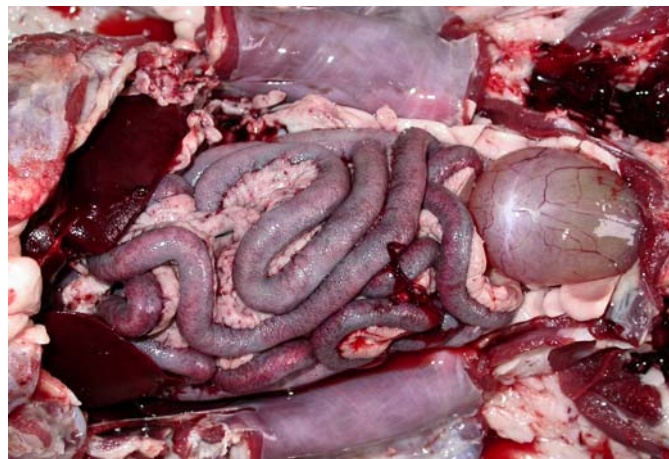


Fig. 7. A serosa tinha o aspecto granular como observado nesta figura em 8 das 62 necropsias de cães afetados por hepatite infecciosa canina.

Quadro 3. Órgãos coletados nas 62 necropsias de cães com hepatite infecciosa canina

Órgão	Número de necropsias em que foi coletado	% de vezes que foi coletado (sobre as 62 necropsias)
Fígado	62	100
Rim	46	74,2
Encéfalo	36	58,1
Pulmão	30	48,4
Intestino	23	37,1
Linfonodos	23	37,1
Coração	13	21,0
Baço	10	16,1
Estômago	9	14,5
Tonsila	8	12,9
Bexiga	7	11,3
Vesícula biliar	5	8,1
Timo	3	4,8
Pâncreas	3	4,8
Gânglio trigêmeo	2	3,2
Epidídimo	1	1,6
Próstata	1	1,6
Testículo	1	1,6

minal. Víbices, sufusões e petéquiias ocorriam na serosa de várias vísceras da cavidade torácica e abdominal, principalmente na pleura visceral (17/62 ou 27,4%) (Fig. 6) e na serosa do estômago e intestino (15/62 ou 24,2%). As hemorragias pleurais por vezes se estendem para o interior do parênquima e as hemorragias na serosa gástrica ocorriam principalmente na porção cranial da curvatura maior do estômago. A serosa do intestino tinha um aspecto caracteristicamente granular (Fig. 7) em oito (12,9%) casos e hemorragias foram observadas no encéfalo (Fig. 8) de seis cães (9,7%).

Achados histopatológicos

O número de órgãos avaliados histologicamente em cada caso variou consideravelmente, mas incluía o fígado em todos os casos (Quadro 3). A interpretação dos achados histopatológicos deve levar em conta a frequência com que determinado órgão foi avaliado. As principais alterações histológicas locali-

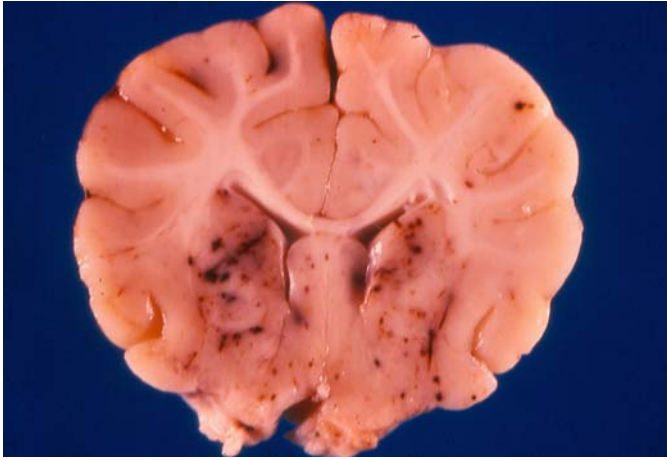


Fig. 8. Corte transversal, rostral ao quiasma óptico, no encéfalo de cão com hepatite infecciosa canina. Os núcleos caudato, septal, putame, globo pálido e a cápsula interna mostram hemorragias multifocais.

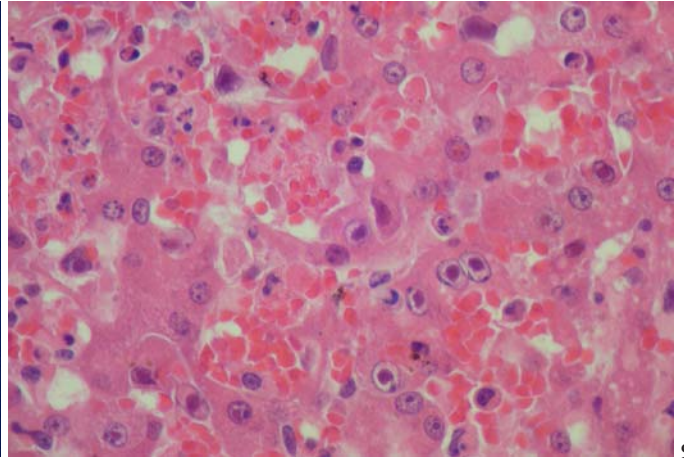


Fig. 9. Aspecto histológico do fígado de cão com hepatite infecciosa canina mostrando hepatócitos com inclusões intranucleares anfofílicas sólidas cercadas por halo claro e com marginação da cromatina nuclear contra a carioteca. As inclusões são cercadas por hepatócitos necróticos. HE, obj.40.

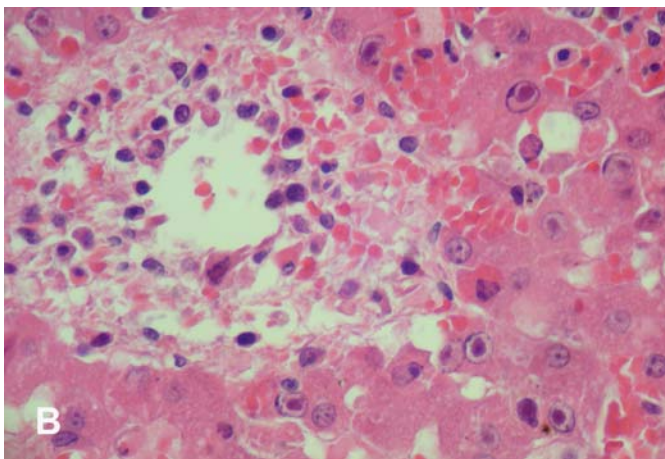
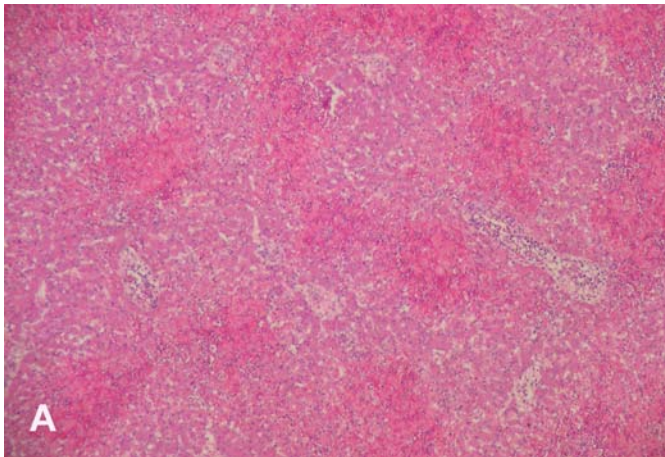


Fig. 10. Distribuição da necrose hepática zonal na hepatite infecciosa canina. **A.** Necrose centrolobular. HE, obj.20. **B.** Maior aumento da lesão em A, mostrando edema e infiltrado inflamatório ao redor da veia centrolobular. Várias inclusões intranucleares anfofílicas características da infecção por adenovírus canino 1 podem ser vistas em hepatócitos ao redor da veia centrolobular. HE, obj.40.

zavam-se no fígado. Em todos os casos havia inclusões intranucleares (INs) em hepatócitos, células de Kuppfer ou células endoteliais do revestimento dos sinusóides. Essas INs eram basofílicas ou anfofílicas; algumas delas preenchiam todo o núcleo, mas a maioria apresentava um halo claro entre a inclusão e o limite da carioteca (Fig. 9). Em 58 (93,5%) casos havia necrose hepática (Fig. 10), associada a hemorragia em 27 (46,6%) casos e a infiltrado inflamatório misto nos espaços porta em oito (13,8%) casos. A necrose tinha distribuição centrolobular em 41 (70,7%) casos e aleatória em 17 (29,3%) casos. As INs eram geralmente observadas em células da periferia dos focos de necrose. Em quatro (6,4%) casos não se observou necrose hepática; nesses, a principal alteração, além das INs, era congestão, mais acentuada no centro do lóbulo. Não foram observadas diferenças quando se compararam as alterações histológicas hepáticas de cães com evolução clínica superaguda, aguda e subaguda. As alterações histológicas encontradas no encéfalo estão relacionadas no Quadro 1 e consistiam de hemorragia (14/36 ou 38,9%), em geral perivasculares, e/ou necrose das células endoteliais (9/36 ou 25,0%) associadas a INs anfofílicas no núcleo de células endoteliais (10/36 ou 27,8%). Nos linfonodos havia dilatação dos seios subcapsulares e medulares, com hiperplasia de células reticuloendoteliais, intensa eritrofagocitose, presença de grande quantidade de eritrócitos e infiltrado inflamatório misto. Em 11 (47,8%) desses casos foram observadas INs em células endoteliais. Em dois casos havia glomerulonefrite aguda, mas INs desacompanhadas de outras alterações histológicas foram observadas no tufo glomerular de 50% dos rins examinados. No baço e nas tonsilas as inclusões ocorriam também em células endoteliais em 10,0% e 25,0% dos casos em que esses órgãos foram avaliados.

DISCUSSÃO

A forma fatal da hepatite infecciosa canina (HIC) é uma condição pouco comum, pois ocorreu em apenas 1,2% dos 5.361 cães necropsiados num período de 43 anos (1964-2006). Num

estudo que utilizou 817 amostras de soro de cães não-vacinados de Santa Maria, RS, 43% foram positivas para adenovírus canino (CAV) (Dezengrini et al. 2007). Embora o estudo não diferencie claramente entre as infecções por CAV-1 (Hepatite infecciosa canina) e CAV-2 (doença respiratória), é provável que a infecção por CAV-1, em nosso meio, seja muito mais freqüente que a doença clínica. Em geral, estima-se que apenas entre 12% (Parry 1950) e 25% (Kelly 1993) dos cães afetados morram, e que os restantes desenvolvam doença subclínica ou leve e se recuperem, mantendo níveis séricos de anticorpos.

A HIC demonstrou ser uma doença principalmente de animais jovens (até 2 anos) - o que é, em geral, reconhecido pela maioria dos autores (Larin 1953, Hodgman & Larin 1953, Swango 1997, Kelly 1993, Greene 2006) - embora em 5 dos 62 casos deste estudo, as idades fossem 3-8 anos. A doença tem um curso clínico em geral agudo ou superagudo e, menos freqüentemente, subagudo (até 15 dias), mas não foram observadas diferenças histológicas no fígado de cães que sucumbiram à HIC com evolução clínica superaguda, aguda ou subaguda. Na fase superaguda, alguns animais foram descritos como tendo "morte súbita", o que torna impossível a intervenção terapêutica e difícil o diagnóstico clínico nesses casos. Embora os sinais clínicos de HIC sejam pouco específicos e muitas vezes difíceis de serem observados devido ao curso superagudo, os achados de necropsia são suficientemente específicos para permitir um diagnóstico presuntivo razoavelmente acurado, quando associados à epidemiologia e aos sinais clínicos (Smith 1951, Swango 1997). O clínico deve suspeitar de HIC quando um cão com dois anos ou menos apresentar morte superaguda ou aguda (curso clínico com duração de algumas horas a sete dias) com sinais como dor abdominal, distúrbios neurológicos e hemorragias na pele e mucosas. Achados de necropsia como líquido sanguinolento com fibrina e coágulos de sangue na cavidade abdominal; linfonodos aumentados de volume, edematosos e hemorrágicos; edema da vesícula biliar e hemorragias disseminadas são evidências adicionais para o fortalecimento de um diagnóstico presuntivo.

Icterícia não é um achado freqüente na HIC (ocorreu em apenas 6 [13,3%] dos cães com HIC neste estudo) e era de intensidade leve. Achados semelhantes têm sido descritos (Parry 1950, Parry & Larin 1951, Hodgman & Larin 1953, Swango 1997, Kelly 1993). Assim, HIC não deve ser considerada como um diagnóstico provável em um cão com icterícia acentuada. A correlação errônea entre icterícia e hepatite infecciosa canina originou-se, provavelmente, do fato desse sinal clínico ser freqüente na hepatite infecciosa de pessoas, uma doença não relacionada à HIC.

O aspecto granular da serosa como o descrito em três cães com HIC neste estudo é geralmente interpretado como achado de necropsia característico de parvovirose. No entanto, essa alteração tem sido muitas vezes descrita associada à HIC por outros autores (Kelly 1993) e não deve ser interpretada como lesão exclusiva de parvovirose. Essa lesão tem sido explicada como resultante de reação de linfáticos superficiais da serosa (King & Lee 1983).

O critério de diagnóstico para HIC neste estudo foi a presença de inclusões intranucleares (INs) nos hepatócitos. A conclusão de que esse deve ser o critério definitivo para diagnóstico de HIC é reforçada pelo fato de que em um estudo retrospectivo com marcação imunoistoquímica no fígado de cães com diagnóstico de HIC, o único caso negativo foi o que havia sido diagnosticado na hematoxilina e eosina pela "presença de lesões típicas de HIC", mas, sem as INs características (Rakich et al. 1986). Essas inclusões têm sido descritas em um grande número de células além de hepatócitos e o tipo de célula que desenvolve a inclusão parece estar relacionado à via de inoculação (Kelly 1993). Elas ocorrem em células endoteliais e reticuloendoteliais (Kelly 1993, Cullen 2007). Neste estudo, os órgãos que apresentaram INs características da infecção por CAV-1 foram, em ordem decrescente de freqüência, fígado, rim, encéfalo, tonsilas, linfonodos e baço. É interessante lembrar que nos hepatócitos de cães ocorrem INs inespecíficas (Innes 1949) que têm sido confundidas com as inclusões de HIC (Smith 1951). As INs inespecíficas são fortemente acidofílicas, poliédricas e ocorrem em cães de meia-idade ou idosos e sem as outras alterações associadas à HIC (Innes 1949, Kelly 1993, Cullen 2007).

A ocorrência das hemorragias, inclusive no encéfalo, que é uma característica da doença, deve-se provavelmente a mais de um fator, mas tem como base patogênica o tropismo do vírus pelos endotélios, parênquima hepático (hepatócitos) e mesotélios (Kelly 1993, Greene 2006). Originalmente era aceito que a tendência disseminada à hemorragia devia-se à lesão direta ao endotélio (Kelly 1993) associada à incapacidade do fígado (lesão hepatocelular) em sintetizar os fatores da coagulação. Embora provavelmente isso tenha alguma participação, acredita-se que a coagulação intravascular disseminada (CID) seja o evento central na patogênese das lesões hemorrágicas (Cheville 2006). A maioria dos casos de CID nas doenças virais resulta da liberação de fatores procoagulantes do tecido necrótico. A perda do endotélio induzida pelo vírus expõe a matriz subendotelial ao ataque das plaquetas e as células endoteliais degeneradas são fonte de tromboplastina tecidual e de outros fatores procoagulantes. Defeitos da hemostasia que ocorrem na hepatite infecciosa canina incluem trombocitopenia, trombocitopatia, tempo de protrombina prolongado, atividade diminuída do fator VIII e aumento dos produtos de degradação de fibrina. O número reduzido de plaquetas reflete tanto o aumento no consumo (para reparar a lesão endotelial induzida pelo vírus) quanto dano direto causado pelo vírus nas plaquetas. Em consequência da lesão endotelial disseminada produzida pelo vírus, ocorre consumo excessivo de fatores da coagulação, o que favorece as hemorragias (Kelly 1993, Cheville 2006).

Embora seja geralmente aceito que os casos não-fatais de HIC apresentem recuperação total, estudos experimentais (Gocke et al. 1967, 1970) sugerem que cães recuperados podem apresentar lesão crônica de HIC. Em alguns estudos de lesões crônicas (fibrose hepática) espontâneas do fígado em cães, observou-se, por imunoistoquímica, a presença de antígenos de CAV-1 (Rakich et al. 1986). Alguns autores (Gocke et al. 1970, Rakich et al. 1986) sugerem, em razão disso, uma

participação do CAV-1 na gênese de lesões hepáticas crônicas em cães, como fibrose hepática e hepatite crônico-ativa, mas isso, em geral, não é aceito pela maioria dos pesquisadores.

O edema da córnea tem desenvolvimento tardio em casos de cães afetados por HIC e ocorre em animais convalescentes, usualmente entre 14-21 dias após a infecção. Resulta de edema inflamatório na íris, no aparelho ciliar, na própria da córnea e de abundante infiltrado inflamatório no ângulo de filtração (Carmichael 1964, 1965). Há evidências que a lesão ocular seja uma reação de hipersensibilidade tipo III (Kelly 1993). Em nenhum dos 42 cães com HIC deste estudo observou-se essa lesão, talvez pela evolução superaguda ou aguda da maioria dos casos.

REFERÊNCIAS

- Carmichael L.E. 1964. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis I. Pathology and virological observations. *Pathol. Vet.* 1:73-95.
- Carmichael L.E. 1965. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis II. Experimental ocular hypersensitivity produced by the virus. *Pathol. Vet.* 2:344-359.
- Cheville N.F. 2006. Introduction to Veterinary Pathology. 3rd ed. Blackwell, Ames. 370p.
- Cullen J.M. 2007. Liver, biliary system and exocrine pancreas, p.393-461. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis. 1476p.
- Dezengrini R., Weiblen R. & Flores E.R. 2007. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 37:183-189
- Gocke D.J., Morris T.Q. & Bradley S.R. 1970. Chronic hepatitis in the dog: the role of immune factors. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156:1700-1705.
- Gocke D.J., Preisig R., Morris T.Q., McKay D.G. & Bradley S.E. 1967. Experimental viral hepatitis in the dog. Production of persistent disease in partially immune animals. *J. Clin. Invest.* 46:1506-1517.
- Goldston R.T. & Hoskins J.D. 1999. Geriatria e Gerontologia em Cães e Gatos. Roca, São Paulo. 551p.
- Greene C.E. 2006. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis, p.41-47. In: Idem (ed.), *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 1387p.
- Hodgman S.F.J. & Larin N.M. 1953. Diagnosis of canine virus hepatitis (Rubarth's disease). *Vet. Rec.* 65:447-450.
- Hoskins J.D. 1993. *Pediatria Veterinária*. Manole, São Paulo. 605p.
- Innes J.R.M. & Saunders L.Z. 1962. *Comparative Neuropathology*. Academic Press, New York. 839p.
- Innes J.R.M. 1949. Inclusions and crytalline bodies. *Brit. Vet. J.* 105:99-107.
- Kelly W.R. 1993. The liver and biliary system, p.319-406. In: Jubb K.F.V., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.), *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 4th ed. Academic Press, San Diego. 747p.
- King J.M. & Lee R.C.T. 1983. *An Atlas of General Ppathology*. Pig Research Institute, Taiwan. 376p.
- Larin N.M. 1958. Epidemio1ogica1 studies of canine virus hepatitis (Rubarth's disease). *Vet. Rec.* 70:295-297.
- Parry H.B. & Larin N.M. 1951. The natural history of virus hepatitis of dogs (Rubarth's disease). *Vet. Rec.* 63:833-847.
- Parry H.B. 1950. Viral hepatitis of dogs (Rubarth's disease). 1. Clinical and pathological observations on a spontaneous epidemic. *Vet. Rec.* 62:559-565.
- Pay T.W.F. 1950. Infectious canine hepatitis (*Hepatitis contagiosa canis* [Rubarth]). *Vet. Rec.* 62:551-558.
- Rakich P.M., Prasse K.W., Lukert P.D. & Cornelius L.M. 1986. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. *Vet. Pathol.* 23:478-484.
- Smith D.L.T. 1951. Observations on infectious canine hepatitis. *Am. J. Vet. Res.* 12:38-43.
- Swango L.J. 1997. Moléstias virais caninas, p.573-588. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (ed.), *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. Manole, São Paulo. 3020p.

4. TRABALHO 2

**ASPECTOS IMUNOISTOQUÍMICOS DA HEPATITE
INFECCIOSA CANINA**

**Maria A Inkelmann, Bruno L. Anjos, Glaucia D. Kommers, Rafael A. Fighera e
Claudio S. L. Barros**

SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM CIÊNCIA RURAL

Aspectos imunoistoquímicos da hepatite infecciosa canina

Aspectos imunoistoquímicos da hepatite infecciosa canina

Maria Andréia Inkelmann¹ Bruno Leite dos Anjos¹ Glaucia Denise Kommers²

Rafael Almeida Figuera² Claudio Severo Lombardo de Barros^{2*}

- NOTA -

RESUMO

Tecidos de 27 cães que morreram de hepatite infecciosa canina (HIC) foram avaliados por imunoistoquímica (IHQ) para detecção de antígeno de adenovírus canino tipo 1 (CAV-1) por meio de um anticorpo monoclonal. Os tecidos examinados incluíram fígado, rim, baço, linfonodos, tonsilas, pulmão, intestino delgado, encéfalo e medula óssea. Para cada órgão foram atribuídos graus crescentes (de leve a acentuada) de intensidade de imunomarcção. O antígeno de CAV-1 foi marcado na maioria dos órgãos examinados, principalmente em células endoteliais. Relacionando o tempo de evolução clínica da HIC com a intensidade da imunomarcção, o maior número de casos com evolução clínica hiperaguda ou aguda, coincidiu com a maior intensidade de marcação do antígeno viral.. A IHQ demonstrou ser um teste adequado para a detecção do antígeno de CAV-1 e pode ser usado para o estudo da patogênese da doença.

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. *Autor para correspondência, e-mail: claudioslbarros@uol.com.br

Palavras-chave: *adenovírus canino tipo I, hepatite infecciosa canina, imunoistoquímica, doenças de cães.*

ABSTRACT

Tissues from 27 dogs dead from infectious canine hepatitis (ICH) were evaluated by immunohistochemistry (IHC) for detection of canine adenovirus type 1 (CAV-1) antigen using a monoclonal antibody. Evaluated tissues included liver, kidney, spleen, lymph nodes, tonsils, lungs, small intestine, brain, and spinal cord. For each organ increasing degrees (from mild to marked) of intensity of immune staining were ascribed. CAV-1 was detected in most of evaluated organ, mainly in endothelial cells. Considering the clinical course of ICH and the intensity of IHC staining, cases with acute and hyperacute courses had more marked staining. IHC proved to be a reliable test for CAV-1 antigen detection and can be used for pathogenesis studies on ICH.

Palavras chave: *Canine adenovirus 1, infectious canine hepatitis, immunohistochemistry, diseases of dogs.*

A hepatite infecciosa canina (HIC) é uma doença viral de cães e de outras espécies das famílias Canidae e Ursidae, causada por adenovírus canino 1 (CAV-1) pertencente à família Adenoviridae (GREENE, 2006). CAV-1 tem afinidade por células endoteliais e células hepáticas, está presente em tecidos e em fluídos corporais e é excretado pela urina (HODGMAN & LARIN, 1953). A HIC frequentemente tem curso clínico superagudo ou agudo e afeta principalmente cães jovens não-vacinados. Após localização oronasal, CAV-1 replica inicialmente nas tonsilas, passa aos linfonodos regionais e atinge o sangue pelo ducto torácico. A viremia dura 4-8 dias, mas o vírus é liberado na urina por períodos mais

longos. Os sinais clínicos incluem anorexia, apatia, vômito, dor abdominal, diarreia com ou sem sangue (GREENE, 2006). Em alguns casos há sinais neurológicos como incoordenação, convulsões, vocalização e letargia (CAUDELL et al., 2005). A icterícia é incomum ou rara na HIC aguda (INKELMANN et al., 2007), mas pode ser encontrada em alguns cães que sobrevivem a fase fulminante da doença (GREENE, 2006). As lesões macroscópicas incluem petéquias e equimoses disseminadas, líquido serossanguinolento na cavidade abdominal com fibrina, fígado aumentado, com aspecto moteado e recoberto por película de fibrina. As tonsilas estão aumentadas e avermelhadas, e os linfonodos edematosos e hemorrágicos. Frequentemente há edema da parede da vesícula biliar e hemorragias podem ser observadas no encéfalo ao nível do tálamo, mesencéfalo, tronco encefálico e cerebelo (INKELMANN et al., 2007). As alterações histológicas incluem necrose hepática centrolobular a panlobular associadas a inclusões intranucleares basofílicas características que aparecem inicialmente em células de Kupffer e após em hepatócitos viáveis ou degenerados adjacentes a áreas de necrose (GREENE, 2006).

Rotineiramente o diagnóstico de HIC é feito pela associação entre sinais clínicos, lesões macro e microscópicas, porém outros métodos são utilizados para confirmar a presença do CAV-1 nos tecidos, como por exemplo, a imunoistoquímica (IHQ), a técnica reação em cadeia da polimerase (PCR) e o isolamento viral (CHOUINARD et al., 1998; CAUDELL et al., 2005). A imunoistoquímica utiliza anticorpos específicos para detecção da quantidade, distribuição tecidual e localização celular dos epítomos imunogênicos em secções histológicas (HAINES & WEST, 2005).

O objetivo deste estudo foi demonstrar antígeno de CAV-1 em tecidos de cães acometidos por HIC. Em estudo retrospectivo anterior (INKELMANN et al., 2007) a doença foi detectada em 62 cães necropsiados em nosso laboratório. Em apenas 27 desses

casos havia tecidos armazenados em blocos de parafina. Esses 27 casos compuseram os animais deste estudo.

A marcação IHQ foi realizada em secções histológicas de 3 µm. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Na recuperação antigênica utilizou-se a enzima Proteinase K (Dako – cód. S3020)^a por cinco minutos. O anticorpo monoclonal para CAV-1 (VRMD, cód. 2E10-H2)^b a uma diluição de 1:100 foi incubado por uma hora, a 37°C em câmara úmida. O anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina-peroxidase (LSAB - DakoCytomation, cód. K0690)^a, foram incubados consecutivamente por 30 minutos à temperatura ambiente. Tetracloro de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Sigma, cód. D-5637)^c foi usado como cromógeno. A contracoloração foi realizada pela hematoxilina de Harris e a montagem entre lâmina e lamínula, com meio sintético. Quanto à intensidade, a imunomarcação, nos órgãos examinados foi classificada como leve, quando algumas poucas células foram marcadas; como moderada, quando uma quantidade média (entre 30 e 60%) das células foi marcada e acentuada, quando grande quantidade de células foi marcada (Tabela 1). A imunomarcação ocorria em intensidades variáveis no núcleo e citoplasma de células endoteliais, hepatócitos e células de Kupffer. A marcação podia preencher todo o núcleo ou ocorrer ao redor de inclusões com centros não-marcados (Figura 1A). No citoplasma a marcação tinha aspecto finamente granular em hepatócitos e de forma difusa em células endoteliais e de Kupffer (Figura 1B). Interessantemente, algumas inclusões virais não foram marcadas. Algo semelhante foi observado no fígado de cães com HIC em outros estudos imunoistoquímicos (RAKICH et al. 1986, CHOUINARD et al. 1998) e isso explicado pela inclusão ser formada por partículas virais, mas também por proteínas que formam uma matriz amorfa presente em quantidades variáveis antigenicamente distintas do

vírus (GIVAN & JÉZÉQUEL, 1969; RAKICH et al., 1986). Nos casos com necrose hepática acentuada, a marcação ocorreu em hepatócitos e células de Kupffer viáveis e também nas áreas de necrose (Figura 1C). No rim (Figura 1D) e linfonodos, baço e medula óssea numerosas células reticuloendoteliais apresentavam grande quantidade de antígeno viral. Baço (Figura 1E) e medula óssea apresentaram imunomarcaçã acentuada em alguns casos. O antígeno foi detectado no endotélio de vasos do encéfalo (Figura 1F), principalmente em filhotes de até um ano de idade, não-vacinados e que morreram de forma hiperaguda ou aguda. A marcação imunoistoquímica em células endoteliais de vários órgãos confirma a predileção de CAV-1 por células endoteliais e explica as lesões hemorrágicas encontradas na doença espontânea (INKELMANN et al., 2007). Neste estudo, os casos com curso clínico superagudo ou agudo apresentaram maior intensidade de imunomarcaçã (moderada ou acentuada). Achado semelhante foi relatado em outro estudo imunoistoquímico no encéfalo de filhotes de cães com HIC (CAUDELL et al., 2005). Já os casos estudados que apresentaram imunomarcaçã leve tiveram curso clínico mais longo.

A imunoistoquímica é eficaz na demonstraçã da distribuiçã do antígeno viral em tecidos de cães com HIC. A imunomarcaçã do CAV-1 nos diversos tecidos demonstra a disseminaçã do vírus pelo organismo, principalmente afetando às células endoteliais. A correlaçã entre a intensidade de imunomarcaçã e o tempo de evoluçã clínica demonstrou grande quantidade de antígeno viral nos casos hiperagudos e agudos.

FONTES DE AQUISIÇãO

^aDakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, Estados Unidos.

^bVRMD, Inc., Pullman, Estados Unidos.

^cSigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

REFERÊNCIAS

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

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

GIVAN, K.F. & JÉZÉQUEL, A. Infectious canine hepatitis: a virologic and ultrastructural study. **Laboratory Investigation**, v.20, n.1, p.36-45. 1969.

GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: _____. **Infectious disease of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia : Saunders-Elsevier, 2006. cap.8, p.41-47.

HAINES D.M., WEST K.H. Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.108, p.151-156, 2005.

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

RAKICH, P.M. et al. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. **Veterinary Pathology**, n.23, p.478-484, 1986.

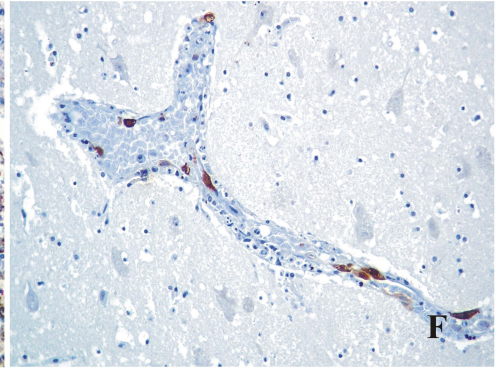
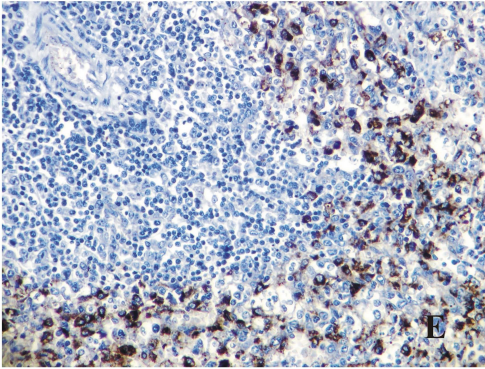
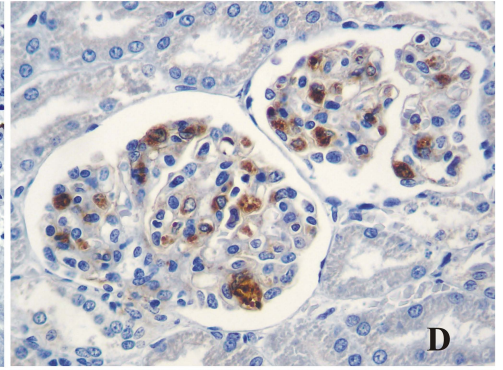
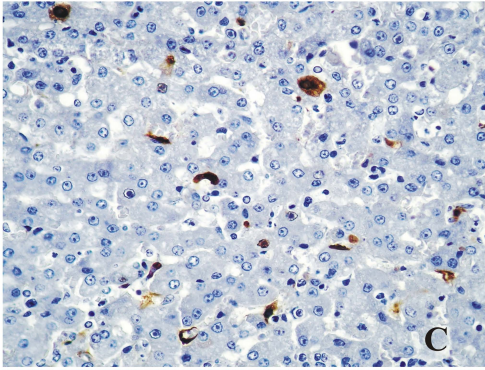
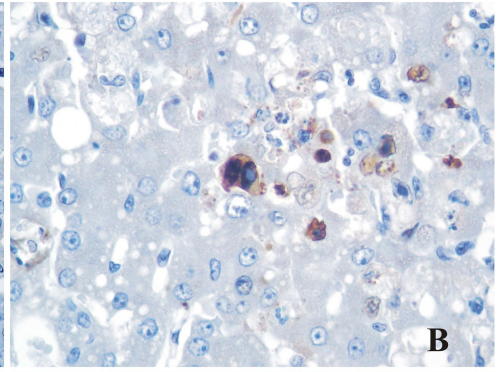
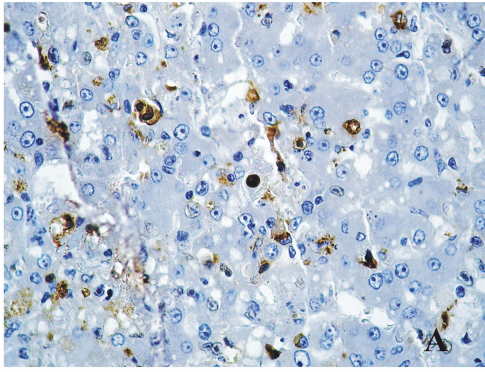
Tabela 1. Intensidade de marcação imunoistoquímica para antígeno de CAV-1 por órgão/sistema em 27 cães com hepatite infecciosa canina.

Cão	Órgão											
	Baço	Bexiga	SNC	Coração	Estômago	Fígado	Int.delgado	Linfonodo	Med.óssea	Pulmão	Rim	Tonsila
1 (19d)	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr	-	nr
2 (7d)	+	nr	+	++	nr	++	nr	+	nr	nr	+	nr
3 (3d)	nr	nr	+	nr	nr	++	+++	+	nr	nr	+	++
4 (10d)	+	nr	nr	nr	+	+	++	+	nr	+	+	+
5 (ND)	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr
6 (3d)	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr	-	nr
7 (4d)	nr	++	+	nr	nr	++	++	nr	nr	++	+	nr
8 (10d)	nr	nr	+	nr	++	+	++	++	nr	++	+	nr
9 (ND)	-	nr	-	nr	nr	+	nr	nr	nr	+	+	nr
10 (MS)	-	nr	+	++	+	-	nr	nr	nr	+	+	nr
11 (ND)	nr	nr	nr	+	nr	++	nr	nr	nr	+	+	nr
12 (2d)	nr	nr	nr	nr	nr	-	+	nr	nr	+		nr
13 (3d)	nr	nr	++	nr	++	++	nr	nr	nr	++	++	nr
14 (18h)	nr	nr	++	nr	nr	++	++	nr	nr	+	+	+
15 (ND)	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr
16 (4d)	nr	nr	+	nr	nr	+	+++	nr	nr	nr	+	nr
17 (2d)	+	nr	+++	++	++	++	nr	+++	nr	+	+	nr
18 (3d)	nr	nr	nr	++	++	nr	++	nr	nr	+	+	++
19 (MS)	nr	nr	++	+++	nr	+++	nr	nr	+	nr	nr	nr
20 (6h)	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++
21 (6h)	+	nr	nr	++	+	nr	nr	nr	nr	+	+	++
22 (MS)	nr	+	++	nr	nr	+	nr	++	nr	nr	+	nr
23 (ND)	+++	nr	nr	+	nr	++	nr	nr	nr	nr	++	nr
24 (12h)	nr	++	++	nr	nr	++	+	++	nr	+	++	nr
25 (12h)	++	nr	++	++	nr	++	nr	nr	nr	nr	nr	nr
26 (12h)	nr	nr	++	nr	nr	++	++	++	nr	nr	++	nr
27 (5d)	nr	nr	++	+++	nr	+++	+	+++	nr	nr	+++	nr

O dado entre parênteses depois do número do cão indica a evolução em dias (d), horas (h) ou morte súbita (MS). ND = não determinado. Os graus de intensidade de marcação incluem - (negativo), + (leve), ++ (moderado) e +++ (acentuado); nr = não realizado; SNC = sistema nervoso central.

LEGENDA PARA A FIGURA 1.

Figura 1. Aspectos imunoistoquímicos da hepatite infecciosa canina. Método da estreptoavidina-biotina-peroxidase (contra-coloração com Hematoxilina de Harris). **A.** Fígado. Marcação antigênica preenchendo todo o núcleo de hepatócitos. Obj. 40. **B.** Fígado. A marcação antigênica aparece ao redor de inclusões com centros não marcados. Obj. 40. **C.** Fígado. Marcação imunoistoquímica de aspecto finamente granular no citoplasma de hepatócitos (parte superior direita da foto) e de forma difusa em células de Kupffer. Obj. 40. **D.** Marcação imunoistoquímica nas células endoteliais dos tufo glomerulares. Obj. 40. **E.** Marcação imunoistoquímica nas células reticuloendoteliais do baço. Obj. 20. **F.** Vaso do encéfalo mostrando marcação antigênica exclusivamente nas células endoteliais. Obj. 20.



5. DISCUSSÃO

A forma fatal da hepatite infecciosa canina (HIC) é uma condição pouco comum, pois ocorreu em apenas 1,2% dos 5.361 cães necropsiados num período de 43 anos (1964-2006). A HIC demonstrou ser uma doença principalmente de animais jovens (até dois anos), o que é, em geral, reconhecido pela maioria dos autores (LARIN, 1953; HODGMAN & LARIN, 1953; SWANGO 1997; GREENE 2006), embora em cinco dos 62 casos deste estudo, as idades fossem 3-8 anos.

Os sinais de HIC incluíram anorexia, apatia, diarreia, freqüentemente com sangue, sinais neurológicos, vômito, petéquias e equimoses nas membranas mucosas e/ou pele, hipotermia, dor abdominal, icterícia, aumento de volume e congestão das tonsilas, febre e ascite. Apesar de inespecíficos, quando considerados junto com epidemiologia e as lesões de necropsia, os sinais são bastante sugestivos de HIC.

A doença tem um curso clínico em geral agudo ou superagudo e, menos freqüentemente, subagudo (até 15 dias), mas não foram observadas diferenças morfológicas no fígado de cães que sucumbiram à HIC com evolução clínica superaguda, aguda ou subaguda. Em relação aos aspectos imunoistoquímicos (IHQ), no entanto, observou-se diferença na intensidade da imunomarcação, pois cães que sucumbiram à doença com a evolução clínica superaguda e aguda apresentaram graus moderado e acentuado de marcação antigênica e aqueles que tiveram curso clínico subagudo apresentaram grau leve ou moderado. Achados semelhantes foram observados em outro estudo de IHQ no encéfalo de filhotes com HIC (CAUDELL et al 2005).

A imunomarcação do antígeno viral observada nos diversos tecidos demonstra a disseminação do vírus pelo organismo, principalmente afetando às células endoteliais, o que se correlaciona com a lesão vascular causada pelo vírus e as conseqüentes hemorragias observadas clinicamente ou na histopatologia. Cães que morreram de HIC com sinais clínicos neurológicos e apresentaram lesões hemorrágicas no encéfalo demonstraram acentuada marcação do antígeno de CAV-1 nos vasos do sistema nervoso central, neste e em outros estudos que usaram IHQ (CAUDELL et al 2005).

6. CONCLUSÕES

- A hepatite infecciosa canina (HIC) tem baixa prevalência e afeta principalmente cães jovens de até dois anos de idade.
- A HIC tem curso clínico freqüentemente agudo ou superagudo.
- Necrose hepatocelular aleatória ou centrolobular e hemorragias associadas às lesões endoteliais são os principais achados anatomopatológicos.
- Adenovírus canino tipo-1 tem tropismo por hepatócitos, células endoteliais e reticulo endoteliais.
- A distribuição do antígeno viral na HIC é principalmente no núcleo e citoplasma de células endoteliais, hepatócitos e células de Kupffer.
- A concentração antigênica na HIC é mais acentuada nos casos com curso clínico superagudo e agudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLET, R.E.; BAKER, L.A. The development in the dog of naturally acquired antibody to canine hepatitis in relation to age. **Veterinary Record**, London, v.72, n.51, p.1202, December, 1960.

AMUNDSON, T.E.; YUILL, T.M. Prevalence of selected pathogenic microbial agents in the red fox (*Vulpes fulva*) and gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) of southwestern Wisconsin. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v.17, n.1, p.17-22, January, 1981.

CARMICHAEL, L.E. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis. 1. Pathology and virological observations. **Pathologia Veterinaria**, Switzerland, v.1, n.1, p.73-95, January, 1964.

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

CHOUINARD, L. et al. Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis or cirrhosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Athens, v.10, n.4, p.320-325, October, 1998.

CORDÓN, P. J. et al. Glomerulonephritis associated with simultaneous canine adenovirus-1 and *Dirofilaria immitis* infection in a dog. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, Berlin, v.49, n.5, p.235-239, June, 2001.

CORNWELL, H.J.C.; WRIGHT, N.O. The pathology of experimental infectious canine hepatitis in neonatal puppies. **Research in Veterinary Science**, London, v.10, n.2, p.156-160, March, 1969.

CULLEN, J. M. Liver, biliary system and exocrine pancreas. In: McGavin, M. D.; Zachary, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**, 4th ed. St Louis : Mosby-Elsevier, 2007. cap. 8. p. 393-461.

DECARO, N. et al. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. **Research in Veterinary Science**, London, v.83, n2, p.269 – 273, January, 2007.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Soroprevalência das infecções por

parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.183-189, Janeiro-Fevereiro, 2007.

GOCKE D.J. et al. Experimental viral hepatitis in the dog: the production of persistent disease in partially immune animals. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.46, n.9, p.1506-1517, September, 1967.

GIVAN, K.F.; JÉZÉQUEL, A. Infectious canine hepatitis: a virologic and ultrastructural study. **Laboratory Investigation**, New York, v.20, n.1, p.36-45, January, 1969.

GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: _____. **Infectious disease of the dog and cat**, 3th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006. cap.8, p.41-47.

HERVÁS, J. et al. Focal mesangial-sclerosing glomerulonephritis and acute-spontaneous infectious canine hepatitis: structural, immunohistochemical and subcellular studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.57, n.1-2, p.25-32, June, 1997.

HODGMAN, S. F. J.; LARIN, N. M. Diagnosis of canine virus hepatitis (Rubarth's disease). **Veterinary Record**, London, v.65, n.29, p.447-450, July, 1953.

INNES, J. R. M.; SAUNDERS, L. Z. **Comparative Neuropathology**, New York, Academic Press, 1962. 839p.

JAMISON, R.K. et al. Survey for antibodies to canine viruses in selected wild mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v. 9, n.1, p.2-3, January, 1973.

JONES, T.C. et al. Moléstias causadas por agentes virais. In:_____ **Patologia Veterinária**, 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. cap.8, p.249-253.

KISS, I. et al. Infectious canine hepatitis: detection of canine adenovirus type 1 by polymerase chain reaction. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.44, n.2, p.253-258, April, 1996.

KOBAYASHI, Y.K.; ITAKURA, C. Dual infection with canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus (canine adenovirus type 1) in a dog. **Journal of Veterinay Medical Science**, Tokyo, v.55, n.4, p.699-701, August, 1993.

KOPTOPOULOS, G.; CORNWELL, H.J.C. Canine adenovirus: a review. **The Veterinary Bulletin**, Wallingford, v.51, n.3, p.135-141, March, 1981.

LARIN, N.M. Epidemiological studies of canine virus hepatitis (Rubarth's disease). **Veterinary Record**, London, v.70, n.14, p.295-297, April, 1958.

PARK, N.Y. et al. Canine adenovirus type 1 infection of a eurasian river otter (*Lutra lutra*), **Veterinary Pathology**, Madison, v.44, n.4, 536-539, July, 2007.

PARRY, H.B. Viral hepatitis of dogs (Rubarth's disease) 1. Clinical and pathological observations on a spontaneous epidemic. **Veterinary Record**, London, v.62, n.38, p.559-565, September, 1950.

PAY, T.W.F. Infectious canine hepatitis (Hepatitis contagiosa canis [Rubarth]). **Veterinary Record**, London, v.62, n.38, p.551-558, September, 1950.

PURSELL, A.R. et al. Isolation of an adenovirus from black bear cubs. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v.3, n.19, p.269-271, July, 1983.

PRATELLI, A. et al. Severe enteric in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. **Journal Veterinary Medicine B. Infectious diseases and veterinary public health**, Berlin, v.48, n.5, p.385-392, June, 2001.

QUINN P.J. et al. Adenoviridae. In: _____ **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**, Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 56, p. 323-326.

RAKICH, P.M. et al. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. **Veterinary Pathology**, Madison, v.23, n.4, p.478-484, July, 1986.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v.42, n.4, p.405-426, July, 2005.

SMITH, D.L.T. Observations on infectious canine hepatitis. **American Journal of Veterinary Research**, Oakland, v.12, n.1, p.38-43, January, 1951.

STALKER, M.J.; HAYES, M.A. The liver and biliary system In: JUBB, K.F.V., et al.

Pathology of Domestic Animals. 5th ed., San Diego: Academic Press, 2007. v.2, cap.8, p.348-351.

STEPHENSON, R.O. et. al. Serologic survey for canine distemper and infectious canine hepatitis in wolves in Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v.18, n.4, p.419-424, October, 1982.

SWANGO, L.J. Infectious canine hepatitis and Viral tracheobronchitis. In: Castro A.E. & Heuschele W. P. **Veterinary Diagnostic Virology.** A practitioner's guide. St. Louis, Ed. Mosby Year Book, 1992. cap.47, p.143-146.

SWANGO 1997. Moléstias virais caninas in: Ettinger S. J. & Feldman E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** 4. ed., v.1, ed. Manole, São Paulo. cap.69.

WARD, F.P.; FAIRCHILD, D.G.; VUICICH, J.V. Inclusion body hepatitis in a prairie falcon. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v.7, n.2, p.120-124, April, 1971.

WHETSTONE, C. A. et al. Characterization of canine adenovirus type 1 isolated from american black bears. **American Journal Veterinary Research**, Oakland, v.49, n.6. p.778-780, June, 1988.

WIGTON et al. Infectious canine hepatitis: animal model for viral-induced disseminated intravascular coagulation. **Blood**, Washington, v.47, n.2, p.287-296, February, 1976.

WOODS, L. W. et al. Lesions and transmission of experimental adenovirus hemorrhagic disease in black-tailed deer fawns. **Veterinary Pathology**, Madison, v.36, n.2, p.100-110, March, 1999.

ZARNKE, R.L.; BALLARD, W.B. Serologic survey for selected microbial pathogens of wolves in Alaska, 1975-1982. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v.23, n.1, p.77-85, January, 1987.

ZARNKE, R.L.; EVANS, M.B. Serologic survey for infectious canine hepatitis virus in Grizzly bears (*Ursus Arctos*) from Alaska, 1973 to 1987. **Journal of Wildlife Diseases**, Laurence, v.25, n.4, p.568-573, October, 1989.