



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DÉBORA ALVES DE CARVALHO FREIRE

**ABORTAMENTO E MORTE FETAL EM CADELAS COM ANEMIA DE ORIGEM
INFECCIOSA**

MOSSORÓ-RN
2016

DÉBORA ALVES DE CARVALHO FREIRE

**ABORTAMENTO E MORTE FETAL EM CADELAS COM ANEMIA DE ORIGEM
INFECCIOSA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido -UFERSA, como exigência final para
obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula
Antunes- UFERSA

MOSSORÓ-RN
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

F866a Freire, Débora Alves de Carvalho.
Abortamento e morte fetal em cadelas com
anemia de origem infecciosa / Débora Alves de
Carvalho Freire. - 2016.
49f. : il.

Orientador: João Marcelo Azevedo de Paula
Antunes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2016.

1. falhas reprodutivas. 2. Anaplasma. 3.
Ehrlichia. 4. Leishmania. 5. Parvovirus. I.
Antunes, João Marcelo Azevedo de Paula, orient.
II. Título.

DÉBORA ALVES DE CARVALHO FREIRE

**ABORTAMENTO E MORTE FETAL EM CADELAS COM ANEMIA DE
ORIGEM INFECCIOSA**

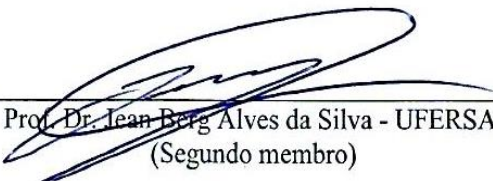
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido -UFERSA, como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aprovação em 21 de março de 2016

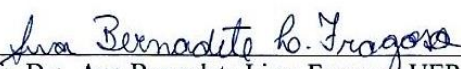
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes - UFERSA
(Orientador Presidente)



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva - UFERSA
(Segundo membro)



Prof. Dra. Ana Bernadete Lima Fragoso - UERN
(Terceiro membro)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DÉBORA ALVES DE CARVALHO FREIRE, filha de Carlos Antônio Rodrigues de Carvalho Freire e Kylsse Alves de Carvalho Freire, nasceu em 10 de outubro de 1989, na cidade de Santa Cruz/RN. Iniciou o ensino superior em março de 2010, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde graduou-se em Biotecnologia, concluindo em março de 2014. Durante a graduação realizou estágio voluntário e iniciação científica, sendo bolsista PIVIC (agosto/2012 a julho/2013) e PIBIC (agosto/2013 a abril/2014) no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal- LIPOA, com ênfase em microbiologia de alimentos. Ingressou em abril de 2014 no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) tendo como linha de pesquisa sanidade animal. Foi bolsista CAPES durante o período de novembro/2014 até abril/2016.

A Deus e a minha família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a razão de tudo e nunca me deixar só. Por me dar sabedoria, tranquilidade e forças para concluir mais uma etapa. Obrigada pela presença de todos os dias.

Ao meu orientador Profº. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, por ser exemplo de profissional e competência sem perder a humildade. Te admiro bastante. Obrigada pelo acolhimento, ensinamento, pela oportunidade, confiança, paciência, compreensão, e disponibilidade. Serei eternamente grata por tudo.

A minha família, pelas orações e incentivo para que eu pudesse trilhar mais uma etapa distante de casa. Vocês são um dos motivos para que eu chegasse até aqui.

A minha irmã Milena Alves da Silva pelo ombro amigo sempre presente. E pelas palavras de ânimo nos momentos difíceis.

A Ilanna Vanessa Prito de Medeiros Oliveira por ser braço direito na jornada de orientada. E por sempre estar disposta a ajudar. Agradeço de coração por tudo.

Ao Profº Dr. Raimundo Alves Barreto Junior e ao Laboratório de Medicina Veterinária Interno pela disponibilidade de espaço, equipamentos e materiais.

A Profª Dra. Cecília Calabuig pela grande ajuda na estatística, pela paciência e dicas.

Ao Laboratório de Patologia, em especial ao Simão e aos patologistas Ismael Lira Borges e Telma de Sousa Lima.

Aos professores da Unesp-Botucatu, Jane Megid, João Pessoa Araújo Junior e Hélio Langoni, que disponibilizaram tempo, espaço e meios para a realização desse trabalho. Em especial aos discentes/técnicos, Vanessa Cristina, Clóvis Reynaldo, Jacqueline Kazue, Leila Sabrina e Samea Fernandes.

Ao Profº Dr. Jean Berg Alves da Silva por aceitar fazer parte dessa banca. Pelo apoio durante toda a vida acadêmica e por contribuir no meu crescimento. Obrigada por estar sempre presente e disposto a ajudar no que estivesse ao seu alcance.

Aos Professores, Dra. Ana Bernadete Fragoso, Dra. Lidianne Leal Rocha, Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto por aceitarem prontamente participar da banca.

A todos do HOVET que me ajudaram direta ou indiretamente nesse trabalho. Em especial aos professores, técnicos, residentes e a todos do laboratório de bioquímica.

A todos os professores que contribuíram transferindo parte do conhecimento e me motivaram de alguma forma para chegar até aqui.

Aos meus amigos e família em Mossoró, Carla Campêlo, Carlos Silveira, Emanuela Alves, Emerson Medeiros, Érika Cristina, Joelma Martins, Magda Lorena, Mário Luan, Mirna Alves e Rociene Abrantes pelas dicas no trabalho, motivação, almoços e amizade.

Aos amigos em Natal que torceram, se preocuparam e esperaram ansiosamente meu retorno. Em especial a família Plenitude que sempre ora por mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, por permitir e dar suporte para o crescimento científico dos alunos.

A todos os profissionais e laboratórios da Ufersa que diretamente ou indiretamente contribuíram nesse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o período do mestrado.

Muito obrigada!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

ABORTAMENTO E MORTE FETAL EM CADELAS COM ANEMIA DE ORIGEM INFECCIOSA

FREIRE, Débora Alves de Carvalho. Abortamento e morte fetal em cadelas com anemia de origem infecciosa. 2016. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2016. (Dissertação)

RESUMO: Doenças infecciosas são consideradas as maiores causas de falhas reprodutivas, abortamento e morte fetal em cadelas. Dessa maneira, o estudo teve como objetivo identificar os principais agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas (natimortalidade, abortamento e morte fetal) em cadelas. Foram coletadas amostras de 36 cadelas, 20 com problemas reprodutivos e 16 sem problemas reprodutivos. Para o animal ser incluído no estudo o proprietário teve que declarar que o animal não possuía problemas relacionados com: genética, traumáticos, hormonais, nutricionais, uso de anticoncepcional ou maternos na gestação atual. Além disso, foram recolhidos histórico, ficha clínica e de acompanhamento desses animais. Para tanto, foi realizado hemograma e bioquímica sérica, ultrassonografia abdominal para avaliar a viabilidade fetal e foram coletados sangue e soro materno, placenta, humores e tecidos fetais. Em seguida foram realizados testes moleculares e de imunodiagnósticos quanto a presença de diferentes micro-organismos relatados como causadores de falhas reprodutivas. Na PCR todas as amostras maternas e fetais foram negativas quanto a presença de *Canid herpes virus 1*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. e *Brucella canis*. Sendo uma das amostras maternas positiva para *Leishmania* spp., e duas cadelas foram positivas para *Canine parvovirus*. *Ehrlichia canis* foi encontrado em seis amostras de sangue de cadelas, enquanto o *Anaplasma platys* foi encontrado em três amostras de sangue. Houve co-infecções de *A. platys* e *E. canis* em quatro fêmeas. A morte fetal e abortos foram associadas estatisticamente a presença de anemia, que pode ter acarretado em problemas gestacionais devido a forma sistêmica das infecções.

Palavras-chave: falhas reprodutivas, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, *Parvovirus*.

ABORTION AND FETAL DEATH IN FEMALE DOGS WITH INFECTIOUS ANEMIA

FREIRE, Débora Alves de Carvalho. Abortion and fetal death in female dogs with infectious anemia. 2016. 49f. Dissertation (Master's Science degree in Animal Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2016. (Dissertation)

ABSTRACT: Infectious diseases are often the greatest cause of reproductive failures (RF), abortion, stillbirth and fetal death in female dogs. Therefore, this study aimed to identify the main infectious agents, which cause RF (stillbirth, abortion and fetal death) in bitches. It was collected samples from 36 bitches, 20 with reproductive problems and 16 without reproductive problems. In order to be included in the study the owner had to declare that the animal had no issues related with: genetic, traumatic, hormonal, nutritional, use of contraceptive or losses of pregnancy. In addition, the medical history, clinical file and follow-up notes of these animals were gathered. For such, we performed blood tests and serum biochemistry, abdominal ultrasound to evaluate fetal viability/gestational age, and we also collected maternal blood and serum, placenta, and fetal tissues and fluids. These samples then underwent molecular and immunodiagnostic tests for the presence of different microorganisms reported as causing reproductive failures. Through PCR, all maternal and fetal samples were negative for the presence of *Canid herpes virus 1*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. and *Brucella canis*; one animal was positive for *Leishmania* spp., and two were positive for *Canine parvovirus*; *Ehrlichia canis* was found in six blood samples from bitches, while *Anaplasma platys* was found in three blood samples. There was co-infection of *A. platys* and *E. canis* in four female dogs. The fetal death and the abortions were statistically associated with anemia, which may have led to pregnancy problems due to the systemic form of the infection.

Keywords: reproductive failures, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, *Parvovirus*.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - A- Number for erythrocytes to bitches with reproductive failures (no healthy) and without reproductive failures (healthy); A1- Quantification of erythrocytes related to the animal's health condition (corresponding table to figure 1A); B- Number for hemoglobin to bitches with reproductive failures (no healthy) and without reproductive failures (healthy); B1- Quantification of hemoglobin related to the animal's health condition (corresponding table to figure 1B); C- Number for hematocrit to bitches with reproductive failures (no healthy) and without reproductive failures (healthy); C1- Quantification of hematocrit related to the animal's health condition (corresponding table to figure 1C);.....34

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Molecular and serological tests.....	27
Table 2 - Description exam <i>post mortem</i> of maternal / fetal tissues and fetuses and gestational age of each female with reproductive disorders.....	31
Table 3 - Results of molecular tests, CBC and microscopy of bitches with reproductive problems.....	32
Table 4 - Results of serological tests for Brucellosis and for Leishmaniosis of bitches with reproductive problems.....	33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3.	REFERÊNCIAS.....	19
	ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
	ANEXOS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A perda da gravidez pode ser ocasionada por diversos fatores, os quais podem ser divididos de forma abrangente em causas infecciosas e não infecciosas (SCHLAFER, 2008). Considera-se como causas não infecciosas: traumas, fatores genéticos, nutrição deficitária, hipotireoidismo e problemas hormonais. Entre as causas infecciosas estão diversos agentes patogênicos que trazem transtornos ao desenvolvimento fetal (KUSTRITZ, 2005).

Alguns animais podem apresentar sinais clínicos relacionados à perda da prenhez, tais como: diminuição no perímetro abdominal, vômito, diarreia, falta de apetite, apatia, desidratação, febre, secreção vulvar sanguinolenta ou purulenta, esforço abdominal e desconforto. Contudo, em muitos casos, esses sinais são imperceptíveis ou inexistentes, de maneira que a perda da gestação é observada apenas durante exame clínico ou no momento do parto (VERSTEGEN et al., 2008).

As perdas embrionárias são geralmente maiores que as perdas perinatais, mesmo havendo mais mortes entre nascimento e desmame. Os processos de reabsorção, abortamento, retenção e mumificação fetal durante a gestação podem ser decorrências da morte fetal ou embrionária durante a gestação. A maceração fetal pode acontecer quando o abortamento ou parto não ocorreram após a morte fetal. As consequências sobre o desenvolvimento fetal podem ser resultantes da ação de agentes infecciosos ou suas toxinas, ou podem ser indiretas como na presença de placentite. Doenças maternas graves resultando em febre alta (por exemplo, mastite e pneumonia), hipoxia (por exemplo, na anaplasmose e anemia grave) ou endotoxemia podem resultar em abortamento. Todavia, infecções maternas durante a gravidez podem ou não ter impacto no desenvolvimento fetal. E ainda, a infecção pode variar quanto as consequências individualmente em cada feto de uma ninhada (GIVENS; MARLEY, 2008).

Dentre as causas de abortamento viral e morte neonatal em cães, o *Canid herpes virus 1* (CaHV-1) se destaca (DAHLBOM et al., 2009). Tal agente pode levar ao abortamento, morte fetal, reabsorções embrionárias, parto precoce e morte neonatal (RIJSEWIJK et al., 1999; RONSSE et al., 2005). A infecção latente é uma característica comum ao patógeno, de maneira que o diagnóstico se torna difícil já que não há manifestações de sinais clínicos. O vírus pode ser reativado durante a gravidez com excreção viral ativa, quando há redução da imunidade, na presença de fatores de estresse e doenças ou pelo uso de corticosteróides (GREENE, 2012).

A causa bacteriana mais importante na perda da gravidez em cadelas é a *Brucella canis* (PRETZER, 2008). Existem seis espécies de *Brucella*, contudo apenas quatro delas são encontradas em cães. São essas: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* e *B. suis* (GYURANECZ et al., 2011). A *B. canis* é transmitida principalmente por via venérea. Cães assintomáticos podem abrigar esse patógeno por longos intervalos de tempo. Sendo o tempo de exposição inicial para uma bacteremia de aproximadamente três semanas, após esse período o agente pode se instalar nos tecidos genitais proporcionando uma liberação contínua ou recorrente por meses ou até anos. A brucelose canina, para a cadela, pode resultar em infertilidade, dificuldade na gestação, morte embrionária precoce, reabsorção fetal e aborto tardio (HOLLETT, 2006).

O *Neospora caninum* é um protozoário responsável por abortos e mortalidade neonatal, principalmente em bovinos. *N. caninum* pode ser transmitido após o nascimento por ingestão de tecidos contendo taquizoítos/cistos ou através da ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados. Também pode ocorrer a transmissão transplacentária (DUBEY et al., 2007). O cão é hospedeiro definitivo desse parasita que supostamente pode ser transmitido verticalmente para fetos causando morte fetal, mumificação, reabsorção e morte neonatal (GREENE, 2012).

A leishmaniose também pode estar associada a problemas reprodutivos em cadelas, sendo transmitida via transplacentária (BOGGIATTO et al., 2011). Essa zoonose é causada por protozoários membros do gênero *Leishmania* (IKONOMOPOULOS et al., 2003). A Leishmaniose visceral que se trata de uma doença negligenciada, pode ser encontrado no Brasil, em todas as regiões, sendo encontrado mais casos no nordeste (BRASIL, 2006). A cidade de Mossoró situada no estado do Rio Grande do Norte se trata de uma área endêmica para leishmaniose visceral (COSTA et al., 2014).

Canine minute virus (CnMV), ou CPV-1 (*Canine Parvovirus-1*) pode causar doenças graves em neonatos e infecções transplacentárias com reabsorção embrionária (CARMICHAEL et al., 1994). As consequências de infecção pelo CnMV em fêmeas grávidas podem variar de acordo com o momento da infecção durante a gravidez, podendo ocasionar reabsorção embrionária, natimortos e morte neonatal (DECARO et al., 2012). Além disso, esse vírus está associado a problemas respiratórios, cardíacos, enterites em filhotes jovens e abortamentos (CARMICHAEL, 2004).

A erliquiose canina é uma zoonose que vem crescendo mundialmente e é transmitida pelo carrapato (INOKUMA et al., 2001). No Brasil, a erliquiose monocítica canina (EMC) vem ocorrendo em cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em vários estados (LABARTHE et al., 2003, MENESES et al., 2008, WITTER et al., 2013). Meneses et al. (2008), afirma que essa doença pode abranger três fases: aguda, subclínica e crônica. Na fase aguda ocorre a bacteremia, onde o animal apresenta alterações hematológicas mais intensas que resultam em anemia, trombocitopenia e leucopenia. Durante a fase subclínica, observa-se aumento nos títulos de anticorpos e alterações hematológicas mais discretas. Já na fase crônica, percebe-se variação hematológica e sinais clínicos mais severos (MENESES et al., 2008). A anemia e a trombocitopenia são os principais sinais clínicos encontrados em cães infectados com *Ehrlichia canis* no Brasil. Contudo, observa-se que esses cães desenvolvem com mais frequência anemia, podendo ou não desenvolver trombocitopenia (DAGNONE et al., 2003).

O *Anaplasma platys* também tem sido relatado em vários países, inclusive no Brasil (COSTA-JUNIOR et al., 2013; RAMOS et al., 2010). Tal parasita vem sendo encontrado recentemente em associação com *E. canis*, o que pode resultar em problemas clínicos mais graves (ALMAZÁN et al., 2015; HUA et al., 2000; SILVEIRA et al. 2015), inclusive infectando humanos (ARRAGA-ALVARADO et al., 2014). A trombocitopenia pode ser um dos sinais clínicos encontrados durante a infecção aguda, contudo esses sinais podem variar de acordo com a patogenicidade e variações geográficas (HARVEY et al., 1978; LITTLE, 2010).

Para o diagnóstico das doenças relatadas a análise hematológica é imprescindível. De forma geral, o hemograma é o exame de sangue mais requisitado na rotina de um laboratório, pois além de prático e econômico, permite uma maior compreensão do estado clínico do animal. Dessa forma, permite ao veterinário coletar informações necessárias para, em associação a outros sinais clínicos e exames, chegar a um diagnóstico (LOPES et al., 2007). O histórico do animal e o exame físico, por exemplo, são essenciais para a interpretação dos dados hematológicos e também para outros testes laboratoriais (GONZÁLEZ; SILVA, 2008).

Agentes infecciosos podem levar a distúrbios hemolíticos, diminuindo a quantidade de eritrócitos, resultando em anemias hemolíticas infecciosas (FIGHERA, 2007). Anemia durante a gestação pode estar associada à perda ou problemas reprodutivos em camundongos e humanos (BENCAIOVA et al., 2012; HUBBARD et al., 2013). Contudo, estudos sobre o a

influencia de anemia infecciosa sobre o desenvolvimento embrionário em cães, ainda são escassos (ROBERTS, 1986).

Além dos dados hematológicos, é importante a identificação do agente causador de abortamento, morte neonatal e neonatos. Pois, esse conhecimento impede a dispersão de infecções, permite uma ação interventiva clínica adequada e contribui no desenvolvimento de estudos quanto infecções, epidemiologia e medidas profiláticas para contenção de doenças. No entanto, para o diagnóstico, é indispensável a escolha de amostras adequadas, abrangendo principalmente sangue materno, tecidos fetais e placenta. Além disso, o histórico do animal é importante para determinar a causa do abortamento ou morte neonatal (LAMM; NJAA, 2012). O exame *post-mortem* fetal completo da placenta também é importante para o diagnóstico. Apesar de poucas lesões serem patognomônicas, lesões fetais graves podem ser característica de abortamento infeccioso (SCHLAFER, 2008).

No entanto, a disponibilidade do material fetal, muitas vezes é dificultada de acordo com a fase de desenvolvimento do feto, o qual pode apresentar incompleta formação dos órgãos, além de sofrer autólise causada por diversos fatores. Diante disso, trabalhos realizados nesse sentido analisaram conjuntos de órgãos, associando fígado/pulmão e baço/rins (LARSEN et al., 2015).

Para maior compreensão e diagnóstico da doença, todas as informações possíveis de serem coletadas sobre o animal são necessárias, assim como hemogramas e ultrassonografias. De acordo com o sugerido por Lamm; Njaa (2012) podem ser aplicados questionários (ANEXO A) e *check list* (ANEXO B) para investigação das doenças. (LAMM; NJAA, 2012). Os questionários abordam informações sobre o paciente e podem ser respondidos pelos proprietários após aceite do termo de consentimento (ANEXO C).

Contudo, apenas sinais clínicos, hematológicos e necropsia não permitem um diagnóstico definitivo, apesar de encaminharem para as possíveis causas de doença. Portanto, faz-se necessário a utilização de testes mais sensíveis e específicos (MENESES et al., 2008). Nesse sentido, técnicas moleculares tem tornado possível a detecção de DNA e da presença de receptores específicos, auxiliando no diagnóstico clínico. Sendo de comum importância os testes sorológicos por avaliarem a resposta imunitária (DECARO et al., 2010; GALÁN-SÁNCHEZ et al., 2014).

Dentre as técnicas moleculares utilizadas como ferramenta na área veterinária, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) possui vantagens em relação as demais. Esta

permite identificar regiões específicas dos agentes infecciosos em espaço menor de tempo, além de ser um ensaio de alta sensibilidade e especificidade, Todavia, essas técnicas podem ser bastante complexas e trabalhosas sendo utilizadas apenas para uso em investigação (DAGNONE et al., 2009; IKONOMOPOULOS, 2003). A técnica High-resolution Melting (HRM) por exemplo, permite por meio da PCR detectar polimorfismos de nucleotídeos na sequência de DNA através da curva de melting e da temperatura de melting(tm) (HOLYSZ et al., 2014).

Na busca de acrescentar informações sobre características patológicas e diagnóstico das enfermidades já citadas e afim de auxiliar em medidas profiláticas futura, esse trabalho teve como objetivo detectar a presença de possíveis causadores de abortamento e morte neonatal em cadelas/fetos atendidos no Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado – HOVET, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido- UFERSA, Mossoró/RN.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de diferentes micro-organismos em cadelas com histórico de dificuldade durante o parto, abortamento ou morte fetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de *Canid herpes virus 1*, *Brucella* spp., *Neospora caninum*, *Leishmania* spp., *Canine parvovirus*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em sangues e soros maternos, ou tecidos maternos e fetais;
- Identificar alterações hematológicas em cadelas com problemas de abortamento e morte fetal;
- Correlacionar dados hematológicos dos animais com problemas reprodutivos e os sem problemas reprodutivos.

3 REFERÊNCIAS

- ALMAZÁN, C. et al. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. **Ticks And Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 276-283, 2015.
- ARRAGA-ALVARADO, C. M. et al. Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1161-1165, 2014.
- BENCAIOVA, G.; BURKHARDT, T.; BREYMAN, C. Anemia-prevalence and risk factors in pregnancy. **European Journal Of Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 529-533, 2012.
- BOGGIATTO, P. M. et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2011.
- BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- CARMICHAEL, L. E.; SCHLAFFER, D. H.; HASHIMOTO, A. *Minute virus of canine* (MCV, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 165-174, 1994.
- CARMICHAEL, L. **Neonatal Viral Infections of Pups: Canine herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine parvovirus-1)**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2004. Disponível em: <<http://people.upei.ca/lofstedt/public/chromosome.puzzle/images%20for%20chromosomes/private/inactive.sites/ACT.inactive.site/documents/Canine%20herpes.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- COSTA, K. F. de L. et al. Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 607-612, 2014.
- COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 3-4, p. 321-326, 2013.
- DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

_____. Molecular diagnosis of Anaplasmatidae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p.20-25, 2009.

DAHLBOM, M. et al. Seroprevalence of *Canine Herpesvirus-1* and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p.128-131, 2009.

DECARO, N. et al. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of *Canid herpesvirus 1*. **Journal Of Virological Methods**, v. 169, n. 1, p. 176-180, 2010.

DECARO, N.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Viral Reproductive Pathogens of Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p. 583-598, 2012.

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis in Beagle dogs: Clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 158-166, 2007.

FIGHERA, R. A. Anemia hemolítica em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. s264-s266, 2007.

GALÁN-SÁNCHEZ, F. et al. Infecciones víricas. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 49, p. 2885-2892, 2014.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 270-285, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C.; **Patologia Clínica veterinária: texto introdutório**. Texto de apoio ao curso de especialização em análises clínicas veterinárias. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and the cat**. 4. ed. Georgia: Elsevier Saunders, 2012. 49p.

GYURANECZ, M. et al. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 143-147, 2011.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M.; Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182 -188, 1978.

HOLLETT, R. B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 575-587, 2006.

HOLYSZ, M. et al. Application of a high-resolution melting technique for the rapid detection of partial replacement of HCV-1b by HCV-1a after PEG-IFN α /RBV therapy. **Journal Of Applied Genetics**, v. 56, n. 2, p. 271-275, 2014.

HUA, P. et al. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiological Immunology**, v. 44, n. 9, p. 737-739, 2000.

HUBBARD, A. C. et al. Effect of dietary iron on fetal growth in pregnant mice. **Comparative medicine**, v. 63, n. 2, p. 127-135, 2013.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

INOKUMA, H. et al. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 7, p. 815-817, 2001.

KUSTRITZ, M. V. R. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 755-765, 2005

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LAMM, C. G.; NJAA, B. L. Clinical Approach to Abortion, Stillbirth, and Neonatal Death in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p. 501-513, 2012.

LARSEN, R. W. et al. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 2015.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1121-1140, 2010.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: UFSM-Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MENESES, I. D. S. et al. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 770-776, 2008.

PRETZER, S. D. Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 320-326, 2008.

RAMOS, R. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (North-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1115-1120, 2010.

RIJSEWIJK, F. A. M. et al. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998. **Veterinary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1-7, 1999.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 1 ed. Ann Arbor: Edward Brothers, 1986.

RONSE, V. et al. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenology**, v. 64, n. 1, p. 61-74, 2005.

SCHLAFFER, D. H. Canine and feline abortion diagnostics. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 327-331, 2008.

SILVEIRA, J. A. G. et al. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks And Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 242-245, 2015.

WITTER, R. et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmoze trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 62, p. 3811-3822, 2013.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 304-319, 2008.

ABORTION AND FETAL DEATH IN FEMALE DOGS WITH INFECTIOUS ANEMIA*

ABSTRACT: Infectious diseases are often the greatest cause of reproductive failures (RF), abortion, stillbirth and fetal death in female dogs. Therefore, this study aimed to identify the main infectious agents, which cause RF (stillbirth, abortion and fetal death) in bitches. It was collected samples from 36 bitches, 20 with reproductive problems and 16 without reproductive problems. In order to be included in the study the owner had to declare that the animal had no issues related with: genetic, traumatic, hormonal, nutritional, use of contraceptive or losses of pregnancy. In addition, the medical history, clinical file and follow-up notes of these animals were gathered. For such, we performed blood tests and serum biochemistry, abdominal ultrasound to evaluate fetal viability/gestational age, and we also collected maternal blood and serum, placenta, and fetal tissues and fluids. These samples then underwent molecular and immunodiagnostic tests for the presence of different microorganisms reported as causing reproductive failures. Through PCR, all maternal and fetal samples were negative for the presence of *Canid herpes virus 1*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. and *Brucella canis*; one animal was positive for *Leishmania* spp., and two were positive for *Canine parvovirus*; *Ehrlichia canis* was found in six blood samples from bitches, while *Anaplasma platys* was found in three blood samples. There was co-infection of *A. platys* and *E. canis* in four female dogs. The fetal death and the abortions were statistically associated with anemia, which may have led to pregnancy problems due to the systemic form of the infection.

Keywords: Reproductive failures, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, *Parvovirus*.

1 INTRODUCTION

The major causes of reproductive failures (RF) in the bitch are considered for many authors: male infertility and mistimed breeding (JOHNSTON et al., 1994; ZOLDAG et al., 1993), however, when these causes are excluded, the infectious reasons for pregnancy loss or infertility should be questioned. The causes of neonatal and fetal loss can be divided into infectious or non-infectious reasons (KUSTRITZ, 2005). The fetal development may or may not be affected by maternal infections. However, embryonic losses are generally more common than perinatal loss. The consequences on the progress of the pregnancy can be due directly to the action of infectious agents or their toxins and placentitis. The fetal death during pregnancy can cause the reabsorption process, abortion, maceration and mummification (GIVENS; MARLEY, 2008). Non-infectious causes that lead to pregnancy loss may vary from factors such as trauma, genetic abnormalities in the offspring, poor nutrition, hypoglycemia, hypothyroidism and decreased levels of progesterone (KUSTRITZ, 2005).

* Artigo submetido a Veterinary Microbiology

In dogs, the main cause of reproductive problems has been found to be the viral action of the *Canid herpesvirus 1* (CaHV-1) and of the bacterium *Brucella canis* (DAHLBOM et al., 2009; GYURANECZ et al., 2011). In Brazil, particularly in northeast, Leishmaniasis, Parvovirus and ticks-borne diseases are endemics (MEGID et al., 2016). In addition to these agents; some pathogens have been neglected in studies concerning the reproductive disorders of dogs, such as *Neospora caninum*, that may one of the causes of stillbirth in the offspring (NAZIR et al., 2014). Domestic dogs are considered the biggest reservoir of the Leishmaniasis, which is also responsible for human infection, therefore, in Brazil, is endemic and its vertical transmission may cause abortion in bitches (DUBEY et al., 2005; MORENO; ALVAR, 2002; SILVA et al., 2009).

Canine parvovirus (CPV) is one of the main enteric pathogens in dogs (PINTO et al., 2012) and can cause transplacental infections, which may lead to embryonic reabsorption, fetal death and premature birth (CARMICHAEL et al., 1994). Among other infectious agents, we can name *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* who are generally associated with clinical signs of anemia and thrombocytopenia (ALMAZÁN et al., 2015; ROTONDANO et al., 2012). However, they are not reported to cause RF in dogs.

Due on the lack of research concerning causes of RF in female dogs, this study was designed to investigate the possible agents that cause unexplained infertility (abortion, stillbirth and neonatal death) in pregnant bitches.

2 METHODOLOGY

Bitches treated at the Veterinary Hospital Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia- HOVET in the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA) in Mossoró/RN, Brazil were obtained from pregnant females with and without reproductive problems. In total, we collected samples from 36 pregnant dogs, 20 with RF and 16 without RF.

The samples were obtained according to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) - UFERSA (No. 23091.006326 / 2014-88). The owners signed a consent contract as criteria to be included in the project and they responded a questionnaire to the pregnant female is to be admitted in the study (LAMM; NJAA, 2012). To prevent non-infectious causes, on this questionnaire, to be included in the research, only the owners that had declared to have no problems related with: genetic, trauma, hormonal, use of contraceptives, hypoglycemia, nutritional problems and mother issues during the current pregnancy and previous pregnancies. Ultrasonography was performed to assess gestational age and fetal viability. Blood was collected by venipuncture of the jugular vein into two vacuum containment tubes with and without EDTA. The samples underwent complete blood count (CBC), renal biochemistry, liver biochemistry and glucose essays. The animals were considered to have thrombocytopenia when the platelet count was below the reference value (ref. 180-500mil / mm³), infection when there was leukocytosis or leukopenia (ref. 6-17mil / mm³) and anemia when all the values of red blood cells (RBC) (5,5-8,5millions/mm³), hemoglobin (12-18g%) and the hematocrit (37-55%) were below the reference (JAIN, 1993; MEYER; HARVEY, 2004). Additionally, microscopic analysis was performed for the presence of hemoparasites (JAIN, 1993; MEYER; HARVEY, 2004).

Samples from female dogs with and without RF were collected after arriving at the hospital with abortion story at home (in this cases only was collected material from the bitches), ovariosalpingohysterectomy (OSH), cesarean section and normal parturition. The post-mortem examination of the uterus, placenta and fetus were carried out and photo documented. The collected material varied due to the conservation status of the fetus. From the bitches we collected blood, serum, uterus and placenta, whereas from fetuses we collected amniotic fluid, fetal abdominal fluid, liver, spleen, kidney and lung. These were stored in a freezer at -20°C until the total DNA extraction.

2.1 DNA EXTRACTION

DNA extraction was performed from 100-200µL/mg of sample with the Stratec Molecular™ kit (Invitek - Campus Berlin Buch - Germany), following the manufacturer's recommendations. Genetic material was extracted from the following tissues: maternal blood, placenta, fetal abdominal fluid, a mixture of liver and spleen, and a mixture of kidney and lung (LARSEN et al., 2015).

2.2 MOLECULAR TESTS AND IMMUNODIAGNOSTIC

After extraction, the total DNAs underwent molecular detection and serum samples, to immunodiagnostic tests for both suspected infectious agents as shown in Table 1, respectively.

For the detection of *B. canis* we performed serological screening tests and conventional PCR. Initially we used maternal serum for an agar gel immunodiffusion test (AGID) and the reading was held in 24h and 48h. Then, conventional PCR was performed on maternal blood according to the primers on Table 1 and 1.5% agarose gel electrophoresis was done. All serum samples were serologically tested for *B. abortus* antibodies following the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) guidance, from the Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Supply (MAPA) (BRAZIL, 2016). Samples were first screened by Rosa Bengal (RB) test. If lumps were present in the reaction, animal serum was considered reagent and submitted to confirmatory tests (Serum Agglutination Tests- SAT, and 2 mercaptoethanol test, 2-ME). We also carried out conventional PCR for *Brucella* sp. for DNA extracted from placentas under the same conditions. The PCR product was applied to agarose gel at 1.5% and subjected to electrophoresis, and then analyzed in the transilluminator under UV light.

2.3 STATISTICAL ANALYSIS

Chi-square test was performed by cross-tabulations (nonparametric data) to verify the dependence of the variable "animals with abortion and fetal death" in relation to a number of other variables (age, breed, weight, nutritional status, type of feeding, gestational age, primipara/ multiparous pregnancy, microorganisms, presence of other animals in the house, problems in previous litters and vaccination). For this analysis, we used the SPSS statistical program version 22.

Table 1: Molecular and serological tests.

Molecular Test	Microorganism	Analyzed material	Sequence 5' - 3'	Reference
qPCR	<i>Canid herpesvirus1</i>	Blood, fetal fluid, pool of spleen+kidneys, pool of liver+lungs	ACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATG CTGGTGTATTAAACT TTGAAGGCTTTA 6-FAM- TCTCTGGGGTCTTCATCCTTAT CAAATGCG- BHQ1	(DECARO et al., 2010; LARSEN et al., 2015)
PCR	<i>Brucella</i> sp.	Blood and placenta	ACATAGATCGCAGGCCAGTCA AGATACCGACGCAAACGCTAC	(KEID et al., 2007)
HRM-qPCR	<i>Ehrlichia</i> sp. <i>E. canis</i>	Blood and pool of spleen+kidneys	CTCAGAACGAACGCTGG ACCATTTCTARTGCTATYCCRTACTA	
qPCR	<i>Anaplasma platys</i>	Blood	TTTTTGTCGTAGCTTGCTATGATA TGTGGGTACCGTCATTATCTTCCCCA	(ROTONDA NO et al., 2012)
qPCR	<i>Neospora caninum</i>	Blood and pool of spleen+kidneys	GTGAGAGGTGGGATACG GTCCGCTTGCTCCCTA	(OKEOMA et al., 2005)
qPCR	<i>Parvovirus caninum</i>	Blood and pool of spleen+kidneys	CAT TGG GCT TAC CAC CAT TT CCA ACC TCA GCT GGT CTC AT	(KUMAR; NANDI, 2010)
PCR	<i>Leishmania</i> spp.	Blood	GGGTTGGTGTAAAATAGGG CAGAACGCCCCCTACCCG	(ARANSAY et al. 2000)
Serologic test	Microorganism	Analyzed material	Kits, antigen and antibody	Reference
AGID	<i>Brucella canis</i>	Serum	<i>B. ovis</i> Reo 198 surface antigen test kit (Paraná Institute of Technology - Tec-Par, Paraná, Brazil)	(KEID et al. 2007)
RBT	<i>Brucella abortus</i>	Serum	<i>B. abortus</i> 1119-3 antigen (Biological Institute, São Paulo, SP, Brazil)	(BRAZIL, 2016)
2ME-SAT	<i>Brucella abortus</i>	Serum	<i>B. abortus</i> antigen (Tec-Par, Paraná, Brazil)	(BRAZIL, 2016)
SAT	<i>Brucella abortus</i>	Serum	<i>B. abortus</i> antigen (Tec-Par, Paraná, Brazil)	(BRAZIL, 2016)
IFAT	<i>Leishmania major</i>	Serum	anti IgG <i>Leishmania major</i> (Control Center of Zoonosis, São Paulo, SP)	(CAMARGO, 1964)

qPCR- Real Time PCR; HRM-qPCR -High-resolution melting. Immunodiffusion agar gel (AGID); Rose Bengal acidification test (RBT); Serum agglutination Test (SAT); 2-mercaptoethanol (2ME-SAT); Immunofluorescence Assay (IFAT)

We performed an analysis of variance (ANOVA) between healthy animals (sixteen pregnant females without RF) and animals with RF (no healthy, twenty bitches) to determine whether the groups differed in any of the parameters. We did such by drawing up a table with hematological data from the animals with RF and a new group of healthy animals that came to HOVET of UFERSA and transforming some variables or checking their residues when necessary to achieve normality. We used for such analyses, the following variables: RBC, hemoglobin, hematocrit, white blood cells (WBC), platelets, creatinine, SGOT/AST (serum glutamic-oxaloacetic transaminase), SGPT/ALT (serum glutamic-pyruvic transaminase), protein, globulin, A/G ratio (albumin/globulin) and glucose.

3 RESULTS

Blood and serum were collected from all bitches in the experiment. However, materials such as fetuses and their tissues varied in accordance with their availability, due to between the time of collection and the period that happened the abortion or fetal reabsorption. The bitches (C5, C7, C8, C9, C10, C13, C17, C18, C19) arrived at the Veterinary Hospital with abortion episodes at home and the owners have not brought the fetuses, so it was not possible to collect tissues from these animals. Macroscopic analysis of maternal and fetal tissues collected during the post-mortem examination, as well as major changes in the tissue are described in Table 2. Regarding the questionnaire and animal form, 53.63% of females were multiparous and 47.37 % primipara. The litter number was an average of 3.1 ± 2.8 animals per female. Sixty-five percent (65%) of the animals did not have the vaccinations up to date. In addition, 80% of the animals had contact with other dogs in the house and no animals had genetic testing done, according to the questionnaire.

None of the animals tested were positive for *Canid herpes virus 1*, Brucellosis and Neosporosis. Two females were positives in PCR for CPV. There were four animals positive for co-infection of *A. platys* and *E. canis* (Table 3). For Canine visceral leishmaniasis and canine Brucellosis results are shown in Tables 3 and 4. Despite the *E. canis*, *A. platys* and *Leishmania spp.* variables (presence or absence of the pathogen) does not significantly explain the amount of abortions and stillbirths ($\chi^2 = 0.02$, $p > 0.05$, $n = 20$).

As to the statistical analysis for the hematological data we observed a correlation between the animals with anemia and fetal death or abortion. As seen in the next image, regarding the erythrocytes, means $\pm$ differ significantly between healthy females and those with reproductive problems ($F = 32.2$, $DF = 1.33$, $p < 0.05$) (Figure 1A and A1). Regarding the hemoglobin levels, there were also significant differences between the two groups of females. As seen next in Figure 1B and B1, healthy females showed higher levels of hemoglobin, and animals with reproductive problems, lower levels ($F = 32.8$, $DF = 1.33$, $p < 0.05$). Concerning the hematocrit, there was also significant difference between healthy animals and those with reproductive malfunction ($F = 35$, $DF = 1.33$, $p < 0.05$), where hematocrit levels were higher in healthy animals than in animals with problems (Figure 1C and C1).

There were no statistical correlations between abortion and fetal death and the risk factors considered (age, breed, weight, nutritional status, food type, gestational age, primipara/multiparous, microorganisms, presence of other animals in the house, problems in previous litters and vaccination).

Table 2: Description exam *post mortem* of maternal / fetal tissues and fetuses and gestational age of each female with reproductive disorders.

Animal	Fetuses	Uterus	Placenta	Fetal description	Gestational age
C1	F1	Distended and full of green lumpy content and clots in the lumen, in addition to diffusely red mucosa with whitish and rough linear areas	Diffusely blackened and green-yellow linear area	Well developed fetus	61 days
C2	F1/F2	Distended and full of green lumpy content and clots in the lumen, in addition to diffusely red mucosa with whitish and rough linear area	Diffusely blackened and green-yellow linear area	Fetal organs undergoing autolysis	54 days
C3	F1/F2	Diffusely red mucosa	Autolysed	Fetal organs undergoing autolysis	58 days
C4	F1	No alterations	Blackened placenta	No alterations	59 days
	F2		Blackened placenta	No alterations	
	F3		Blackened placenta	Right kidney very red with multifocal coalescent black dots in the cortex	
	F4		Blackened placenta	Distended gall bladder	
C6	F1	Distended and displaying thickened and diffusely red mucosa with blackened areas, not elevated, linear or punctuated and multifocal	Autolysis	Fetal organs undergoing autolysis	60 days
	F1	No alterations	Autolysed	Heart with diffuse and severe congestion of the coronary vessels	59 days
C11	F2		Autolysed	Heart with diffuse and severe congestion of the coronary vessels	
C12	F1	No alterations	Thickened placenta	No alterations	47days
	F2		Thickened placenta	No alterations	
	F3		Thickened placenta with heterogeneous coloring from yellowish to greenish	Acute and diffuse liver pallor	
	F4			Diffuse reddish and purplish spots located in the anterior and posterior limbs, and in the left cervical region	
C14	F1	Uterine mucosa thickened and diffusely red	Autolysed	Undergoing autolysis/reabsorption	60 days
C15	F1	No alterations	Autolysed	Unedrgoing autolysis	60 days
	F2			Undergoing autolysis with diffuse liver pallor	
C16	F1	Mucosa diffusely red with blackened placental insertion areas	Autolysed	Organs undergoing autolysis	55 days
C20	F1	Distended with diffusely red mucosa interspersed with areas of greenish color	Undergoing autolysis (greenish black color)	Undergoing autolysis without brain mass (watery)	54 days
	F2		Undergoing autolysis (greenish black color)	Undergoing autolysis with little brain mass (watery) and showing herniation of bowel loops	
	F3		Undergoing autolysis (greenish black color)	Undergoing autolysis with stomach distended and full of gas and little brain mass	

Table 3: Results of molecular tests, CBC and microscopy of bitches with reproductive problems.

Animal n°	qPCR CaHV-1	PCR <i>Brucella canis</i>	PCR <i>Parvovirus</i>	PCR <i>Neospora caninum</i>	qPCR <i>Leishmania</i>	HRM- qPCR <i>Ehrlichia</i>	qPCR <i>Anaplasma</i>	Smear <i>Anaplasma</i>	Anemia	Thrombocytopenia	Blood test consistent with infection
C1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
C3	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
C4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
C5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C7	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
C8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C9	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
C12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
C13	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C15	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
C16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
C17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
C18	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
C19	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
C20	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Complete blood count (CBC)

Table 4: Results of serological tests for Brucellosis and for Leishmaniosis of bitches with reproductive problems.

Animal	AGID <i>B. canis</i>	RBT <i>B. abortus</i>	2ME-SAT <i>B. abortus</i>	SAT <i>B. abortus</i>	IFAT <i>L. major</i>*
C1	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	80
C3	-	+	-	-	-
C4	-	-	-	-	40
C5	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	40
C7	-	+	-	-	-
C8	-	+	-	-	-
C9	-	-	-	-	160
C10	-	+	-	-	-
C11	-	+	-	-	-
C12	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-
C16	-	+	-	-	80
C17	-	+	-	-	-
C18	-	+	-	-	-
C19	-	-	-	-	-
C20	-	+	-	-	-

Immunodiffusion agar gel (AGID); Rose Bengal acidification test (RBT); Serum agglutination Test (SAT); 2-mercaptoethanol (2ME-SAT); Immunofluorescence Assay (IFAT). * Titration of antibodies

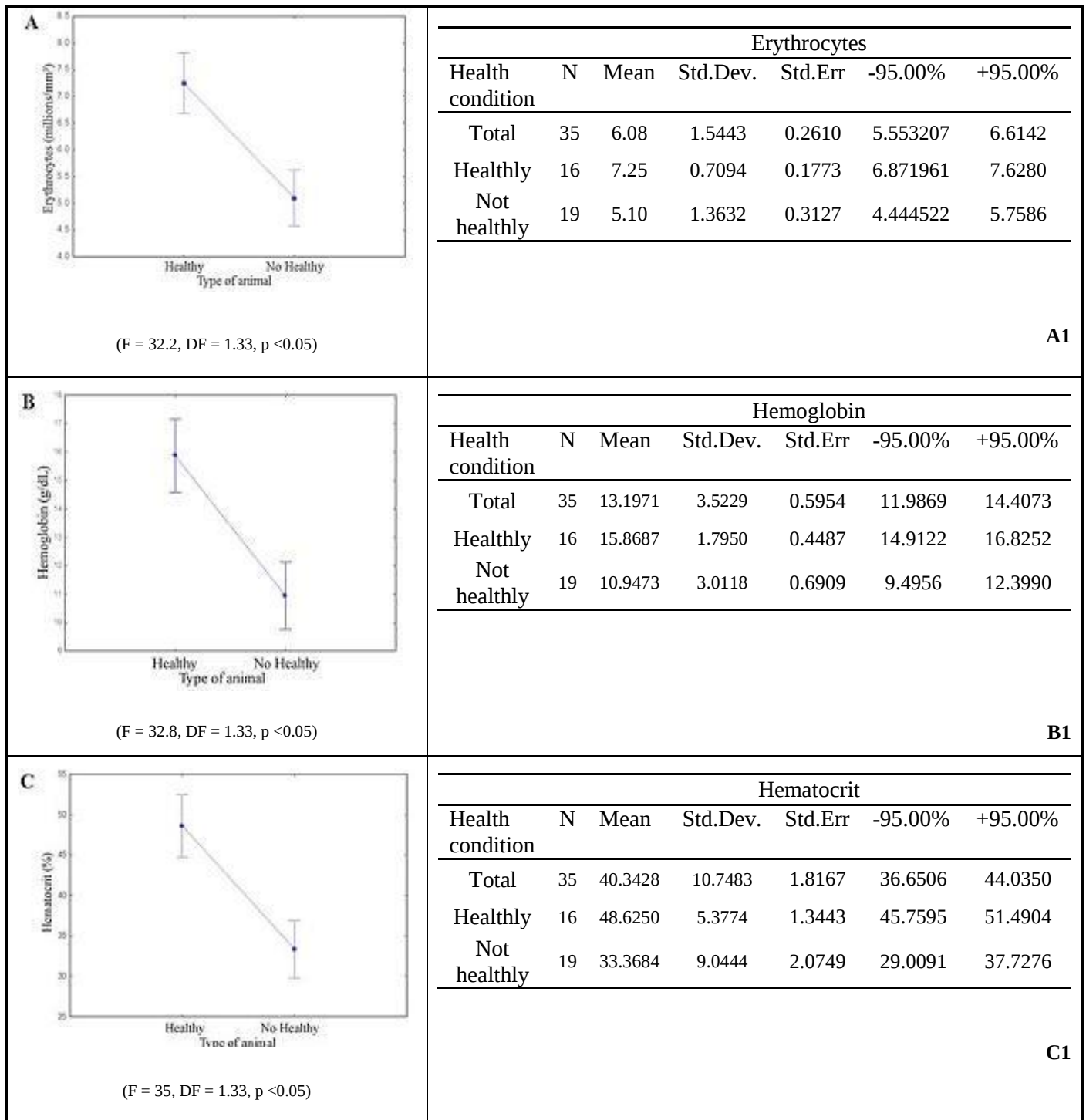


Figure 1: A- Number for erythrocytes to bitches with reproductive failures (no healthy) and without reproductive failures (healthy); A1- Quantification of erythrocytes related to the animal's health condition (corresponding table to figure 1A); B- Number for hemoglobin to bitches with reproductive failures (no healthy) and without reproductive failures (healthy); B1- Quantification of hemoglobin related to the animal's health condition (corresponding table to figure 1B); C- Number for hematocrit to bitches with reproductive failures (no healthy) and without reproductive failures (healthy); C1- Quantification of hematocrit related to the animal's health condition (corresponding table to figure 1C).

4 DISCUSSION

The *Canid herpes virus* causes an infection that covers a large territory with high seroprevalence reported in several countries; and it is reported in scientific studies to cause abortion in dogs (CARMICHAEL et al., 1965; DECARO et al, 2010; LARSEN et al., 2015). Likewise, canine Brucellosis is also consistently associated with reproductive disorders (DAHLBOM et al., 2009; GYURANECZ et al., 2011). However, none of these pathogens was found in maternal or fetal samples from the dogs with reproductive problems analyzed in this work, however, according to Table 2, the fetuses aborted in late pregnancy, which are provided in these diseases. About the autolysed fetuses, they may have diminished sensitivity of PCR; and the fetal autolysis is cited in cases of canine brucellosis (DAHLBOM et al., 2009; GYURANECZ et al., 2011; MEGID et al., 2016). Mir et al. (2013) studied female dogs that were infertile or had RF, and they did not find *B. canis* or *Canid herpes virus* in maternal tissues either. However, the presence of fibrosis, degeneration of endometrial glands, endometriosis and endometrial hyperplasia was associated with infertility in female dogs (MIR et al., 2013). In our research, we found macroscopic lesions in uterus and placenta (Table 2) that may suggest the action of some infectious agent not diagnosed.

The *Neospora caninum* did not have any representation in the samples as well. Even though it is a protozoan that affects the central nervous system of a wide range of species (secondary hosts), it has canines as primary hosts, which is associated to problems in the fetal development and abortions (NAZIR et al., 2014; OKEOMA et al., 2005).

In table 3, as for the CPV, although two females were positive (C5,C20), they presented no hematologic alterations and although this disease in the literature is

correlated with reproductive problems (CARMICHAEL et al., 1994; GIVENS; MARLEY, 2008; PINTO et al., 2012), in this study, it appears to be unrelated to abortion and fetal death. In these animals positives for Parvovirus, one of the female (C5) brought at Veterinary Hospital, the owner does not collected fetuses, the other bitch, their fetuses, uterus and placenta showed signs of autolysis, probably after the infection/fetal death. Reproductive failure, as miscarriages and stillbirths are cited as rare in Parvovirus due to vaccination and mass population immunity in dogs (GIVENS; MARLEY, 2008; KUSTRITZ, 2005).

Research for the presence of *Leishmania* spp. was included in the study because of the high incidence of this illness in northeastern Brazil and in the city where this work took place, where it is considered endemic (COSTA et al., 2014). In Rio Grande do Norte, are mostly found cases of visceral leishmanial (AMÓRA et al., 2006; BARBOSA, 2013), as well as in the city of Mossoró (AMÓRA et al., 2006; COSTA et al., 2014; MATOS et al., 2006). Despite Leishmaniasis not be statistically correlated with reproductive problems, in this study we found five females (C2, C4, C6, C9, C16) that were serologically positive for this disease and presented reproductive problems (Table 4). Additionally, one female (C9) with reproductive problems and blood test presenting infectious disease characteristics was positive on serology, PCR, anemia and smear positive for *A. platys* (Table 3). According to Oliveira et al. (2012, 2015), in visceral Leishmaniasis, the systemic disease can lead to anemia, miscarriage and can be transmitted vertically. The others four animals positives in serology for Leishmaniasis also were smear *A. platys* positive, with this co-infection we cannot infer who started the anemia. The findings in uterus, placentas and fetuses (Table 2) of these animals positive for Leishmaniasis suggest a pathogenesis of infectious origin. Study in the placentas from aborted fetuses from seropositive bitch for Leishmaniasis demonstrated

placentitis as predominant lesion, characterized by necrosis and mixed leukocyte infiltration (DUBEY et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012). Another important issue, that the animals positive for Leishmaniasis are a potential reservoir for this zoonosis (COSTA et al., 2014; PICADO et al., 2014).

Ehrlichiosis and Anaplasmosis are important emerging zoonotic diseases (ARRAGA-ALVARADO et al., 2014; DAGNONE et al., 2009). However, data was not found in the literature to associate these diseases with abortion and fetal death in dogs. Four bitches (C1, C3, C7, C13, Table 3) had co-infection (*E. canis* and *A. platys*) demonstrating anemia and thrombocytopenia (except female C3 that had only anemia and CBC with characteristics of infection). The others females with *E. canis* PCR positive (C11 and C18 with infectious blood count), *A. platys* PCR positive (C19, had thrombocytopenia) and smear *A. platys* positive (C12, C15) and bitches with at least one alterations in blood count (C8, C12, C14, C15, C17, C18), had fetuses and fetal membranes in necropsy with features that suggest an infectious pathogen. Infection with these pathogens can systemically have caused weakness in dogs and consequently reproductive problems. In this study, thrombocytopenia was found in five dogs with Leishmaniasis (C6), Ehrlichiosis (C1,C7,C13) and Anaplasmosis (C1,C7,C13,C19). Thrombocytopenia is already described in dogs with *A. platys* and *E. canis* (ALMAZÁN et al., 2015; BORIN et al., 2009; MEGID et al., 2016). Findings such as miscarriage and stillbirths are not described by Borin et al. (2009) e Fard et al. (2015) as clinical signs of Ehrlichiosis or Leishmaniasis. However, these animals fit into the animals with reproductive problems group. Therefore, the presence of these pathogens can be one of many factors that favor abortion and/or fetal death or increases the likelihood of these to happen.

In this study anemia was associated with RF (Figure 1A). Anemia has been associated to animals chronically infected with *E.canis*, *A.platys* and *L. infantum*. The diseases caused by these infectious agents are characterized for being multisystemic and displaying the first clinical manifestation after the incubation period of the microorganism, and it can progress to three stages of infection: acute, subclinical and chronic. Clinical signs vary with the severity of the disease, the affected organs, the host's immune response, and the presence of co-infection of other microorganisms. However, in most cases, the acute phase may not be obvious, unnoticed by the animal's owner, thus evolving to a subclinical and chronic phase (BORIN et al., 2009; FERREIRA et al., 2014; MEGID et al., 2016).

Data demonstrate that the incidence of Anaplasmosis and Ehrlichiosis has increased in recent years (ALMAZÁN et al., 2015; ROTONDANO et al., 2012). Ferreira et al. (2014) found genetic diversity of *E.canis* strains in dogs infected in Rio de Janeiro, Brazil. Therefore, because different genotypes can express new phenotypes, this resulted in different forms of hematological and clinical manifestations of the disease. It should be noted that these researches about clinical signs were carried out with animals that were not pregnant.

Gaunt et al. (2010), demonstrated that the simultaneous or sequential infection with *A. platys* and *E. canis* can change various physiopathological parameters in experimentally infected dogs, and it is well known that exposure to various pathogenic agents transmitted by ticks often occurs in dogs, and awareness of the possibility of co-infection is an important clinical practice. In this same study, it was observed that the simultaneous infection of *E. canis* and *A.platys* in nonpregnant dogs resulted in a more pronounced anemia and thrombocytopenia when compared with the single infection with either pathogen. The lack of iron reserves has adverse effects on the fetal-placental development in humans. Maternal and perinatal mortality is significantly higher in anemic pregnant women, especially if their

anemia is severe, but it can also happen in cases of moderate anemia (BENCAIOVA et al., 2012). In an experimental model conducted by Hubbard et al. (2013) female mice kept under iron-deficient diet had lower fertility, fewer viable fetuses and more compromised litter.

According to Givens and Marley (2008), severe maternal diseases can result in high fever, hypoxia (which can lead to severe anemia), or endotoxemia, and all of these can result in abortion. Hence, the dogs with RF in this study, the majority had hematologic alterations, including anemia, indicating a possible consequence of infections during that period. The placenta found in dogs is the endotheliochorial type, which allows high blood demand of maternal endometrial vessels to the fetus. Infections by intracellular parasites can result in hemolysis, lowering oxygen levels in the blood transported. In turn, the reduction of oxygen can reduce the oxygen in major steps of embryonic development, leading to the malformation of the fetus and RF (ROBERTS, 1986).

According with figure 1, we suggest that in cases where infectious pathogens (*E.canis*, *A.platys* and *L. infantum*) were diagnosed in maternal blood, the problems of abortion and fetal death were due to the systemic disease caused by microorganisms that originated anemia. Accordingly, histopathologic analyses, bacterioma, sequencing of the 16S rRNA gene and viral metagenomic of these animals' tissues are important for a better understanding of possible new diagnoses of infectious pathogens causing reproductive problems.

5 CONCLUSION

Pathogens that are usually diagnosed and cited in literature review to be the main causes of reproductive problems in female dogs were not found in this study. However, *A. platys*, *E.canis*, *Leishmania infatum*, and *Canine parvovirus* were identified in maternal blood samples. In material collected from fetal and embryonic tissues and fluids none of the investigated pathogens were found. The infectious agents researched in this study or news/others pathogens seem to play no detectible function, and we should consider the possibility of low sensitivity of the diagnostic tests in cases of RF. Regarding hematological analyses, this study found correlation between abortion and fetal death with infectious anemia in pregnant dogs.

6 REFERENCES

- ALMAZÁN, C. et al. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 2, p. 276-283, 2015.
- AMÓRA, S. S. A. et al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1933–1938, 2000.
- ARRAGA-ALVARADO, C. M. et al. Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1161-1165, 2014.
- BARBOSA, I. R. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 1, p. 17-21, 2013.
- BENCAIOVA, G.; BURKHARDT, T.; BREYMAN, C. Anemia—prevalence and risk factors in pregnancy. **European journal of internal medicine**, v. 23, n. 6, p. 529-533, 2012.
- BORIN, S. et al. Epidemiological, clinical and hematological aspects of 251 dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp. morulae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- BRAZIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (Org.). Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT)**: Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 04 fevereiro. 2016.
- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117–118, 1964.
- CARMICHAEL, L. E.; SQUIRE, R. A.; KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. **American journal of veterinary research**, v. 26, n. 113, p. 803–814, 1965.
- CARMICHAEL, L. E.; SCHLAFFER, D. H.; HASHIMOTO, A. *Minute virus of canines* (MVC, *Canine parvovirus* type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 165–174, 1994.

COSTA, K. F. de L. et al. Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 607-612, 2014.

DAGNONE, A. S. et al. Molecular diagnosis of *Anaplasmataceae* organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DAHLBOM, M. et al. Seroprevalence of *Canine Herpesvirus-1* and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p. 128-131, 2009.

DECARO, N. et al. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of *Canid herpesvirus 1*. **Journal of virological methods**, v. 169, n. 1, p. 176-180, 2010.

DUBEY, J. P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p. 1266-1269, 2005.

FARD, R. M. et al. A case report of typical leishmaniasis in dog. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 2, p. 339-341, 2015.

FERREIRA, R. F. et al. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 301-308, 2014.

GAUNT, S. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 3, n.1, p. 33-43, 2010.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 270-285, 2008.

GYURANECZ, M. et al. Detection of *Brucella Canis*-Induced Reproductive Diseases in a Kennel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 143-147, 2011.

HUBBARD, A. C. et al. Effect of dietary iron on fetal growth in pregnant mice. *Comparative medicine*, v. 63, n. 2, p. 127-135, 2013.

JAIN, N. C. **Comparative hematology of common domestic animals. Essentials of veterinary hematology**. 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JOHNSTON, S. D.; OLSON, P. N. S.; ROOT, M. V. Clinical approach to infertility in the bitch. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 9, n. 1, p. 2-6, 1994.

KEID, L. B. et al. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. **Veterinary research communications**, v. 31, n. 8, p. 951-965, 2007.

KUMAR, M.; NANDI, S. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of *Canine parvovirus* in faecal samples. **Journal Virology Methods**, v. 169, n.1, p. 198-201, 2010.

KUSTRITZ, M. V. R. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 755-765, 2005.

LAMM, C. G.; NJAA, B. L. Clinical Approach to Abortion, Stillbirth, and Neonatal Death in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Anim Practice**, v. 42, n. 3, p. 501-513 2012.

LARSEN, R. W. et al. Prevalence of *Canid herpesvirus-1* infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 2015.

MATOS, M. M. et al. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 51-54, 2006.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MEYER, D. J., HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

MIR, F. et al. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: An observational study. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 312-322, 2013.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

NAZIR, M. M. et al. *Neospora caninum* prevalence in dogs raised under different living conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 364-368, 2014.

OKEOMA, C. M. et al. *Neospora caninum*: Quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 48-55, 2005.

OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; SILVA JUNIOR, V. A. Genital pathologies associated with canine visceral leishmaniasis. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1614-1620, 2012.

_____. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1622-1628, 2015.

PICADO, A. et al. Risk factors for visceral leishmaniasis and asymptomatic *Leishmania donovani* infection in India and Nepal. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e87641, 2014.

PINTO, L. D. et al. Typing of *Canine parvovirus* strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, v. 165, n. 1, p. 29-33, 2012.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 1 ed. Ann Arbor: Edward Brothers, 1986.

ROTONDANO, T. E. et al. An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. 1, p. 1-6, 2012.

SILVA, S. M. da et al. First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 159-162, 2009.

ZOLDAG, L.; KECSKEMETHY, S.; NAGY, P. Heat progesterone profile of bitches with ovulation failure. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, n. 1, p. 561-562, 1993.

ANEXOS

ANEXO A - Questionário (LAMM; NJAA, 2012)

1. A cadela é primípara ou múltípara?
2. Qual o tamanho da ninhada e o número de filhotes acometidos?
3. A cadela apresentou problema em ninhadas anteriores? Se sim, qual diagnóstico foi atribuído?
4. Existem outros animais na casa? Eles são usados para reprodução?
5. Existem cadelas na casa que apresentam outros problemas reprodutivos incluindo infertilidade, aborto ou natimorto? Se sim, quais foram eles e quais procedimentos foram feitos para fechar diagnóstico?
6. Algum animal da casa apresenta doença do trato respiratório superior, diarreia ou outros sinais clínicos?
7. Qual o histórico vacinal da cadela?
8. Qual o estado de saúde da parturiente e dos filhotes acometidos?
9. Qual o histórico de toda a vida dos pais (mãe e pai) da ninhada?
10. Tem algum teste genético completo (concluído)?
11. Houve introdução de animal(is) novo(s) na casa/canil? Algum cão da casa viajou e retornou recentemente? Qual(is) protocolo(s) de quarentena são implementado(s)?

ANEXO B - Check list para aborto, natimorto e morto fetal em cães (LAMM; NJAA, 2012)

1. Concluído ficha de inscrição

- Histórico completo, incluindo quaisquer lesões observadas

2. Tubos de sangue para sorologia(s)

- Soro parturiente
- Soro ou fluido fetal

3. Em formalina para exame histopatológico finas (menos de 0,5cm de largura) secções de

- Placenta
- Fígado
- Rim
- Pulmão
- Coração
- Cérebro
- Qualquer lesão, especificando a forma

4. Material para virologia e bacteriologia

- Placenta
- Pulmão (apenas dos fetos)
- Fígado
- Rim
- Baço (apenas dos neonatos)
- Qualquer lesão, especificando a forma

5. Tubo de sangue para cultura

- Conteúdo estomacal (apenas dos fetos)

ANEXO C - Termo de consentimento do proprietário

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) _____ para participar da **PESQUISA DE AGENTE CAUSADOR DE ABORTO, NATIMORTO E MORTE NEONATAL EM CÃES**, sob a responsabilidade do pesquisador *João Marcelo Azevedo de Paula Antunes*, o qual pretende investigar a presença de micro-organismos nas cadelas atendidas no HOVET da UFERSA. Sua participação é voluntária e se dará por meio da permissão do uso de tecidos, fluidos, fetos abortados ou neonatos referentes ao seu animal de estimação. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o maior conhecimento sobre agentes virais que causam problemas reprodutivos em cães. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e do seu animal não serão divulgadas, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia (HOVET) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido pelo telefone (84) 3317-8310 ou poderá entrar em contato com a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFERSA, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, telefone (84) 3317-8360.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data:

____/____/____ Assinatura do participante



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO D - Carta de confirmação de submissão do artigo: **Abortion and fetal death in female dogs with infectious anemia** ao journal Veterinary Microbiology.

Submission Confirmation for Veterinary Microbiology

De: **ees.vetmic.0.37cb9c.767446f8@eesmail.elsevier.com** em nome de VETMIC
(vetmic@elsevier.com)

Enviada: terça-feira, 8 de março de 2016 00:10:13

Para: joaomarceloantunes@live.com

Title: Abortion and fetal death in female dogs with infectious anemia
Research Paper

Dear Mr. Antunes,

Your submission has been received by the journal
Veterinary Microbiology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vetmic/>

Your username is: João

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/VETMIC/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Microbiology