



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA



**ABORDAGEM DA ASFIXIA NEONATAL E INFECÇÃO BACTERIANA EM
NEONATOS CANINOS: USO DA TROPONINA I E AVALIAÇÃO DA SEPSE**

KEYLLA HELENA NOBRE PACIFICO PEREIRA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA



**ABORDAGEM DA ASFIXIA NEONATAL E INFECÇÃO BACTERIANA EM
NEONATOS CANINOS: USO DA TROPONINA I E AVALIAÇÃO DA SEPSE**

KEYLLA HELENA NOBRE PACIFICO PEREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista para obtenção do título de Doutora em
Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Lucia Gomes Lourenço

BOTUCATU

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Keylla Helena Nobre Pacífico.

Abordagem da asfixia neonatal e infecção bacteriana em neonatos caninos : uso da troponina I e avaliação da sepse / Keylla Helena Nobre Pacífico Pereira. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Lucia Gomes Lourenço
Capes: 50501062

1. Asfixia. 2. Cesariana. 3. Animais Filhotes. 4. Hipóxia. 5. Infecções.

Palavras-chave: Asfixia; Cesariana; Filhote; Hipóxia; Infecção bacteriana.

Autor: Keylla Helena Nobre Pacífico Pereira

TÍTULO: ABORDAGEM DA ASFIXIA NEONATAL E INFECÇÃO BACTERIANA EM NEONATOS CANINOS: USO DA TROPONINA I E AVALIAÇÃO DA SEPSE

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Gomes Lourenço

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Camila Infantsi Vannucchi

Membro titular

Departamento de Reprodução animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

Membro titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Silvia Edelweiss Crusco

Membro titular

Instituto de Ciências da Saúde - ICS

Universidade Paulista – UNIP – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Maricy Apparicio Ferreira

Membro titular

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) – Número do Processo 2019/21366-0

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	09
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Hipóxia neonatal	11
2.2 Marcador bioquímico cardíaco: Troponina cardíaca I	13
2.3 Sepsis neonatal	17
3. HIPÓTESES	22
4. OBJETIVOS	23
 CAPÍTULO II – ARTIGOS CIENTÍFICOS	 24
Seção 1. Uso da troponina cardíaca I (cTnI) no diagnóstico de lesão miocárdica por asfixia perinatal em cães neonatos.....	25
Seção 2. Sepsis neonatal em cães - incidência, aspectos clínicos e mortalidade.....	47

RESUMO

O primeiro estudo teve como objetivo avaliar e comparar os níveis de troponina cardíaca I (cTnI) em cães recém-nascidos com asfixia e não asfixiados, correlacionando com a avaliação do escore Apgar modificado, saturação de oxigênio, glicemia, lactatemia e hemogasometria. O estudo visou determinar o possível uso da troponina I como marcador de lesão isquêmica do miocárdio e indicador de hipóxia perinatal grave em cães neonatos. Foram avaliados 15 animais no grupo parto eutócico (GE), 15 animais no grupo cesariana (GC) e 13 animais no grupo hipóxia (com asfixia) (GH). No GH os recém-nascidos exibiram acidose mista proeminente ($p < 0,05$) (respiratória por aumento $p\text{CO}_2$ e metabólica por redução do pH, HCO_3 , BEecf e aumento do lactato) em comparação ao GE e GC, em decorrência da hipoxemia grave. Os parâmetros no escore de Apgar e hemogasometria demonstraram que estes cães nasceram com asfixia, apresentando baixa vitalidade e necessidade de manobras reanimatórias. Os níveis de troponina I estavam dentro dos padrões de referência para cães hígidos nos grupos GE e GC. No GH os níveis de troponina I foram significativamente mais elevados do que o GE e GC ($p < 0,05$) e estavam acima dos padrões de referência para cães hígidos. Conclui-se que a troponina I é um marcador de hipóxia e lesão miocárdica em cães neonatos. O objetivo do segundo estudo foi descrever a incidência de sepse em cães recém-nascidos, os aspectos clínicos envolvidos, os principais agentes bacterianos isolados e as taxas de mortalidade. Das 152 ninhadas e 762 neonatos avaliados, 14,8% (113/762) apresentaram sepse ou choque séptico, e a taxa de mortalidade entre os filhotes afetados foi de 25,6% (29/113). Diferenças significativas ($p < 0,0001$) nos parâmetros clínicos (frequência cardíaca e respiratória, glicemia, temperatura corporal, saturação periférica de oxigênio e reflexos) foram observadas entre neonatos saudáveis e neonatos com sepse e choque séptico. Os principais e mais relevantes sinais clínicos foram: apatia, redução do reflexo de sucção, diarreia, tríade neonatal, insuficiência de ganho de peso, bradicardia, dispneia, mucosas cianóticas, eritema corporal, redução da saturação periférica de oxigênio, cianose e necrose dos tecidos das extremidades. A mãe pode ter sido a principal fonte de infecção para 87,6% (99/113) dos neonatos com sepse. O agente bacteriano mais isolado foi a *Escherichia coli*, responsável por 25,6% (29/113) dos casos de sepse. A morbidade e mortalidade da sepse neonatal em cães são altas. A avaliação clínica e o diagnóstico de sepse em neonatos diferem daqueles em animais adultos. Assim, o conhecimento das particularidades neonatais da sepse é essencial para o manejo clínico adequado e maior sobrevida desses pacientes.

Palavras-chave: Asfixia, hipóxia, cesariana, infecção bacteriana, filhote.

ABSTRACT

The first study aimed to evaluate and compare the levels of cardiac troponin I (cTnI) in asphyxiated and non-asphyxiated newborn dogs, correlating with the modified Apgar score, oxygen saturation, glycemia, lactatemia and blood gas analysis. The study aimed to determine the possible use of troponin I as a marker of myocardial ischemic injury and an indicator of severe perinatal hypoxia in neonatal dogs. Fifteen animals in the eutocic delivery group (EG), 15 animals in the cesarean group (CG) and 13 animals in the hypoxia group (asphyxiated) (GH) were evaluated. In GH, newborns showed prominent mixed acidosis ($p < 0.05$) (respiratory due to $p\text{CO}_2$ increase and metabolic due to reduced pH, HCO_3 , BEecf and increase in lactate) compared to EG and GC, due to severe hypoxemia. The parameters in the Apgar score and blood gas analysis showed that these dogs were born asphyxiated, with low vitality and need for resuscitation maneuvers. Troponin I levels were within the reference standards for healthy dogs in the GE and GC groups. In GH, troponin I levels were significantly higher than in GE and GC ($p < 0.05$) and were above the reference standards for healthy dogs. It is concluded that troponin I is a marker of hypoxia and myocardial injury in neonatal dogs. The aim of the second study was to describe the incidence of sepsis in newborn dogs, the clinical aspects involved, the main bacterial agents isolated and the mortality rates. Of the 152 litters and 762 neonates evaluated, 14.8% (113/762) had sepsis or septic shock, and the mortality rate among affected pups was 25.6% (29/113). Significant differences ($p < 0.0001$) in clinical parameters (heart and respiratory rate, blood glucose, body temperature, peripheral oxygen saturation and reflexes) were observed between healthy neonates and neonates with sepsis and septic shock. The main and most relevant clinical signs were: apathy, reduced sucking reflex, diarrhea, neonatal triad, failure to gain weight, bradycardia, dyspnea, cyanotic mucous membranes, body erythema, reduced peripheral oxygen saturation, cyanosis and tissue necrosis from the ends. The mother may have been the main source of infection for 87.6% (99/113) of neonates with sepsis. The most isolated bacterial agent was *Escherichia coli*, responsible for 25.6% (29/113) of sepsis cases. The morbidity and mortality of neonatal sepsis in dogs is high. Clinical evaluation and diagnosis of sepsis in neonates differ from those in adult animals. Thus, knowledge of neonatal sepsis particularities is essential for proper clinical management and better survival of these patients.

Keywords: Asphyxia, hypoxia, cesarean, bacterial infection, puppy.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A neonatologia na espécie canina constitui-se de um grande desafio aos médicos veterinários, as taxas de morbimortalidade são elevadas e as causas das mortes e seus fatores de risco muitas vezes são desconhecidos ou negligenciados. Índices de mortalidade neonatais mais elevados podem ser observados na Medicina Veterinária quando comparado à Medicina, que possui índices no mundo e no Brasil em torno de 1,7% e 0,8%, respectivamente (OMS, 2020). Na Medicina Veterinária, a taxa de mortalidade neonatal canina pode variar de 5,7% a 35% e é maior durante o parto, imediatamente após o parto e nos primeiros dias de vida (MOSIER, 1981; GILL, 2001; INDREBØ et al., 2007; VERONESI et al., 2009; KONDE et al., 2015; MILA et al., 2016; CHASTANT-MAILLARD et al., 2017).

A transição fetal-neonatal é um período crítico, com alto risco de mortalidade. Imediatamente após o nascimento, o neonato precisa assumir as funções vitais previamente realizadas pela placenta (LOURENÇO; MACHADO, 2013), como a respiração pulmonar, que deve ser iniciada e mantida de forma adequada, garantindo a eficiência das trocas gasosas. Quando essa transição não é realizada de forma efetiva, podem ocorrer consequências fatais para os recém-nascidos (VANNUCCHI et al., 2012).

A falha na adequada transição fetal-neonatal pode estar associada a asfixia perinatal, que é considerada uma das principais causas de mortalidade em cães recém-nascidos (MÜNNICH, 2008; LOURENÇO, 2015). A asfixia durante o parto leva à hipoxemia grave, ocasionando consequências em neonatos, como a síndrome do desconforto respiratório (SDR), aumento da acidose metabólica e respiratória e danos a tecidos com elevados requisitos de oxigênio, como o coração (MOON et al., 2000; VANNUCCHI et al., 2012; MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2014; VANNUCCHI; LOURENÇO, 2015).

A asfixia perinatal pode levar a isquemia e necrose miocárdica. A hipoxemia grave seguida de acidose está associada à insuficiência cardíaca progressiva e óbito (BADER et al., 2006). Marcadores bioquímicos cardíacos sensíveis e específicos como a troponina I são utilizados para diagnosticar lesão miocárdica isquêmica e não isquêmica em recém-nascidos humanos logo após o nascimento (TREVISANUTO et al., 2006). Níveis elevados de troponina I podem resultar de danos reversíveis na

membrana dos cardiomiócitos, não necessariamente da morte celular (EEROLA et al., 2014). A detecção de lesão miocárdica leva a possibilidade da assistência precoce ao recém-nascido, aumentando as chances de sobrevivência neonatal. Em cães adultos, a troponina cardíaca I é utilizada para detectar lesão nas células miocárdicas em isquemias, miocardites, bem como para fator prognóstico em cardiopatias (VITT et al., 2016; DUTTON et al., 2017; MATTIN et al., 2018). Não há pesquisas sobre marcadores bioquímicos cardíacos em cães recém-nascidos. O estudo de um marcador cardíaco específico em cães neonatos hipoxêmicos poderá ser utilizado como preditor de lesão miocárdica e de mortalidade, beneficiando a conduta clínica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O período neonatal em cães refere-se às primeiras quatro semanas de vida, sendo este um período considerado crítico e com alta taxa de mortalidade (GRUNDY, 2006; LOURENÇO, 2015). A elevada mortalidade é atribuída a uma grande variedade de causas, sendo que 90% das mortes que ocorrem durante os primeiros dois dias de vida são oriundas de hipoxemia prolongada durante o parto (MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2014; VANNUCCHI; LOURENÇO, 2015).

Durante o nascimento, os recém-nascidos experimentam um curto período de asfixia fetal simultânea com as contrações uterinas, levando a uma hipoxemia fisiológica, que pode resultar em hipercapnia e acidemia neonatal transitória (RUTH E RAVIO 1988; VANNUCCHI, 2012). A adaptação à respiração pulmonar após o nascimento é um fator importante na recuperação da homeostase ácido-básica. A frequência respiratória adequada favorece a eliminação de CO₂, diminuindo a concentração sérica (VANNUCHI, 2012).

No entanto, existem fatores que podem prolongar a asfixia e agravar a hipoxemia e a acidemia, como as distocias, partos prolongados e os anestésicos utilizados nas cesarianas, resultando em falha na adaptação respiratória e maiores taxas de mortalidade no período de transição fetal-neonatal (MOON et al., 2001; INDREBØ et al., 2007).

2.1 Hipóxia neonatal

A asfixia perinatal é uma condição clínica que ocorre como resultado da privação de oxigênio para o feto ou para o recém-nascido, com consequente perda da

perfusão em diversos órgãos. A asfixia perinatal é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no período neonatal em cães e em humanos (MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2014; YILDIRIM et al., 2015). A gravidade e duração da hipóxia são os fatores mais importantes que determinam o grau e a extensão da lesão de órgãos e tecidos (YILDIRIM et al., 2015).

Cães neonatos exibem hipoxemia fisiológica durante o parto e imediatamente após o nascimento (LUCIO et al., 2009). As contrações uterinas durante o trabalho de parto induzem redução do fluxo sanguíneo da mãe para o feto, com consequente diminuição da pressão parcial de oxigênio (PO_2) no sangue fetal (SIRISTATIDIS et al., 2004). Desta forma, cães recém-nascidos exibem acidose ao nascimento, que é tanto metabólica (BE e HCO_3) quanto respiratória (alta PCO_2), denominada acidose mista (LUCIO et al., 2009). A normalização destes valores é observada em 60 minutos após o nascimento, indicando que a hipoxemia é transitória (VASSALO et al., 2015).

Qualquer forma de distocia e falha na respiração pode causar sofrimento fetal por asfixia, gerando danos aos órgãos e morte dentro de um curto período de tempo. Aproximadamente 16% das cadelas sofrem distocia, e grande parte destas, precisam ser submetidas à cesariana. A realização de cesariana é um procedimento comum em pequenos animais (DOEBELI et al., 2013). Porém, pode levar à depressão neonatal pelos anestésicos administrados à fêmea, que muitas vezes impedem ou retardam o início da respiração neonatal, exarcebando a hipoxemia (TRAAS, 2008; BATISTA et al., 2014).

As distocias prolongam a duração da hipóxia e da anaerobiose neonatal. As consequências para os neonatos em hipoxemia grave serão declínio da frequência cardíaca (MOON et al., 2000; ZONE; WANKE 2001; VANNUCCHI et al, 2012; VANNUCCHI; LOURENÇO, 2015), bradipneia ou dispneia, acidose acentuada, hipercapnia (VANNUCCHI; LOURENÇO, 2015) e danos a tecidos com elevados requisitos de oxigênio, como o coração (VANNUCCI, 2000; MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2014). Após isquemia cardíaca em neonatos, são observadas histologicamente áreas generalizadas de infiltrado inflamatório agudo, necrose isquêmica grave e edema tecidual dentro do miocárdio afetado (WANG et al., 2020). Entretanto, há necessidade de mais subsídios para demonstrar que os quadros de hipóxia neonatal promovem lesão miocárdica considerável ao ponto de promover morte dos cardiomiócitos em cães.

Na cesariana, todos os anestésicos, incluindo os agentes inalatórios, ultrapassam a placenta e a barreira hematoencefálica do feto, levando a condição variável de depressão neonatal. Os cães recém-nascidos anestesiados durante a cesariana muitas vezes não conseguem iniciar a respiração espontânea, permanecendo apneicos, comprometendo ainda mais o quadro de asfixia, o que torna a reanimação uma medida necessária (DOEBELI et al., 2013; BATISTA et al., 2014; DAVIDSON, 2014).

A asfixia prolongada é considerada a principal causa de mais de 60% das perdas de filhotes da espécie canina (MUNNICH, 2008), o que demonstra a importância de avaliar as consequências dessa condição por meio de exames complementares ao nascimento, levando a uma melhor assistência do recém-nascido no pós-parto imediato.

2.2 Marcador bioquímico cardíaco: Troponina cardíaca I

O sarcômero cardíaco é formado por proteínas contráteis (actina, miosina e tropomiosina) e o complexo troponina. O complexo troponina regula a interação dos filamentos finos (actina e tropomiosina) e espessos (miosina) no músculo estriado cardíaco em resposta à concentração de cálcio intracelular (FARAH; REINACH, 1995; BADER et al., 2006; SOLÍS et al., 2018).

O complexo de troponina é construído de três proteínas. A troponina I (TnI) inibe a bomba de Mg-ATPase (afetando as interações miosina-actina). A troponina C (TnC) liga moléculas de cálcio, atraindo assim a TnI e liberando a inibição da bomba de Mg-ATPase, e a troponina T (TnT) que conecta a troponina à tropomiosina, expondo assim o sítio de ligação da actina à miosina (COUDREY, 1998; NEVES et al., 2016).

A TnC cardíaca é idêntica à TnC do músculo esquelético, mas a cTnI e a TnT diferem do músculo esquelético, pois são consideradas marcadores úteis na detecção de dano isquêmico miocárdico em adultos e recém-nascidos humanos (FARAH; REINACH, 1995; BADER et al., 2006; NEVES et al., 2016; JOSEPH et al., 2018). A TnI cardíaca não foi identificada fora do miocárdio, enquanto a TnT cardíaca pode ser encontrada em pequenas quantidades no músculo esquelético, contudo, em concentrações irrelevantes (BAISAN et al., 2016).

Existem três isoformas da TnI: duas formas esqueléticas (em músculos de contração rápida e lenta) e uma forma cardíaca. A TnI cardíaca (cTnI) é encontrada nos

átrios e ventrículos e contém uma cadeia amino-terminal N imunologicamente distinta que não é expressa nas formas esqueléticas (BODOR et al., 1995; BADER et al., 2006; NEVES et al., 2016).

As troponinas cardíacas são biomarcadores específicos de lesões cardiomiocíticas. A cTnI é liberada na circulação em altas concentrações em resposta à lesão cardíaca isquêmica e não isquêmica, durante a perda da integridade da membrana devido à destruição dos cardiomiócitos. Os níveis de troponina podem aumentar a partir dos estágios iniciais do dano tecidual miocárdico, tornando esse aumento da concentração sérica um marcador muito sensível e específico de lesão cardíaca (TURKER et al., 2004a; TURKER et al., 2004b; YILDIRIM et al., 2015; TAMILARASU; KUMARAVEL, 2017). Os níveis de troponina são determinados utilizando-se testes de imunoabsorção enzimática (ELISA), existindo também testes veterinários disponíveis para a troponina cardíaca I (BAISAN et al., 2016). A sensibilidade e especificidade dos níveis de troponina na detecção de danos cardíacos são mais elevados quando comparados aos métodos mais convencionais, como a detecção da isoenzima cardíaca creatina quinase MB, que possui menor especificidade (YILDIRIM et al., 2015).

Na Medicina Veterinária, a mensuração da concentração de cTnI pode ser utilizada para detectar lesão de células miocárdicas, decorrente de uma ampla variedade de causas (BAISAN et al., 2016; DUTTON et al., 2017). Várias doenças cardíacas e não cardíacas podem levar à lesão miocárdica secundária, o que acentua a importância da monitorização da função cardíaca (MATTIN et al., 2018). A troponina cardíaca I foi estudada em cães na detecção de lesão miocárdica em isquemias e miocardites, demonstrando maiores concentrações séricas de cTnI nos animais que passaram por eventos hipóxicos e injúrias miocárdicas, como anestesia (VASILJEVIC et al., 2018), convulsões (DUTTON et al., 2017), doenças infecciosas que demonstraram comprometimento cardíaco, como a parvovirose, doença de chagas, leishmaniose, erlichiose e dirofilariose (SIME et al., 2015; VARSHNEY et al., 2015; SILVA et al., 2016; VITT et al., 2016; CARRETÓN et al., 2017; FILIPPI et al., 2019) e cardiopatias, como a cardiomiopatia dilatada, doença valvar mitral degenerativa, e bloqueio atrioventricular (WINTER et al., 2017; MATTIN et al., 2018; WESSELOWSKI et al., 2018; KLUSER et al., 2019). Nestes estudos, a troponina cardíaca foi útil no diagnóstico de lesão miocárdica.

A troponina também é útil como fator prognóstico nas cardiopatias, identificando cães que estão em maior risco de óbito (MATTIN et al., 2018). Para determinar o prognóstico em pacientes afetados, a lesão miocárdica deve ser detectada o mais breve possível. Portanto, um teste precoce para uso em cães como a cTnI deve ser utilizado (MATTIN et al., 2018). Em cães adultos saudáveis o valor de referência da cTnI é de <0,006 a 0,05 ng/mL (WINTER et al., 2017).

Apesar de sua meia-vida biológica ser de 60 a 120 minutos em cães, possui boa faixa de diagnóstico devido a contínua liberação dessa proteína dos miofilamentos em degradação. A liberação lenta da troponina ligada às miofibrilas pode justificar esse extenso tempo de permanência na circulação (JAFFE et al. 1996; SHINDE et al., 2004; GUPTA & DE LEMOS, 2007).

A liberação de cTnI na circulação pode estar relacionada às áreas de necrose de cardiomiócitos de maneira irreversível, sendo o aumento da concentração proporcional à gravidade da injúria. Mas também está relacionada ao aumento da permeabilidade da membrana dos cardiomiócitos ocasionado por hipóxia, permitindo que somente a fração citosólica seja liberada de maneira reversível (MAIR, 1999; COLLINSON et al., 2001). Em cães, essa fração de troponina livre no citosol corresponde de 2 a 8% do total presente no cardiomiócito (SCHOBER et al., 2002).

A maior parte da cTnI é encontrada no aparato contrátil e é liberada por desintegração proteolítica. O rompimento das proteínas contráteis intracelulares como resultado de isquemia ocorre rapidamente, causando um pool citosólico (COLLINSON et al., 2001). Em recém-nascidos humanos que sofreram asfixia perinatal, o aumento dos níveis de troponina foram detectáveis no sangue do cordão umbilical e após o nascimento, com elevação significativa da concentração sérica nas próximas três, seis, oito e 24 horas (TURKER et al., 2004b; YILDIRIM et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

Em cães, a detecção sérica da troponina cardíaca após dano miocárdico é mais rápida que em humanos. No soro do cão adulto a troponina é detectável em quatro a seis horas e atinge um pico entre 10 e 16 horas (BAISAN et al., 2016), enquanto em humanos adultos os níveis de troponina começam a elevar-se a partir de quatro a 12 horas, e atingindo seu valor máximo entre 12 e 48 horas (WELLS; SLEEPER, 2008).

Não há estudos do uso de troponina cardíaca na detecção de lesão miocárdica em cães recém-nascidos. Na Medicina Veterinária, estudos com uso da cTnI em recém-nascidos foram realizados em potros (MOHAMED et al., 2013) e cabritos

(MOHAMED et al., 2013), que apresentavam sepse e distrofia muscular cardíaca, respectivamente. Estes estudos demonstraram maiores concentrações séricas de cTnI nos animais afetados, o que implica que o cTnI é liberada na circulação em resposta à lesão miocárdica em animais recém-nascidos. Esses estudos concluíram que a cTnI foi um marcador sensível e específico para lesão miocárdica (SLACK et al., 2008; MOHAMED et al., 2013).

Como o miocárdio tem uma alta necessidade de oxigênio, os efeitos cardíacos são frequentemente vistos na asfixia perinatal. A detecção de qualquer efeito cardíaco é crucial para o tratamento. Em neonatos humanos com asfixia, as concentrações de cTnI são maiores em relação a neonatos saudáveis, sugerindo a presença de dano miocárdico neste grupo de pacientes de alto risco (TREVISANUTO, 2006; TAMILARASU; KUMARAVEL, 2017). Em neonatos humanos, o valor de referência da cTnI para a predição de hipóxia perinatal é $\geq 0,35$ ng/ml (TURKER et al., 2004a; YILDIRIM et al., 2015). Já em cães recém-nascidos, estudos para se determinar o possível aumento da concentração de cTnI sérica em animais que sofreram hipoperfusão miocárdica por asfixia, bem como intervalos de referência são inexistentes.

Estudos com humanos comparando recém-nascidos com asfixia com não asfixiados (controle), ambos nascidos de parto vaginal ou cesariana, demonstraram valores significativamente maiores de troponina I e T no grupo com asfixia, e concluiu que as troponinas I e T podem se mostrar valiosas na avaliação do dano miocárdico na asfixia ao nascimento e como fator preditor de mortalidade (ZHOU et al., 2016; JOSEPH et al., 2018). Estudos avaliando os níveis de troponina cardíaca I e T no sangue do cordão umbilical também demonstraram maiores níveis de troponina cardíaca no grupo em hipóxia neonatal em relação ao controle, assim como em neonatos com escore Apgar <7 e com baixo peso ao nascimento (TURKER et al., 2004a; JAYASINGHE et al., 2015; YILDIRIM et al., 2015; MATHUR et al., 2017). E estudos avaliando a concentração da troponina cardíaca I e T no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos em bradicardia fetal e neonatal após o parto, demonstraram que os níveis de troponina foram mais elevados em relação aos neonatos não bradicárdicos (RAFATI et al., 2013; MATHUR et al., 2017). Portanto, a troponina é um importante indicador de hipóxia perinatal em recém-nascidos (TURKER et al., 2004a; TURKER et al., 2004b; MATHUR et al., 2017; ZHOU et al., 2016; JOSEPH et al., 2018). Apesar disso, os biomarcadores não são testes isolados e seus resultados devem ser avaliados

no contexto do histórico clínico, exame físico e outros testes diagnósticos (BAISAN et al., 2016; JOSEPH et al., 2018).

O uso de cTnI em cães neonatos, especialmente em relação à asfixia perinatal, ainda não foi estudado. A asfixia perinatal é um distúrbio multissistêmico e seus efeitos não se limitam ao sistema nervoso central (TAMILARASU; KUMARAVEL, 2017). A hipoxemia seguida de acidose está associada à insuficiência progressiva dos órgãos e, portanto, tem implicações para a função cardíaca que podem ser expressas como aumento da cTnI (BADER et al., 2006; MATHUR et al., 2017). Na medicina, o comprometimento cardíaco ocorre em cerca de 25% dos neonatos com asfixia. Muitas vezes, esse comprometimento cardíaco é negligenciado devido à falta de testes diagnósticos (TAMILARASU; KUMARAVEL, 2017).

No entanto, para que a cTnI seja útil como um marcador clínico de lesão miocárdica e possivelmente outras morbidades cardíacas perinatais, é fundamental definir se a liberação ocorre em cães neonatos em hipóxia em condições clínicas favoráveis (não asfixiados) e em recém-nascidos com asfixia (BADER et al., 2006; TAMILARASU; KUMARAVEL, 2017). O primeiro passo é a avaliação da asfixia perinatal, que pode ser diagnosticada de forma direta pela avaliação da hipoxemia nos exames de hemogasometria, lactato sérico e saturação de O₂, e de forma indireta por exame clínico (escore Apgar modificado).

Os biomarcadores cardíacos representam um novo passo nos métodos de diagnóstico neonatal na Medicina Veterinária e humana, com as principais vantagens de precisão (BAISAN et al., 2016). A troponina pode ser utilizada como teste de triagem no diagnóstico de disfunção miocárdica em recém-nascidos com asfixia a termo, especialmente em situações de recursos limitados, onde as instalações para ecocardiografia não estão disponíveis (JOSEPH et al., 2018). Esses testes auxiliam o clínico a formulação de um diagnóstico correto, tratamento precoce, e também podem prever morbidade e mortalidade (BAISAN et al., 2016; JOSEPH et al., 2018).

2.3 SEPSE NEONATAL

Durante o período perinatal, filhotes estão comumente sob risco de contraírem diversas doenças infecciosas, uma vez que o sistema imune não está completamente

desenvolvido. As taxas de morbimortalidade são essencialmente mais elevadas do que em adultos (PRATS, 2005; PETERSON; KUTZLER, 2011). Em 65% dos cães recém-nascidos (MORTALIDADE TARDIA), a mortalidade pode ser atribuída às infecções bacterianas (MELONI et al., 2014), e a frequência das diferentes gravidades varia, cerca de 36% são infecções locais, 27,6% são sepse ou choque séptico e 36,4% são infecções sistêmicas (MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2014).

A sepse é a principal causa de perdas em ninhadas de cães durante os primeiros 21 dias de idade (DANIELS; SPENCER, 2011). Os principais agentes bacterianos envolvidos em infecções perinatais são *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia psittaci*, *Ureaplasma* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., entre outros (SORRIBAS, 2013; MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2014).

A mãe e o ambiente são as fontes mais comuns de infecção da ninhada. Infecções maternas clínicas ou subclínicas podem constituir uma importante fonte de infecção para fetos e neonatos (EVERMANN; KENNEDY, 2001), e como a resistência à infecções é mínima em pacientes recém-nascidos, eles serão suscetíveis inclusive às bactérias comensais da microbiota vaginal e de outras mucosas da fêmea (PRATS, 2005; SORRIBAS, 2013). Filhotes estarão mais predispostos às infecções caso não ocorra à ingestão de colostro logo após o nascimento, visto que apresentarão falha na transferência da imunidade passiva. Além disso, a falta de higiene ambiental predispõe à sobrevivência de diversos patógenos que podem ameaçar a vida dos filhotes (PETERSON; KUTZLER, 2011).

Muitos agentes infecciosos são transmitidos por via intrauterina, pelo trato genital infectado no momento do parto, pelo leite e secreções oronasais maternas, por contactantes e pelo ambiente contaminado (SORRIBAS, 2013; MELONI et al., 2014). As infecções perinatais por agentes bacterianos podem ocasionar morte embrionária, reabsorção, maceração fetal, abortamento, mumificação fetal, natimortalidade, mortalidade neonatal e nascimento de filhotes fracos, debilitados e em sepse (MELONI et al., 2014).

A fêmea pode não demonstrar sinais clínicos, muitas vezes a infecção é restrita ao útero, com ausência de alterações sistêmicas na cadela. Contudo, os agentes infecciosos podem ter efeitos fatais nos fetos ou nos recém-nascidos (SAGER; REMMERS, 1990; SORRIBAS, 2013; OGBU et al., 2016). Em muitos casos, a infecção neonatal pode passar despercebida se a avaliação clínica minuciosa do recém-nascido

não for realizada e, conseqüentemente ocorrerá o definhamento neonatal e a mortalidade da ninhada.

Logo após o nascimento, a ausência de desinfecção do cordão umbilical e a cavidade oral materna contaminada também são importantes fatores para entrada de agentes bacterianos por via umbilical, podendo ocasionar onfaloflebite, abscessos, peritonite e sepse (LOURENÇO, 2015). Outra causa importante é a infecção neonatal pelo leite materno, mastites clínicas e subclínicas na cadela promovem a secreção de bactérias e toxinas no colostro ou leite, que será ingerido pelo filhote, resultando em infecção e manifestação da síndrome do leite tóxico, que pode evoluir para sepse (SORRIBAS, 2013; LOURENÇO, 2015; VANNUCCHI; LOURENÇO, 2015).

A sepse é uma infecção generalizada com presença de disfunção orgânica, causada pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica, podendo evoluir para a síndrome da disfunção múltipla dos órgãos, choque e óbito (QUINTANA, 2015; MONTEALEGRE-GOLCHER, 2018). Os filhotes acometidos podem demonstrar depressão, letargia, tônus muscular e reflexos reduzidos ou ausentes. Desta forma, reduzem a procura pela glândula mamária e devido ao reflexo de sucção reduzido, param de mamar e desenvolvem quadros de hipoglicemia, hipotermia e desidratação (triade neonatal). Podem também manifestar sinais clínicos de infecção sistêmica, como eritema corporal, onfalite/onfaloflebite, hematúria, diarreia, proctite, extremidades de membros e cauda cianóticas ou necrosadas, bradicardia, dispneia, epistaxis, hipotensão e evolução para choque séptico (SORRIBAS, 2013; LOURENÇO, 2015; VANNUCCHI; LOURENÇO, 2015).

Devido à imaturidade imunológica e de outros sistemas orgânicos, a sepse neonatal pode ter evolução hiperaguda e alta mortalidade na ninhada (DANIELS; SPENCER, 2011; MUNNICH; KUCHENMEISTER, 2014). Desta forma, as chances de sobrevivência dos filhotes serão maiores se a sepse for diagnosticada precocemente e o tratamento instituído rapidamente.

O diagnóstico da sepse neonatal envolve a avaliação clínica e realização de exames laboratoriais, como leucograma, cultura bacteriana e antibiograma. A interpretação dos exames complementares deve seguir os parâmetros de referência de acordo com a semana de idade do neonato (LOURENÇO, 2015). A terapia para sepse neonatal não deve esperar pelo resultado da cultura e antibiograma, o tratamento empírico deve ser empregado com base na experiência do clínico e na avaliação clínica minuciosa, e após o resultado do exame, o tratamento pode ser alterado caso necessário

(FITZGERALD; NEWQUIST, 2011; MUNNICH; KUCHENMEISTER, 2014). A terapia de neonatos acometidos envolve a seleção de antibióticos com amplo espectro, e que ao mesmo tempo seja seguros para recém-nascidos (DANIELS; SPENCER, 2011; FITZGERALD; NEWQUIST, 2011).

Devido às particularidades fisiológicas dos neonatos com relação à imaturidade dos diversos sistemas orgânicos, o clínico deve conhecer as características destes pacientes para a escolha do fármaco adequado. A capacidade de metabolizar fármacos é reduzida em cães recém-nascidos. O sistema hepático microsomal P450 responsável pela biotransformação de fármacos é imaturo, fármacos que necessitem de metabolização hepática devem ser evitados ou utilizados com cautela (RICKARD, 2011; LOURENÇO, 2015). A depuração renal é reduzida, pois a taxa de filtração glomerular também não está completamente desenvolvida. Além disso, outras características farmacocinéticas do paciente neonato devem ser levadas em consideração, como a maior porcentagem de água corporal, menor quantidade de gordura corporal, menor concentração de albumina e menor ligação de proteínas plasmáticas (MATA; PAPICH, 2011; RICKARD, 2011). Desta forma, o volume de distribuição de fármacos hidrossolúveis é maior, atingindo uma menor concentração plasmática, com isso, a dose utilizada em neonatos pode ser maior. Já o volume de distribuição dos fármacos lipossolúveis é menor, aumentando sua concentração plasmática e consequentemente o risco de toxicidade. Assim, a dose dos fármacos lipossolúveis deve ser reduzida (GRUNDY, 2006; MATA; PAPICH, 2011; RICKARD, 2011; LOURENÇO, 2015). Os antimicrobianos das classes das cefalosporinas e penicilinas são fármacos hidrossolúveis de amplo espectro de ação, recomendados na terapêutica neonatal, já que podem ser utilizados com segurança nestes pacientes (DANIELS; SPENCER, 2011; FITZGERALD; NEWQUIST, 2011; LOURENÇO, 2015).

Além da antibioticoterapia, a estabilização do paciente em tríade (hipotermia, hipoglicemia, desidratação), bem como o suporte nutricional e imunológico, será essencial para a sobrevivência neonatal. A tríade deve ser revertida com fluidoterapia aquecida com solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) ou ringer lactato, na dose de 4 ml por 100 gramas de peso, por via intravenosa, intraóssea ou subcutânea. Reposição de glicose 12,5%, na dose de 0,5 ml por 100 gramas de peso, por via intravenosa, intraóssea ou via oral, e aquecimento gradual do neonato hipotérmico, com temperatura

ambiental controlada e adequada de acordo com a semana de idade do paciente (LOURENÇO, 2015).

Em cães recém-nascidos, o sistema imune é imaturo e de reatividade lenta, resultando em maior risco de morte. Para garantir a saúde e a sobrevivência do recém-nascido, uma adequada resposta imune é essencial (PETERSON; KUTZLER, 2011; KLEIN et al., 2013; CHASTANT; MILA et al., 2019). A passagem de imunoglobulinas por via transplacentária é mínima em cães, cerca de 5% a 10%. Isto ocorre devido ao tipo de placenta endoteliocorial, possuindo quatro camadas de tecido separando o sangue materno do fetal (PETERSON; KUTZLER, 2011). Desta forma, cães recém-nascidos dependem completamente da transferência passiva de anticorpos por meio do colostro (RICKARD, 2011; MILA et al., 2017; CHASTAT-MAILLARD; MILA, 2019). Nos casos em que a ingestão de colostro foi inadequada, um suporte imune deve ser realizado para auxiliar os recém-nascidos no combate à infecção. Uma fonte de imunidade passiva deve ser administrada por meio de um substituto do colostro comercialmente disponível, banco de colostro/ordenha de uma lactante, soro ou plasma sanguíneo, ou produtos à base de ovo em pó hiperimunizado (MILA et al., 2017; CHASTAT-MAILLARD; MILA, 2019).

Além disso, o suporte nutricional de pacientes doentes é essencial para a prevenção da tríade neonatal. Filhotes apáticos e com reflexo de sucção reduzido ou ausente, devem ser alimentados por sonda orogástrica até a melhora clínica e retorno dos reflexos. Pode-se realizar a ordenha da lactante ou instituir um sucedâneo do leite materno (LOURENÇO, 2015).

A sepse é uma afecção comum na rotina neonatal, contudo, há falha na identificação precoce dos sinais clínicos apresentados por estes pacientes, consequentemente o tratamento é negligenciado ou tardio, ocorrendo alta mortalidade na ninhada. Isto pode ocorrer pelo desconhecimento do clínico sobre as particularidades e afecções neonatais, bem como, pela falha na instrução aos tutores sobre a monitorização da ninhada para identificação de neonatos em risco, como a observação de sinais de infecção neonatal e a falha no ganho de peso.

Desta forma, é fundamental o conhecimento em neonatologia pelo médico veterinário. A identificação precoce do neonato doente leva à assistência adequada e maior chance de sobrevivência neonatal. Estudos sobre a sepse neonatal em cães beneficiam a conduta clínica e reduzem a taxa de mortalidade destes pacientes.

3 HIPÓTESES

O estudo pressupôs que os cães recém-nascidos com asfixia teriam um nível sérico significativamente elevado de troponina cardíaca I (cTnI) em comparação aos recém-nascidos não asfixiados, demonstrando dano miocárdico isquêmico por hipóxia grave. Bem como, correlações entre a cTnI e os demais parâmetros da hemogasometria. O estudo presume que a cTnI poderá ser utilizada como um indicador de hipóxia perinatal e como preditora de lesão isquêmica do miocárdio em neonatos.

O estudo da sepse neonatal pressupôs que esta afecção em cães apresentaria uma alta taxa de morbimortalidade. Bem como, que a avaliação clínica e o diagnóstico da sepse em neonatos divergiriam de um animal adulto, demonstrando particularidades clínicas e laboratoriais que são fundamentais para uma adequada conduta clínica e maior sobrevivência destes pacientes.

4 OBJETIVOS

Avaliar os níveis de troponina cardíaca I (cTnI) em cães recém-nascidos com asfixia e não asfixiados, oriundos de parto eutócico e cesariana emergencial devido às distocias. Bem como, correlacionar os níveis de troponina I com o escore Apgar modificado, saturação de oxigênio, lactato, glicemia e hemogasometria.

Descrever a incidência de sepse em cães neonatos, demonstrando os aspectos clínicos e laboratoriais envolvidos, os principais agentes bacterianos encontrados, tratamento, fatores de risco e taxas de mortalidade.

CAPÍTULO II

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Uso da troponina cardíaca I (cTnI) no diagnóstico de lesão miocárdica por asfixia perinatal em cães neonatos

Keylla Helena Nobre Pacífico Pereira¹, Viviane Yukari Hibar¹, Kárita da Mata Fuchs¹, Luiz Eduardo Cruz dos Santos Correia², Maria Denise Lopes³, João Carlos Pinheiro Ferreira³, Fabiana Ferreira de Souza³, Luiz Henrique de Araújo Machado¹, Simone Biagio Chiacchio¹, Maria Lucia Gomes Lourenço¹.

¹Veterinary Neonatology Research Group, São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Clinics, Botucatu, Brazil.

²São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Improvement and Nutrition, Botucatu, Brazil.

³São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, Botucatu, Brazil.

Resumo

A asfixia perinatal prolongada e consequente hipóxia grave é a principal causa de mortalidade em cães neonatos nos primeiros dias de vida. Na medicina, biomarcadores cardíacos específicos como a troponina I, são utilizados para diagnosticar lesão miocárdica isquêmica e não isquêmica, em recém-nascidos com asfixia durante o nascimento. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar os níveis de troponina cardíaca I (cTnI) em cães recém-nascidos com asfixia e não asfixiados, correlacionando com a avaliação do escore Apgar modificado, saturação de oxigênio, glicemia, lactatemia e hemogasometria. O estudo visou determinar o possível uso da troponina I como marcador de lesão isquêmica do miocárdio em cães neonatos. Foram avaliados 15 animais no grupo parto eutócico (GE), 15 animais no grupo cesariana (GC) e 13 animais no grupo hipóxia (com asfixia) (GH). Os animais do grupo com asfixia foram provenientes de partos distócicos, nascidos de parto vaginal ou cesariana. Todos os grupos foram avaliados ao nascimento e após 60 minutos. Os recém-nascidos dos grupos GE e GC apresentaram acidose mista (respiratória por aumento pCO₂ e metabólica por redução do pH, HCO₃, BEecf e aumento do lactato), em decorrência de hipoxemia fisiológica transitória ao nascimento. Os níveis de troponina I apresentaram-se dentro dos padrões de referência para cães hígidos em ambos os grupos. Não houve correlação entre a troponina I e os demais parâmetros no GE e GC. No GH os recém-nascidos exibiram acidose mista proeminente (p<0,05) em comparação aos demais grupos, em decorrência da hipoxemia grave. Os parâmetros no escore de Apgar e hemogasometria demonstraram que estes cães nasceram com asfixia, apresentando

baixa vitalidade e necessidade de manobras reanimatórias. Os níveis de troponina I foram significativamente elevados em comparação ao GE e GC ($p < 0,05$) e estavam acima dos padrões de referência para cães hígidos, indicando lesão miocárdica isquêmica. Houve correlação negativa ($p < 0,05$) entre a troponina I e os parâmetros escore de Apgar, frequência cardíaca, SO_2 periférica, reflexos, e TCO_2 , e correlação positiva ($p < 0,01$) entre a troponina I e o lactato. O estudo demonstrou que cães recém-nascidos com asfixia possuem níveis séricos mais elevados de troponina I, desta forma, cães recém-nascidos em hipoxemia grave já exibem dano miocárdico isquêmico.

Palavras-chave: Asfixia, hipóxia, miocárdio, cesariana, filhote, neonatologia canina.

Introdução

O período neonatal em cães ainda possui elevados índices de mortalidade, variando entre 7 a 35%, e é maior logo após o parto e nos primeiros dois dias de vida (Gill, 2001; Indrebo et al., 2007; Veronesi et al., 2009; Konde et al., 2015; Chastant-Maillard et al., 2017). A principal causa de mortalidade durante este período está relacionada às consequências da hipóxia grave durante o parto. Esta condição é considerada a principal causa, correspondendo a mais de 60% das perdas de filhotes da espécie canina (Münnich, 2008; Münnich e Küchenmeister, 2014). Aproximadamente 90% das mortes de filhotes hipoxêmicos ocorrem durante os primeiros dois dias de idade (Münnich e Küchenmeister, 2014).

O nascimento é um período crítico de adaptação à vida extrauterina e um grande desafio para a sobrevivência neonatal. Entre as várias adaptações fisiológicas necessárias, o recém-nascido deve iniciar e manter uma respiração pulmonar adequada para garantir a eficiência das trocas gasosas (Lourenço e Machado, 2013; Mila et al., 2017). A falha na adaptação respiratória em filhotes a termo geralmente está associada à asfixia perinatal, e consequente hipóxia grave, resultando em maiores taxas de mortalidade no período de transição (Moon et al., 2001; Indrebø et al., 2007; Münnich, 2008; Lourenço, 2015).

A asfixia prolongada está relacionada a vários fatores, incluindo as condições obstétricas, distocias, partos prolongados e a depressão anestésica induzida durante a cesariana (Silva et al., 2009; Vannucchi et al., 2012; Batista et al., 2014), que muitas vezes impedem ou retardam o início da respiração neonatal, tornando a reanimação uma medida necessária (Moon et al., 2001; Indrebø et al., 2007; Münnich, 2008; Lourenço, 2015).

As principais consequências para os neonatos em hipóxia grave serão bradicardia e hipoperfusão tecidual (Moon et al., 2000; Zone; Wanke 2001; Vannucchi et al., 2012; Vannucchi; Lourenço, 2015), bradipneia ou dispneia, acidose mista acentuada, hipercapnia (Vannucchi; Lourenço, 2015) e danos isquêmicos aos órgãos

com elevados requisitos de oxigênio, como o coração (Vannucci, 2000; Münnich; Küchenmeister, 2014).

Na medicina, marcadores bioquímicos cardíacos como a troponina I são utilizados logo após o nascimento para diagnosticar lesão miocárdica em neonatos que passaram por asfixia prolongada (Trevisanuto et al., 2006). Em cães adultos, a troponina cardíaca I é utilizada para detectar lesão miocárdica em isquemias, miocardites, bem como para fator prognóstico em cardiopatias (Vitt et al., 2016; Dutton et al., 2017; Mattin et al., 2018). Em animais recém-nascidos a troponina I foi avaliada e demonstrou ser um marcador sensível e específico para lesão miocárdica em potros (Slack et al., 2008) e cabritos (Mohamed et al., 2013) que apresentavam-se em sepse e em distrofia muscular cardíaca, respectivamente. Contudo, não há estudos da troponina cardíaca em cães recém-nascidos.

A troponina I é uma proteína que faz parte do sarcômero cardíaco, regulando a interação das proteínas contráteis (actina, miosina e tropomiosina) no músculo estriado, em resposta à concentração de cálcio intracelular (Farah; Reinach, 1995; Bader et al., 2006; Solís et al., 2018). Os níveis séricos de troponina I podem aumentar a partir dos estágios iniciais do dano tecidual miocárdico, pelo rompimento das proteínas contráteis, como resultado de lesão isquêmica e não isquêmica. Esta elevação na concentração sanguínea torna a troponina I um marcador sensível e específico de lesão cardíaca (Turker et al., 2004a; Turker et al., 2004b; Yildirim et al., 2015; Tamilarasu; Kumaravel, 2017).

A detecção de lesão miocárdica leva a possibilidade da assistência precoce ao recém-nascido, aumentando as chances de sobrevivência neonatal. Bem como, pode ser utilizada como um fator prognóstico em neonatos com asfixia. Como a hipóxia grave é a principal causa de mortalidade ao nascimento e nos primeiros dias de vida (Munnich, 2008; Münnich e Küchenmeister, 2014), é essencial avaliar as consequências desta condição por meio de exames complementares, levando a uma adequada conduta clínica ao recém-nascido no pós-parto imediato. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de troponina cardíaca I (cTnI) em cães recém-nascidos com asfixia, comparando-os com neonatos não asfixiados, oriundos de parto eutócico e cesariana emergencial devido às distocias.

Material e métodos

Este estudo foi realizado pelo Grupo de Pesquisa em Neonatologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, Brasil (dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/2627734671789524). O estudo incluiu 43 cães neonatos oriundos de nove ninhadas, atendidas nos Serviços de Reprodução de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ Unesp e em canis. Os animais foram incluídos no estudo somente após a aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais e a autorização dos tutores mediante a assinatura do termo de

consentimento livre e esclarecido, conforme as regras da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da instituição.

Os critérios de inclusão no estudo foram cadelas a termo, com desencadeamento dos sinais do parto, neonatos hipoxêmicos e não hipoxêmicos segundo a avaliação clínica, avaliação dos parâmetros do escore Apgar modificado e hemogasometria. Os critérios de exclusão deste estudo foram neonatos que apresentaram malformações congênitas e/ou outras alterações e afecções.

Foram avaliados neonatos em hipoxemia nascidos por cesariana e parto vaginal eutócico, considerando os valores de referência da hemogasometria neonatal conforme descrito por Lúcio et al., (2009) e Vassalo et al., (2015). Foram avaliados 43 animais, sendo 13 animais no grupo hipóxia (com asfixia), 15 animais no grupo parto eutócico (GE), e 15 animais no grupo cesariana (GC), estes oriundos de cesarianas emergenciais devido à distocias.

No grupo hipóxia (com asfixia) foram inclusos recém-nascidos provenientes de partos distócicos, nascidos de parto vaginal ou cesariana, com pelo menos três dos seguintes critérios: (1) bradicardia neonatal (≤ 180 bpm), (2) coloração cianótica das mucosas, (3) presença de mecônio no líquido amniótico e/ou no neonato, (4) Apgar modificado menor que 7 aos 5 minutos, (5) frequência respiratória < 15 mpm. Associado com pH do sangue menor que 7,2 ao nascimento, (7) pCO_2 (venoso) maior que 50,3 mmHg e pO_2 menor que 18,2 mmHg ao nascimento. Parâmetros do sangue venoso de cães neonatos de acordo com Lúcio et al., 2009 e Vassalo et al., 2015.

No grupo vaginal eutócico e cesariana (não asfixiados) foram inclusos recém-nascidos que cumpriram os seguintes critérios: (1) frequência cardíaca > 180 bpm, (2) mucosas avermelhadas, (3) Apgar modificado ≥ 7 aos cinco minutos, (4) frequência respiratória ≥ 15 mpm, (5) pH $\geq 7,2$, (5) $pCO_2 \leq 50,3$ mmHg e $pO_2 \geq 18,2$ mmHg ao nascimento. Parâmetros do sangue venoso de neonatos caninos de acordo com Lúcio et al., 2009 e Vassalo et al., 2015.

Procedimentos e avaliações realizadas

Foram inclusas no estudo cadelas em trabalho de parto, com idade entre um e 10 anos, em boas condições corporais, clinicamente saudáveis, desverminadas e vacinadas. Os partos foram considerados eutócicos quando os filhotes nasceram espontaneamente sem qualquer tipo de assistência ou manobra obstétrica. As cadelas encaminhadas à cesariana apresentavam sinais de distocia, tais como: atonia uterina, encarceramento de filhote no canal do parto por tamanho ou estática fetal, estreitamento do canal do parto avaliado por pelvimetria e bradicardia fetal < 180 bpm avaliado por ultrassonografia.

O protocolo anestésico das cesarianas foi realizado com indução com propofol intravenoso, em seguida anestesia epidural com lidocaína a 2%, e a manutenção

anestésica foi realizada com isoflurano diluído em oxigênio a 100%. Após a retirada dos filhotes do útero foi administrado às mães fentanil, por via intravenosa.

Ao nascimento (nos primeiros cinco minutos), os neonatos de todos os grupos foram identificados com fitas coloridas no pescoço e avaliados quanto ao escore Apgar modificado, reflexos (sucção, procura da mama e endireitamento vestibular), oximetria de pulso, peso, temperatura, bem como, foi colhida amostra de 0,5 ml de sangue pela veia jugular para os exames de hemogasometria, lactato, glicemia e troponina cardíaca I. Uma nova avaliação do escore Apgar modificado, reflexos, oximetria de pulso e uma nova amostra sanguínea para hemogasometria, lactato, glicemia e troponina I foi realizada após 60 minutos da primeira avaliação.

A avaliação de vitalidade e viabilidade neonatal pelo escore Apgar modificado e reflexos neonatais foram realizadas imediatamente após o nascimento (nos primeiros cinco minutos) e novamente após 60 minutos. As avaliações seguiram o proposto por Vassalo et al., 2015, nas tabelas 1 e 2.

No escore Apgar modificado avaliou-se a coloração das mucosas, frequência cardíaca e respiratória, tônus muscular e irritabilidade reflexa. A avaliação da frequência cardíaca foi realizada com auxílio de estetoscópio do lado esquerdo do tórax (Fig. 1), e a frequência respiratória pela observação dos movimentos torácicos. O reflexo irritabilidade foi avaliado pelo estímulo doloroso pressionado-se o o espaço interdigital. O tônus muscular foi determinado com o neonato na posição de supinação, observando-se movimentos ativos dos membros. A coloração das mucosas foi avaliada pela visualização da mucosa oral. Cada parâmetro recebeu uma pontuação de 0, 1 ou 2, de acordo com o apresentado pelo neonato (tab. 1), a soma identificou a vitalidade e viabilidade neonatal. A interpretação da pontuação foi avaliada pelo escore 0-3 vitalidade fraca, 4-6 vitalidade moderada e 7-10 vitalidade normal.



Figura 1. Avaliação da frequência cardíaca neonatal

Os reflexos foram avaliados quanto ao grau de depressão neonatal. O reflexo de sucção foi avaliado inserindo-se a ponta do dígito mínimo do examinador na boca do neonato. O reflexo de endireitamento foi estimulado colocando-se o neonato em decúbito dorsal sob uma superfície macia e aquecida. A resposta esperada deste reflexo

corresponde ao endireitamento corporal do neonato com retorno rápido ao decúbito ventral. Já o reflexo da procura da mama foi realizado colocando-se a mão do examinador próximo à face do neonato, que deve procurar a mama imediatamente. Cada reflexo recebeu uma pontuação de 0, 1 ou 2 (resposta ausente, fraca ou forte, respectivamente), a soma identificou a vitalidade neonatal. A interpretação da pontuação foi avaliada pelo escore 0-2 vitalidade fraca, 3-4 vitalidade moderada e 5-6 vitalidade normal.

Tabela 1. Escore Apgar modificado para cães neonatos (Vassalo et al., 2015).

Parâmetro/Pontuação	0	1	2
Coloração de mucosas	Cianótica	Pálida	Rósea
Frequência cardíaca	<100 bpm	<200 bpm	200 - 250 bpm
Frequência respiratória	Ausente <6 mpm	Fraca e irregular <15 mpm (6-15)	Regular e rítmica >15 mpm
Tônus muscular	Flácido	Alguma flexão de membro	Flexão
Irritabilidade reflexa	Ausente	Algum movimento	Choro evidente

Bpm= batimentos por minuto; mpm= movimentos por minuto.

Tabela 2. Sistema de avaliação dos reflexos neonatais em cães (Vassalo et al., 2015).

Reflexo/Pontuação	0	1	2
Sucção	Ausente	Fraco	Forte
Procura da mama	Ausente	Encaixe lento do focinho dentro da mão do examinador	Encaixe imediato do focinho dentro da mão do examinador
Endireitamento	Ausente (continua no decúbito de posicionamento)	Reposicionamento corporal lento	Reposicionamento corporal imediato



Figura 2. Colheita de sangue pela veia jugular.

O peso em gramas foi avaliado com balança digital pequena, a glicemia foi aferida com glicosímetro portátil (On Call Plus®). A temperatura corporal foi aferida com um termômetro digital por via retal, e a saturação periférica de oxigênio foi avaliada utilizando-se monitor de oximetria (R40VET Rzet®), disposto na região da artéria femoral dos cães neonatos.

A partir das amostras sanguíneas venosas (jugular), as análises da hemogasometria foram realizadas por meio de analisador clínico portátil (i-Stat® Portable Clinical Analyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, EUA), com cartuchos específicos CG4⁺ (Fig. 3). Os parâmetros determinados foram: lactato, potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de gás carbônico (PCO₂; mmHg), pressão parcial de oxigênio (PO₂; mmHg), dióxido de carbono (TCO₂; mM), bicarbonato (HCO₃⁻), excesso/déficit de bases (BE_{ecf}; mM) e saturação de oxigênio (sO₂). Baseando-se no valor de referência de cães neonatos, conforme descrito por Lúcio et al., (2009) e Vassalo et al., (2015).



Figura 3. Analisador clínico portátil e cartucho.

As análises da troponina cardíaca I foram realizadas por meio de cartucho descartável (kit específico cTnI) para uso no analisador clínico portátil (i-Stat 1® Portable Clinical Analyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, EUA). Baseando-se no valor de referência de cães adultos: <0,006 a 0,05 ng/mL, conforme descrito por WINTER et al., (2017).

Dados sobre a gestação (distocia, idade gestacional, primiparidade, administração de fármacos), sexo e temperatura foram registrados. Casos de mortalidade neonatal precoce (até 48 horas de vida) e tardia (até os 30 dias de vida) também foram registrados.

Análise estatística

As variáveis foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos, com utilização do procedimento GLM do programa estatístico SAS versão 9.2. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-smirnov. A comparação das médias/mediana entre os grupos foi realizada pelo ANOVA / Kruskal-Wallis para cada momento, considerando os efeitos de grupo, momento e interação grupo x momento. A correlação de Pearson foi realizada entre as variáveis para cada momento.

Todas as discussões foram realizadas no nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

Resultados

No grupo parto eutócico (GE), foram avaliados 15 cães neonatos das raças Lhasa Apso (3), Shih-tzu (2), Spitz Alemão (4) e American staffordshire terrier (6), ao nascimento e após 60 minutos.

Os parâmetros neonatais HCO_3 , TCO_2 , BEecf, lactato e glicemia diferiram significativamente entre os momentos ($p < 0,05$). Não houve correlação significativa entre a troponina I e os parâmetros avaliados. Os recém-nascidos apresentaram acidose mista (respiratória por aumento pCO_2 e metabólica por redução do pH, HCO_3 , e BEecf) por hipoxemia fisiológica transitória ao nascimento, contudo, os parâmetros obtidos no escore de Apgar e hemogasometria indicaram que os cães oriundos de parto eutócico não nasceram com asfixia (hipoxemia grave), apresentavam boa vitalidade e condições clínicas favoráveis (Fig. 5). Os níveis séricos de troponina I apresentaram-se dentro dos padrões de referência para cães hígidos, <0,006 a 0,05 ng/mL, conforme descrito por WINTER et al., (2017).

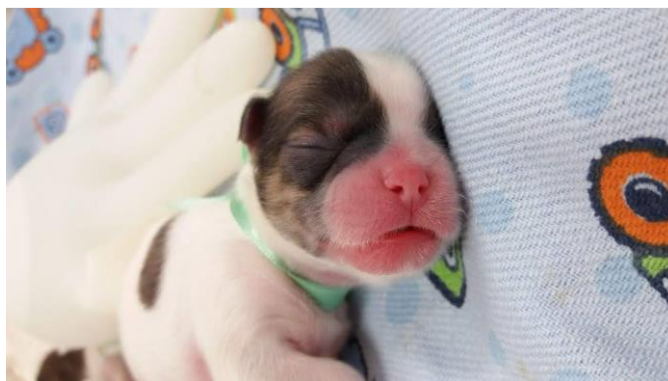


Figura 5. Neonato do GE em condições clínicas favoráveis.

No grupo cesariana (GC), foram avaliados 15 cães neonatos das raças Labrador (3), Bulldog francês (3), Cane corso (4), sem raça definida (5), ao nascimento e após 60 minutos. Houve diferença significativa entre os momentos ($p < 0,05$) para os parâmetros lactato, BEecf e temperatura. Não houve correlação entre a troponina I e os demais parâmetros.

Os recém-nascidos apresentaram acidose mista, proeminente em relação ao observado no GE, contudo, a hipoxemia foi transitória, observando-se evolução e melhora dos parâmetros após 60 minutos. Os níveis de troponina I foram superiores ao observado no GE, no entanto, mantiveram-se no limite superior dos padrões de referência para cães hígidos. Os parâmetros obtidos e avaliação clínica demonstraram que os cães oriundos do GC nasceram em hipoxemia com valores hemogasométricos superiores aos do GE, contudo, não asfixiados (hipoxemia grave).

No grupo hipóxia (com asfixia) (GH), foram avaliados 13 cães neonatos das raças Bulldog francês (4), Dachshund (1), Spitz Alemão (1), Shih-tzu (2) Golden retriever (1) e sem raça definida (4), ao nascimento e 60 minutos após.

Houve diferença significativa entre os momentos ($p < 0,05$) nos parâmetros escore Apgar, reflexos, FC, pH, pO_2 , pCO_2 , lactato, SO_2 , SO_2 periférica, TCO_2 , BEecf e temperatura. Houve correlação negativa ($p < 0,05$) entre a troponina I e os parâmetros escore de Apgar, frequência cardíaca, SO_2 periférica, reflexos, e pO_2 , com coeficientes de correlação -0,73; -0,68; -0,80; -0,71 e -0,46, COLOCAR O VALOR DE P PARA CADA respectivamente. Isto demonstrou que, quanto menor o escore de Apgar, FC, SO_2 periférica, reflexos e pO_2 nos cães recém-nascidos, mais elevados foram os níveis de troponina I sérica. Ainda, houve correlação positiva ($p < 0,01$) entre a troponina I e o lactato, coeficiente de correlação 0,81. Desta forma, no grupo hipóxia observou-se que quanto maior o nível de lactato sérico em cães recém-nascidos com asfixia, maiores os níveis de troponina I.

Os neonatos do GH apresentaram acidose mista proeminente em relação ao observado no GE e GC, em decorrência de uma hipoxemia grave (Fig. 6). Os parâmetros obtidos no escore Apgar e hemogasometria demonstram que estes cães nasceram com asfixia, apresentando baixa vitalidade e necessidade de manobras reanimatórias. Os níveis de troponina I estavam acima dos padrões de referência para cães hígidos, indicando lesão miocárdica isquêmica em consequência da hipoxemia grave. Foi observado melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais aos 60 minutos

(Fig. 8), após a realização de procedimentos reanimatórios (Fig. 7), como oxigenioterapia por máscara e administração de metilxantina (aminofilina 24 mg/ml; Dose: 0,2 ml por 100 gramas de peso, por via sublingual).

A média dos parâmetros avaliados, erro padrão, significância estatística entre momentos e grupos, e mínimo e máximo estão disponíveis na tabela 1.



Figura 6. Neonato com asfixia do GH (hipoxemia grave).



Figura 7. Procedimentos reanimatórios em neonato com asfixia.

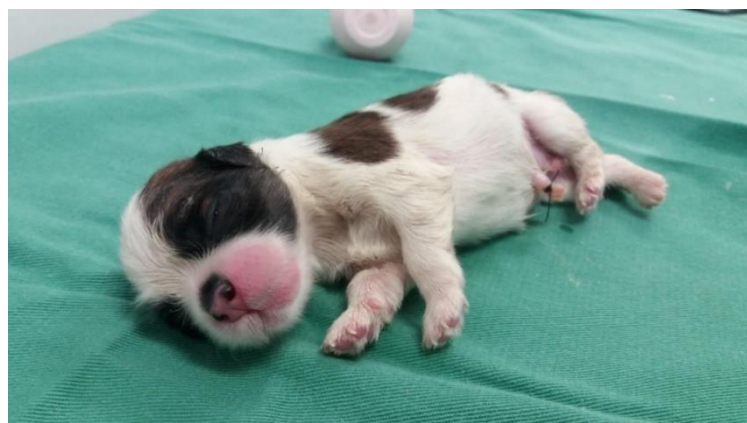


Figura 8. Melhora clínica do recém-nascido após procedimentos reanimatórios.

Na comparação entre os grupos parto vaginal eutócico (GE), cesariana (GC) e hipóxia (com asfixia) (GH), houve diferença significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros entre os grupos, entre os momentos, e interação grupo e momento.

Ao nascimento, o GH apresentou menor ($p < 0,05$) pontuação no escore Apgar ($4,8 \pm 1,1$) e reflexos ($1,8 \pm 1,6$), menor frequência cardíaca ($147,6 \pm 47,5$) e respiratória ($28,6 \pm 12,1$), pO_2 ($7,0 \pm 1,6$), SO_2 ($8,6 \pm 3,8$) e SO_2 periférica ($57,6 \pm 10,5$) em relação aos demais grupos. Bem como, demonstrou maior pCO_2 ($64,4 \pm 7,0$), TCO_2 ($28,2 \pm 5,8$), lactato ($4,8 \pm 2,8$) e glicemia ($122,6 \pm 13,4$) (ao nascimento), menor Beefc ($0,4 \pm 3,2$) e temperatura ($33,6 \pm 0,9$) (aos 60 minutos), e maior elevação sérica da troponina I ao nascimento ($0,15 \pm 0,05$) e aos 60 minutos após ($0,11 \pm 0,05$).

O GC apresentou ao nascimento menor SO_2 e maior TCO_2 em comparação ao GE, bem como maior pO_2 (aos 60 minutos) em comparação ao GH. O peso corporal foi maior em relação aos demais grupos.

O GE apresentou maior pO_2 , SO_2 e temperatura (ao nascimento) e glicemia (após 60 minutos), menor lactato e HCO_3 (ao nascimento) em comparação aos demais grupos.

Não houve mortalidade precoce ou tardia nos grupos estudados.

Tabela 1. Média e erro padrão dos parâmetros avaliados, erro padrão, significância estatística entre momentos e grupos, e mínimo e máximo.

Parâmetros	Grupos	Momentos	
		Ao nascimento	60 minutos após
Escore Apgar	Parto vaginal eutócico (GV)	$9,1 \pm 0,9^{aA}$ (8-10)	10 ± 0^{aA}
	Cesariana (GC)	$8,7 \pm 1,5^{aA}$ (6-10)	10 ± 0^{aA}
	Hipóxia (GH)	$4,8 \pm 1,1^{bB}$ (3-6)	$9,0 \pm 1,2^{aA}$ (7-10)
Troponina I	Parto vaginal eutócico	$0,02 \pm 0,01^{aC}$ ($<0,01$ -0,04)	$0,01 \pm 0,006^{aC}$ ($<0,01$ -0,03)
	Cesariana	$0,056 \pm 0,02^{aB}$ (0,03-0,07)	$0,054 \pm 0,02^{aB}$ (0,02-0,08)
	Hipóxia	$0,15 \pm 0,05^{aA}$ (0,11-0,25)	$0,11 \pm 0,05^{aA}$ (0,07-0,20)
Reflexos	Parto vaginal eutócico	$5,3 \pm 0,9^{aA}$ (3-6)	$6,0 \pm 0^{aA}$
	Cesariana	$5,1 \pm 1,07^{aA}$ (3-6)	$6,0 \pm 0^{aA}$
	Hipóxia	$1,8 \pm 1,6^{bB}$ (0-3)	$5,0 \pm 1,2^{aA}$ (3-6)
FC	Parto vaginal eutócico	$212,2 \pm 24,8^{aA}$ (164-248)	$224,0 \pm 9,6^{aA}$ (208-240)
	Cesariana	$222,0 \pm 24,2^{aA}$ (180-252)	$237,1 \pm 28,5^{aA}$ (200-276)
	Hipóxia	$147,6 \pm 47,5^{bB}$ (68-184)	$210,0 \pm 25,6^{aA}$ (190-252)
FR	Parto vaginal eutócico	$39,9 \pm 8,3^{aA}$ (28-52)	$41,3 \pm 11,7^{aA}$ (28-64)
	Cesariana	$40,0 \pm 14,8^{aA}$ (24-64)	$38,3 \pm 8,6^{aA}$ (24-44)
	Hipóxia	$28,6 \pm 12,1^{aB}$ (15-40)	$27,6 \pm 7,8^{aB}$ (20-36)

pH	Parto vaginal eutócico	7,12 ± 0,09 ^{aB} (7,0-7,3)	7,20 ± 0,04 ^{aA} (7,1-7,3)
	Cesariana	7,17 ± 0,07 ^{aB} (7,1-7,3)	7,27 ± 0,05 ^{aA} (7,2-7,3)
	Hipóxia	7,08 ± 0,13 ^{bB} (6,9-7,2)	7,28 ± 0,04 ^{aA} (7,2-7,3)
pCO ₂	Parto vaginal eutócico	43,2 ± 9,2 ^{bB} (29,2-58,2)	46,8 ± 8,6 ^{bB} (33,2-60,8)
	Cesariana	49,3 ± 7,6 ^{bB} (39-59,9)	48,9 ± 2,5 ^{bB} (45,7-52,5)
	Hipóxia	64,4 ± 7,0 ^{aA} (55,9-71,7)	52,8 ± 5,1 ^{bB} (47,8-60,2)
pO ₂	Parto vaginal eutócico	21,7 ± 7,9 ^{aA} (13-36)	21,4 ± 4,9 ^{aA} (17-35)
	Cesariana	13,7 ± 3,6 ^{aB} (8-19)	14,7 ± 1,7 ^{aA} (12-17)
	Hipóxia	7,0 ± 1,6 ^{bB} (5-9)	11,0 ± 1,0 ^{aB} (10-12)
HCO ₃	Parto vaginal eutócico	16,5 ± 4,4 ^{bB} (8,5-22)	21,7 ± 3,3 ^{aA} (16,5-26,9)
	Cesariana	23,2 ± 2,9 ^{aA} (19,8-27,1)	25,1 ± 1,3 ^{aA} (23-26,5)
	Hipóxia	25,7 ± 5,8 ^{aA} (19,9-32,5)	27,5 ± 3,2 ^{aA} (23,8-31,4)
SO ₂	Parto vaginal eutócico	31,4 ± 16,7 ^{aA} (11-57)	33,2 ± 8,8 ^{aA} (20-48)
	Cesariana	19,6 ± 11,1 ^{aB} (6-36)	19,9 ± 4,9 ^{aB} (15-30)
	Hipóxia	8,6 ± 3,8 ^{bC} (4-12)	14,0 ± 3,1 ^{aB} (10-18)
SO ₂ periférica	Parto vaginal eutócico	91,6 ± 13,6 ^{aA} (65-99)	99,0 ± 0 ^{aA}
	Cesariana	97,9 ± 1,9 ^{aA} (94-96)	99,0 ± 0 ^{aA}
	Hipóxia	57,6 ± 10,5 ^{bB} (48-74)	98,0 ± 1,0 ^{aA} (97-99)
TCO ₂	Parto vaginal eutócico	18,0 ± 4,6 ^{bC} (10-24)	23,4 ± 3,4 ^{aA} (18-29)
	Cesariana	25,1 ± 3,1 ^{aB} (21-29)	26,9 ± 1,1 ^{aA} (25-28)
	Hipóxia	28,2 ± 5,8 ^{bA} (22-35)	29,4 ± 3,0 ^{aA} (26-33)
BEecf	Parto vaginal eutócico	-12,5 ± 5,5 ^{bB} (-23 a -6)	-5,8 ± 3,1 ^{aC} (-10 a -1)
	Cesariana	-5,1 ± 3,0 ^{bA} (-8 a -1)	-1,7 ± 1,3 ^{aB} (-4 a 0)
	Hipóxia	-4,2 ± 7,4 ^{bA} (-13 a 4)	0,4 ± 3,2 ^{aA} (-4 a 4)
Lactato	Parto vaginal eutócico	2,3 ± 0,4 ^{aB} (1,70-2,70)	1,8 ± 0,3 ^{bA} (1,50-2,20)
	Cesariana	3,9 ± 1,4 ^{aB} (2,27-5,54)	2,3 ± 0,5 ^{bA} (1,80-3,17)
	Hipóxia	4,8 ± 2,8 ^{aA} (2,24-9,01)	2,1 ± 0,6 ^{bA} (1,43-2,88)
Glicemia	Parto vaginal eutócico	96,8 ± 15,4 ^{bB} (79-124)	156,8 ± 35,6 ^{aA} (96-205)
	Cesariana	97,3 ± 18,3 ^{aB} (76-122)	107,1 ± 20,7 ^{aC} (73-133)
	Hipóxia	122,6 ± 13,4 ^{aA} (109-138)	141,6 ± 41,3 ^{aB} (86-190)
Temperatura	Parto vaginal eutócico	34,4 ± 1,6 ^{aA} (32,5-37,0)	34,8 ± 1,0 ^{aA} (33,7-36,7)
	Cesariana	33,0 ± 0,9 ^{bB} (32,0-34,7)	34,4 ± 1,5 ^{aA} (32,7-36,4)
	Hipóxia	31,3 ± 2,2 ^{bB} (29,6-34,1)	33,6 ± 0,9 ^{aB} (32,6-34,6)

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas entre períodos de avaliação dentro do mesmo grupo (p<0,05).

^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas entre grupos no mesmo período de avaliação (p<0,05).

Discussão

Diversos estudos sobre a avaliação do escore Apgar e hemogasometria de cães neonatos oriundos de parto vaginal eutócico e cesariana foram publicados (Crissiuma et al., 2005; Lucio et al., 2009; Silva et al., 2009; Vivan, 2010; Vassalo et al., 2015). Assim como neste estudo, foi observada acidose mista, (com aumento da $p\text{CO}_2$ e redução do pH, HCO_3 , e BEecf e aumento do lactato sanguíneo), em decorrência de hipoxemia fisiológica transitória nos recém-nascidos, ocorrendo devido à redução do fluxo sanguíneo da mãe para o feto (induzidas pelas contrações uterinas durante o trabalho de parto), com consequente diminuição da pressão parcial de oxigênio ($p\text{O}_2$) no sangue fetal e hipóxia tecidual (Siristatidis et al., 2004).

Neste estudo, observou-se hipoxemia e acidose proeminentes em cães nascidos de cesariana em comparação ao parto vaginal eutócico, o que também foi demonstrado em outros estudos com cães recém-nascidos (Crissiuma et al., 2005; Lucio et al., 2009; Silva et al., 2009; Vivan, 2010; Vassalo et al., 2015). A $p\text{O}_2$ e a SO_2 apresentaram-se reduzidas e a consequente hipercapnia foi elevada no GC em relação ao GE. Isto ocorre principalmente pela exposição dos fetos aos anestésicos administrados à fêmea, e particularmente, no presente estudo, as cesarianas foram emergenciais em decorrência de distocias. Estas condições prolongam a duração da hipoxemia e da depressão cardiorrespiratória neonatal (Traas, 2008; Batista et al., 2014). Contudo, os neonatos não nasceram asfixiados (hipoxemia grave), observando-se hipoxemia fisiológica e evolução dos parâmetros e da vitalidade 60 minutos após o nascimento, assim como demonstrado em outros estudos que compararam cães nascidos de cesariana e parto vaginal eutócico (Lucio et al., 2009; Silva et al., 2009; Vassalo et al., 2015). Isto demonstra a adaptação do neonato à vida extrauterina (Vassalo et al., 2015).

No presente estudo, os neonatos (oriundos de distocia/cesariana) que apresentaram hipoxemia grave e acidose mista proeminente em relação ao observado no parto vaginal eutócico e cesariana, foram incluídos no grupo hipóxia (asfixiados). Este grupo demonstrou significativamente menor escore Apgar ($4,8 \pm 1,1$), frequência cardíaca ($147,6 \pm 47,5$) e respiratória ($28,6 \pm 12,1$), reflexos ($1,8 \pm 1,6$), $p\text{O}_2$ ($7,0 \pm 1,6$), SO_2 ($8,6 \pm 3,8$) e SO_2 periférica ($57,6 \pm 10,5$), em relação aos demais grupos, devido à hipoxemia grave e consequente hipóxia tecidual. Além disso, demonstrou significativamente maiores níveis de troponina I sérica. Na medicina, estudos comparando recém-nascidos asfixiados com não asfixiados (controle), demonstraram valores significativamente elevados de troponina I no grupo asfixiados, e concluiu que a troponina demonstra o dano miocárdico na asfixia ao nascimento (Zhou et al., 2016; Joseph et al., 2018). A troponina I no GH do presente estudo estava acima do padrão de referência para cães hígidos ($0,15 \pm 0,05$; $0,11 \pm 0,05$) ao nascimento e 60 minutos após, respectivamente, demonstrando o dano isquêmico do miocárdio em decorrência da asfixia prolongada.

Na medicina, estudos demonstraram que recém-nascidos com escore Apgar <7 , bradicardia e SO_2 abaixo da concentração fisiológica, além de níveis elevados de lactato, estavam associados com maiores níveis de troponina sérica (Turker et al., 2004; Jayasinghe et al., 2015; Yildirim et al., 2015; Mathur et al., 2017), o que também foi

demonstrado neste estudo, onde observou-se correlação negativa entre a troponina e os parâmetros escore Apgar, frequência cardíaca e SO_2 periférica, bem como, correlação positiva entre a troponina e lactato.

Ainda, em humanos, a elevação dos níveis de troponina em recém-nascidos está relacionada como um fator preditor de mortalidade (Zhou et al., 2016; Joseph et al., 2018). Neste estudo, não observamos mortalidade no grupo hipóxia (asfixiados), desta forma, é possível que a lesão miocárdica isquêmica observada no GH tenha sido reversível, já que os neonatos asfixiados passaram por procedimentos reanimatórios e a melhora clínica foi observada, com evolução dos parâmetros aos 60 minutos. A liberação de troponina na circulação pode estar relacionada às áreas de necrose de cardiomiócitos de maneira irreversível, ou de maneira reversível, pelo aumento da permeabilidade da membrana dos miócitos ocasionado por hipóxia grave, permitindo que somente a fração citosólica seja liberada (Mair, 1999; Collinson et al., 2001). Embora não tenha havido correlação entre elevação de troponina e óbitos no GH, a detecção precoce do dano miocárdico permitiu que as medidas terapêuticas fossem implantadas com rapidez para evitar a mortalidade.

Ao nascimento, grande parte dos recém-nascidos apresentaram-se hipotérmicos, em decorrência do contato com o líquido amniótico, e desta forma, permanecerem úmidos e rapidamente perderam calor para o ambiente, associado à imaturidade do sistema termorregulador (Prats et al., 2005; Peterson; Kutzler, 2011). Contudo, apesar da hipotermia, a temperatura corporal dos neonatos foi significativamente mais elevada no GE, possivelmente pelo contato imediato com a fêmea e pelo início da amamentação ser mais precoce, já que o colostro apresenta-se na temperatura corporal materna, o que auxilia na elevação e manutenção da temperatura corporal do recém-nascido (Peterson; Kutzler, 2011).

Após 60 minutos, o GH apresentou temperatura corporal significativamente menor em relação aos demais grupos. A queda inicial da temperatura corporal após o nascimento parece ser uma proteção fisiológica eficaz contra danos teciduais por hipóxia (Mott, 1961; Munnich; Kuchenmeister, 2014), e parece ser proeminente em recém-nascidos que passaram por hipóxia grave, como observado neste estudo. A hipotermia promove a queda da taxa metabólica, redução de processos inflamatórios e aumenta o tempo de sobrevivência (Mott, 1961; Munnich; Kuchenmeister, 2014; Silveira; Procianoy, 2015; Wassink et al., 2019).

A glicemia foi significativamente elevada no GH ao nascimento, em comparação aos demais grupos. Provavelmente isto ocorreu pela mobilização dos estoques de glicogênio hepático, em decorrência do estresse excessivo na asfixia prolongada (Peterson; Kutzler, 2011). Já aos 60 minutos do nascimento, foi observada maior glicemia no GE, devido a maior vitalidade destes recém-nascidos na primeira hora de vida e pelo início da amamentação mais precoce em relação aos demais grupos. Apesar dos neonatos do GH apresentar baixa vitalidade e menor reflexo de sucção, estes foram alimentados por sondagem orogástrica, com colostro ordenhado da fêmea (3 ml por 100 gramas de peso), evitando-se a hipoglicemia.

Este estudo concluiu que recém-nascidos que passaram por asfixia prolongada possuem menor vitalidade ao nascimento e necessitam de manobras reanimatórias. Estes neonatos possuem níveis mais elevados de troponina I no sangue, desta forma, cães recém-nascidos em hipoxemia grave já exibem dano miocárdico isquêmico agudo. Isto demonstra a importância da avaliação clínica e de exames complementares de cães ao nascimento, o diagnóstico precoce da hipoxemia grave e do dano miocárdico permite a assistência imediata ao recém-nascido, bem como a monitorização constante, aumentando a chance de sobrevivência destes pacientes. Além disso, para a redução de casos de asfixia prolongada e consequente hipóxia grave em cães, é essencial a realização de medidas preventivas, como o pré-natal, o parto assistido e o diagnóstico precoce de distocias, impactando na diminuição das taxas de mortalidade neonatal.

Funding

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant number 2019/21366-0. The funding agency FAPESP provided financial support for the execution of the study.

Referências

BADER, D.; KUGELMAN, A.; LANIR, A.; TAMIR, A.; MULA, E.; RISKIN, A. Cardiac troponin I serum concentrations in newborns: A study and review of the literature. *Clinica Chimica Acta*. v. 371, p. 61-65, 2006.

BAISAN, R. A.; DE ROSA, A.; DI LORIA, A.; VULPE, V.; PIANTEDOSI, D. Cardiac biomarkers in clinical practice of dog and cat – a review. *Human & Veterinary Medicine - International Journal of the Bioflux Society*. v. 8, n.1, p. 50-58, 2016.

BATISTA, M.; MORENO, C.; VILAR, J.; GOLDING, M.; BRITO, C.; SANTANA, M.; ALAMOUNIT, D. Neonatal viability evaluation by Apgar score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). *Animal Reproduction Science*, v. 146, p. 218–226, 2014.

BODOR, G. S.; PORTERFIELD, D.; VOSS, E. M.; SMITH, S.; APPLE, F. S. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clinical Chemistry*, v. 41, n. 12, p. 1710-1715, 1995.

CARRETÓN, E.; MORCHÓN, R.; MONTROYA-ALONSO, J. A. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in heartworm disease. *Parasites & Vectors*. v. 10, (Suppl 2), p. 151-163, 2017.

COLLINSON, P.O. et al. Measurement of cardiac troponins. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.38, n.5, p.423-449, 2001.

CORREALE, M.; NUNNO, L.; IEVA, R.; RINALDI, M.; MAFFEI, G.; MAGALDI, R.; BIASE, M. D. Troponin in Newborns and Pediatric Patients. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 4, p. 270-278, 2009.

COUDREY, L. The troponins. *Archives of internal medicine American Medical Association*. v. 158, n.11, p. 1173-1180, 1998.

CRISSIUMA, A. L. Venous blood gas analysis in dogs born by elective cesarean section during fetal-neonatal transition [dissertação]. Niterói: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2003.

CRISSIUMA, A. L.; LABARTHE, N. V.; SOARES, A. M. B.; JUPPA, C. J.; MANNARINO, R.; GERSHONY, L. C. Cardiorespiratory parameters and acid-basic changes in fetal-neonatal transition. *Revista Clínica Veterinária*, v. 57, p. 36-40, 2005.

DAVIDSON, A. P. Neonatal Resuscitation: Improving the Outcome. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 44, p. 191–204, 2014.

DOEBELI, A.; MICHEL, E.; BETTSCHART, R.; HARTNACK, S.; REICHLER, I. M. Apgar score after induction of anesthesia for canine cesarean section with alfaxalone versus propofol. *Theriogenology*, v. 80, p. 850–854, 2013.

DUTTON, E.; CARMICHAEL, N.; MICHAL, U.; CRIPPS, P. J.; BOSWOOD, A. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with generalised seizures. *Journal of Small Animal Practice*. v. 59, p. 167-173, 2017.

EEROLA, A.; POUTANEN, T.; SAVUKOSKI, T.; PETTERSSON, K.; SAIRANEN, H.; JOKINEN, E.; PIHKALA, J. Cardiac troponin I, cardiac troponin-specific autoantibodies and natriuretic peptides in children with hypoplastic left heart syndrome. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. v. 18, n. 1, p. 80-85, 2014.

FARAH, C. S.; REINACH, F. C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *The FASEB Journal*. v.9, n. 9, p.755-767, 1995.

FILIPPI, M. G.; LIMA, M. C. F.; PAES, A. C.; ALEIXO, A. S. C.; OBA, E.; SOUZA, F. F.; TAKAHIRA, R. K.; LOURENÇO, M. L. G. Evaluation of heart rate variability and behavior of electrocardiographic parameters in dogs affected by chronic Monocytic Ehrlichiosis. *PLoS One*, v. 14, n. 5, 2019.

GUPTA, S.; DE LEMOS, J.A. Use and misuse of cardiac troponins in clinical practice. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v.20, n.2, p.151-165, 2007.

GROPETTI, D.; PECILE, A.; DEL CARRO, A. P.; COPLEY, K.; MINERO, M.; CREMONESI, F. Evaluation of newborn canine viability by means of umbilical vein lactate measurement, apgar score and uterine tocodynamometry. *Theriogenology*, v.74, n.7, p.1187-1196, 2010.

HEIMENDAHL, A. V.; CARIOU M. Companion Animal Practice: normal parturition and management of dystocia in dogs and cats. In Practice. v. 31, p. 254–261, 2009.

INDREBØ, A.; TRANGERUD, C.; MOE, L. Canine neonatal mortality in four large breeds. Acta Veterinaria Scandinavica, v.49, (Suppl 1), p. 1-5, 2007.

JAFFE, A.S. et al. Comparative sensitive of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. Clinical Chemistry, v.42, n.11, p.1770-1776, 1996.

JAYASINGHE, S. B.; POTTER, J.; KECSKES, Z.; NOURI-GIRONES, F.; HICKMAN, P.; KOERBIN, G. Neonatal umbilical cord blood cardiac troponin as reflecting fetal growth, age and well being. In: Scientific sessions of faculty of medical sciences, 2015, Gangodawila. Proceedings of the Scientific sessions of faculty of medical sciences, Nº 44; Gangodawila. 2015.

JOSEPH, S.; KUMAR, S.; AHAMED, Z. M.; LAKSHMI, S. Cardiac troponin-T as a marker of myocardial dysfunction in term neonates with perinatal asphyxia. The Indian Journal of Pediatrics, v. 85, n. 10, p. 877-884, 2018.

KLUSER, L.; MAIER, E. T.; WESS, G. Evaluation of a high-sensitivity cardiac troponin I assay compared to a first-generation cardiac troponin I assay in Doberman Pinschers with and without dilated cardiomyopathy. Journal of Veterinary Internal Medicine. v. 33, n. 1, p. 54-63, 2019.

KONDE, A. M.; GITAU, G. K.; KIPTOON, J.; GAKUYA, D. Puppy morbidity and mortality among breeding kennels in Nairobi, Kenya. Jacobs Journal of Veterinary Science and Research. v.1, n.4, p. 1-7, 2015.

LOURENÇO, M. L. G. Cuidados com neonatos e filhotes. In: JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M.; DE ANDRADE NETO, J. P. Tratado de medicina interna de cães e gatos. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2015.

LOURENÇO, M. L. G.; MACHADO, L. H. A. Características do período de transição fetal-neonatal e particularidades fisiológicas do neonato canino. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 37, n. 4, p. 303-308, 2013.

LUCIO, C. F.; SILVA, L. C., RODRIGUES, J. A.; VEIGA, G. A.; VANNUCCHI, C. I. Acid–base changes in canine neonates following normal birth or dystocia. Reproduction in Domestic Animals, v.44, p.208-210, 2009.

MAIR, J. Tissue release of cardiac markers: from physiology to clinical applications. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v.37, n.11-12, p.1077-1084, 1999.

MARTIN, P. A.; CRUMP, M. H. 2003: The Adrenal Gland. In: PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. (eds). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Iowa State Press: Ames, IA, p. 165–200.

MATHUR, D.; GUPTA, P. K.; PUNJ, A. Role of 2D echo in neonates with perinatal asphyxia and its correlation with cardiac troponin T levels and creatine kinase MB. *International Journal of Medical Pediatrics and Oncology*. v. 3, n. 2, p. 71-74, 2017.

MATTIN, M. J.; BOSWOOD, A.; DB, I.; BRODBELT, D. C. Prognostic factors in dogs with presumed degenerative mitral valve disease attending primary-care veterinary practices in the United Kingdom. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, p. 1-13, 2018.

MENDES, T. A. B.; ANDREOLI, P. B. A.; CAVALHEIRO, L. V.; TALERMAN, C.; LASELVA, C. Adequação do uso do oxigênio por meio da oximetria de pulso: um processo importante de segurança do paciente. *Einstein*, v. 8, p.449-455, 2010.

MOHAMED, T.; FAHD, A.; MAHANA, E. Cardiac troponin I in healthy newborn goat kids and in goat kids with cardiac nutritional muscular dystrophy. *Acta Veterinaria Hungarica*. v. 61, n. 4, p. 442-453, 2013.

MOON, P. F.; ERB, H. N.; LUDDERS, J. W.; GLEED, R. D.; PASCOE, P. J. Perioperative risk factors for puppies delivered by cesarean section in the United States and Canada. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 36, p. 359-368, 2000.

MOON, P. F.; MASSAT, B. J.; PASCOE, P. J. Neonatal critical care. *Clinical Theriogenology*, v. 31, n.2, p. 343-367, 2001.

MOTT, J. C. The ability of young mammals to withstand total oxygen lack. *British Medical Bulletin*, v. 12. p. 2, 1961.

MÜNNICH, A. The pathological newborn in small animals: The neonate is not a small adult. *Veterinary Research Communications*, v. 32, (Suppl 1), p. 81-85, 2008.

MÜNNICH, A.; KÜCHENMEISTER, U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: Cornerstones of practical approach. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, (Suppl 2), p. 64–74, 2014.

NEVES, A. L.; HENRIQUES-COELHO, T.; LEITE-MOREIRA, A.; AREIAS, J. C. Cardiac injury biomarkers in paediatric age: Are we there yet? *Heart Failure Review*. v. 21, n.6, p. 771-781, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2018. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf?ua=1&ua=1>

PETERSON, M. E.; KUTZLER, M. A. *Small Animal Pediatrics*. 1. ed. Saint Louis: Elsevier, 2011.

PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. Síndrome hipóxico-isquêmica. *Jornal de Pediatria*, v. 77, p. 63-70, 2001.

RAFATI, S.; RABI, M.; BORNA, H. Cardiac troponin t levels of umbilical cord in neonates with abnormal fetal heart rate. *Iran Journal Pediatric*, v. 23, n. 1, p. 85-88, 2013.

RUTH, V. J.; RAIVIO, K. O. Perinatal brain damage: predictive value of metabolic acidosis and the Apgar score. *BMJ*, v. 297, p. 24–27, 1998.

SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; RODRIGUES, J. A.; VEIGA, G. A.; VANNUCCHI, C. I. Neonatal clinical evaluation, blood gas and radiographic assessment after normal birth, vaginal dystocia or caesarean in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44(2), p.160-163, 2009.

SLACK, J. A.; MCGUIRK, A. M.; ERB, H. N.; LIEN, L.; COOMBS, D.; SEMRAD, S. D.; RISEBERG, A.; MARQUES, F.; DARIEN, B.; FALLON, L.; BURNS, P.; MURAKAMI, M. A.; APPLE, F. S.; PEEK, S. F. Biochemical Markers of Cardiac Injury in Normal, Surviving Septic, or Nonsurviving Septic Neonatal Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 19, n. 4, p. 577-580, 2008.

SHINDE, S.B. et al. Relevant cardiac biochemical markers. *Bombay Hospital Journal*, v.46, n.4, 2004.

SILVA, L. C. G.; RODRIGUES, J. A.; VEIGA, G. A.; VANNUCCI, C. L. Neonatal clinical evaluation, blood gas and radiographic assessment after normal birth, vaginal dystocia or cesarean in dogs. *Reproduction in domestic animals*. v. 44, p. 160-163, 2009.

SILVA, V. B. C.; SOUSA, M. G.; ARAÚJO, C. R. A.; LIMA, A. B. G.; CARARETO, R. Cardiac biomarkers in dogs with visceral leishmaniasis. *Archivos de Medicina Veterinaria*. v. 48, p. 269-275, 2016.

SIME, T. A.; POWELL, L. L.; SCHILDT, J. C.; OLSON, E. J. Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. v. 25, n. 1, 765-769, 2015.

SIRISTATIDIS, C.; SALAMALEKIS, E.; KASSANOS, D.; LOGHIS, C.; CREATSAS, G. Evaluation of fetal intrapartum hypoxia by middle cerebral and umbilical artery Doppler velocimetry with simultaneous cardiotocography and pulse oximetry. *Archive of Gynecology and Obstetrics*, v. 270, p. 265–270, 2004.

SKOLNICK, A. A. Apgar quartet plays perinatologist's instruments. *Journal of the American Medical Association*, v. 276, n. 24, p. 1939–1940, 1996.

SOLÍS, C.; KIM, G. H.; MOUTSOGLU, M. E.; ROBINSON, J. M. Ca^{2+} and myosin cycle states work as allosteric effectors of troponin activation. *Biophysical Journal*, v. 115, n. 9, p. 1762-1769, 2018.

TAMILARASU, N.; KUMARAVEL, K. S. A study on cardiac troponin t in early diagnosis of myocardial injury due to perinatal asphyxia and its comparison with other modalities. *International Journal of Contemporary Pediatrics*. v. 4, n. 6, p. 2098-2102, 2017.

TRAAS A. M. Resuscitation of canine and feline neonates. *Theriogenology*, v. 70, p. 343–348, 2008.

TREVISANUTO, D.; PICCO, G.; GOLIN, R.; DOGLIONI, N.; ALTINIER, S.; ZANINOTTO, M.; ZANARDO, V. Cardiac troponin I in asphyxiated neonates. *Biology of the Neonate*. v. 89, p. 190-193, 2006.

TUKER, G.; BABAOGLU, K.; DUMAN, C.; GOKALP, A.; ZENGİN, E.; ARISOY, A. E. The effect of blood gas and Apgar score on cord blood cardiac troponin I. *The Journal of Maternal-fetal & Neonatal Medicine*. v. 16, n. 5, p. 315-319, 2004.

TUKER, G.; BABAOGLU, K.; GOKALP, A.; SARPER, N.; ZENGİN, E.; ARISOY, A. Cord blood cardiac troponin i as an early predictor of short-term outcome in perinatal hypoxia. *Biology of the neonate*. v. 86, p. 131-137, 2004.

VANNUCCI, R. C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology*. v. 17, n.3, p. 113-120, 2000.

VANNUCCHI, C. I.; ABREU, R. A. Cuidados básicos e intensivos com o neonato canino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 41, n. 1, p. 151-156, 2017.

VANNUCCHI, C. I.; LOURENÇO, M. L. G. Neonatologia. In: CRIVELLENTI, L. Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S. Casos de rotina em medicina veterinária de pequenos animais. 3 ed. São Paulo, SP: Medvet, 2015.

VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G.; LÚCIO, C. F.; REGAZZI, F. M.; VEIGA, G. A. L.; ANGRIMANI, D. S. Prenatal and Neonatal Adaptations with a Focus on the Respiratory System. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p. 177–181, 2012.

VARSHNEY, J. P.; DESHMUKH, V. V.; CHAUDHARY, P. S. Evaluation of myocardial injury in acute canine monocytic ehrlichiosis. *Intas Polivet*. v. 16, n.2, p. 340+, 2015.

VASILJEVIC, M.; KRSTIC, V.; STANKOVIC, S.; ZRIMSEK, P.; SVETE, A. N.; SELISKAR, A. Cardiac troponin I in dogs anaesthetized with propofol and sevoflurane: the influence of medetomidine premedication and inspired oxygen fraction. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. v. 45, n. 6, p. 745-753, 2018.

VASSALO, F. G.; SIMÕES, C. R. B.; SUDANO, M. J.; PRESTES, N. C.; LOPES, M. D.; CHIACCHIO, S. B.; LOURENÇO, M. L. G. Topics in the routine assessment of newborn puppy viability. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 30, p. 16-21, 2015.

VERONESI, M. C.; PANZANI, S.; FAUSTINI, M.; ROTA, A. An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*, v. 72. p. 401– 407, 2009.

VILAR, J. M.; BATISTA, M.; PÉREZ, R.; ZAGORSKAIA, A.; JOUANISSON, E.; DIAZ-BETRANA, L.; ROSALE, S. Comparison of 3 anesthetic protocols for the elective cesarean-section in the dog: Effects on the bitch and the newborn puppies. *Animal Reproduction Science*, v. 190, p. 53-62, 2018.

VITT, J. P.; SAUNDERS, A. B.; O'BRIEN, M. T.; MANSELL, J.; AJITHDOSS, D. K.; HAMER, S. A. Diagnostic Features of Acute Chagas Myocarditis with Sudden Death in a Family of Boxer Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 30, n. 4, p. 1210-1215, 2016.

VIVAN, M. C. R. Correlation between seric lactate and neurological and cardiorrespiratory status in neonate dogs born by normal birth or cesarean section under inhalatory anesthesia [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.

WELLS, S. M.; SLEEPER, M. Cardiac troponins. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. v. 18, n. 3, p. 235–245, 2008.

WESSELOWSKI, S.; CUSAK, K.; GORDON, S. G.; JEFFERY, N.; SAUDERS, A. B. Artificial cardiac pacemaker placement in dogs with a cohort of myocarditis suspects and association of ultrasensitive cardiac troponin I with survival. *Journal of Veterinary Cardiology*. p. 1-12, 2018.

WIBERG, N.; KALLÉN, K.; OLOFSSON, P. Delayed umbilical cord clamping at birth has effects on arterial and venous blood gases and lactate concentrations. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 115, p. 697–703, 2008.

WINTER, R. L.; SAUNDERS, A. B.; GORDON, S. G.; MILLER, M. W.; FOSGATE, G. T.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Biologic variability of cardiac troponin I in healthy dogs and dogs with different stages of myxomatous mitral valve disease using standard and high-sensitivity immunoassays. *Veterinary Clinical Pathology*. v.46, n. 2, p. 299-307, 2017.

YILDIRIM, A.; OZGEN, F.; UCAR, B.; ALATAS, O.; TEKIN, N.; KILIC, Z. The Diagnostic Value of Troponin T Level in the Determination of Cardiac Damage in Perinatal Asphyxia Newborns. *Fetal and Pediatric Pathology*. v. 35, n. 1, p. 29-36, 2015.

ZHOU, W. J.; YU, F.; SHI, J.; YANG, H.; ZOU, S. J.; JIANG, Y. M. Serum levels of cardiac troponin i in asphyxiated neonates predict mortality. *Clinical Laboratory*. v. 62, n. 8, p. 1427-1434, 2016.

ZONE, M. A.; WANKE, M. M. Diagnosis of canine fetal health by ultrasonography. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 57, p. 215–219, 2001.

Sepse neonatal em cães - incidência, aspectos clínicos e mortalidade

Keylla Helena Nobre Pacifico Pereira¹, Kárita da Mata Fuchs¹, Viviane Yukari Hibarú¹, Luiz Eduardo Cruz dos Santos Correia², João Carlos Pinheiro Ferreira³, Fabiana Ferreira de Souza³, Luiz Henrique de Araújo Machado¹, Simone Biagio Chiacchio¹, Maria Lucia Gomes Lourenço¹.

¹Veterinary Neonatology Research Group, São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Clinics, Botucatu, Brazil.

²São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Improvement and Nutrition, Botucatu, Brazil.

³São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, Botucatu, Brazil.

Resumo

O período neonatal em cães permanece associado a altas taxas de mortalidade. A sepsé é a principal causa de perdas neonatais nas três primeiras semanas de vida. Além disso, a falha na avaliação clínica e no diagnóstico precoce do recém-nascido doente ainda é comum, resultando em cuidados inadequados, o que contribui para uma alta taxa de mortalidade. Assim, o objetivo deste estudo foi descrever a incidência de sepsé em cães recém-nascidos, os aspectos clínicos envolvidos, os principais agentes bacterianos isolados e as taxas de mortalidade, para facilitar o reconhecimento precoce dessa condição pelos clínicos. Das 152 ninhadas e 762 neonatos avaliados, 14,8% (113/762) apresentaram sepsé ou choque séptico, e a taxa de mortalidade entre os filhotes afetados foi de 25,6% (29/113). Entre os filhotes com sepsé que morreram, a mortalidade precoce (0 a 2 dias de idade) ocorreu em 69% (20/29) dos neonatos afetados, e a mortalidade tardia (3 a 30 dias de idade) ocorreu em 31% (9/29). Diferenças significativas ($p < 0,0001$) nos parâmetros clínicos (frequência cardíaca e respiratória, glicemia, temperatura corporal, saturação periférica de oxigênio e reflexos) foram observadas entre neonatos saudáveis e neonatos com sepsé e choque séptico. Os principais e mais relevantes sinais clínicos foram: apatia, redução do reflexo de sucção, diarreia, tríade neonatal, insuficiência de ganho de peso, bradicardia, dispneia, mucosas cianóticas, eritema corporal, redução da saturação periférica de oxigênio, cianose e necrose dos tecidos das extremidades. A mãe pode ter sido a principal fonte de infecção para 87,6% (99/113) dos neonatos com sepsé. A maioria das infecções foi transmitida durante a gestação (68%, 77/113) em casos de sepsé neonatal. A principal fonte de infecção para os neonatos foi o útero, seguido pelo leite materno e secreções orofaríngeas maternas. O agente bacteriano mais isolado foi a *Escherichia coli*,

responsável por 25,6% (29/113) dos casos de sepse. A morbidade e mortalidade da sepse neonatal em cães são altas. A avaliação clínica e o diagnóstico de sepse em neonatos diferem daqueles em animais adultos. Assim, o conhecimento das particularidades neonatais da sepse é essencial para o manejo clínico adequado e maior sobrevida desses pacientes.

Palavras-chave: Infecção bacteriana, neonato, filhote, cão recém-nascido, choque séptico.

Introdução

O período neonatal em cães corresponde às primeiras três a quatro semanas de vida [1-4], é um período desafiador para médicos veterinários e criadores, pois está associado à altas taxas de morbidade (34,7%) [5] e mortalidade (5,7 a 35%) [5-10] globalmente. As principais causas de morte durante o período neonatal estão associadas ao parto, fatores maternos, ambientais e infecções [3, 8]. Entre essas, as doenças infecciosas, especialmente as bacterianas, são a segunda causa mais comum de perda de filhotes, pós perdas devido à hipóxia grave durante o parto [11, 12].

Em cães, as infecções bacterianas podem afetar os recém-nascidos em vários graus, causando infecções locais e sistêmicas, sepse e progressão para choque séptico. No entanto, a sepse é a principal causa de mortalidade em cães durante as primeiras três semanas após o nascimento [11, 13].

A infecção sistêmica (bacteremia) é caracterizada pela presença de um ou mais agentes bacterianos na corrente sanguínea, resultando em uma resposta inflamatória sem disfunção celular ou orgânica. A sepse é caracterizada por síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) devido à infecção bacteriana generalizada aguda, culminando em vasodilatação sistêmica, hipoperfusão tecidual, disfunção celular e progressão para choque séptico, que é caracterizada por insuficiência circulatória aguda e hipotensão arterial persistente com conseqüente síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS) [14, 15]. Como a sepse pode causar mortalidade súbita na ninhada, ela deve ser diagnosticada o mais rápido possível e a antibioticoterapia deve ser instituída imediatamente. No entanto, o diagnóstico precoce das infecções neonatais muitas vezes não é realizado na prática clínica de rotina devido à falta de conhecimento sobre as doenças neonatais e à falha na avaliação clínica e na identificação precoce dos sinais clínicos apresentados por esses pacientes.

O desconhecimento implica diretamente na ausência de assistência adequada ao neonato doente, o que colabora com a alta mortalidade. Portanto, informações clínicas detalhadas sobre a sepse em cães recém-nascidos são cruciais para as intervenções clínicas, auxiliando o clínico no reconhecimento precoce da infecção nestes pacientes, bem como, para medidas preventivas em futuras ninhadas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi descrever a incidência de sepse em cães neonatos, demonstrando os aspectos

clínicos envolvidos, os principais agentes bacterianos isolados, tratamentos e taxas de mortalidade.

Material e métodos

Este estudo observacional foi realizado pelo Grupo de Pesquisa em Neonatologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, Brazil (dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/2627734671789524). O estudo incluiu 762 cães neonatos oriundos de 152 ninhadas de diversas raças, atendidas nos Serviços de Clínica e de Reprodução de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ Unesp, em 2019 e 2020. Os animais foram incluídos no estudo somente após a aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais e a autorização dos tutores mediante à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme as regras da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da instituição.

Foram incluídas no estudo fêmeas com idade entre um a oito anos de idade, e seus respectivos recém-nascidos de parto vaginal, cesariana ou em atendimento clínico durante o período neonatal (até 30 dias de idade). Os critérios de inclusão no estudo foram neonatos com infecções clinicamente diagnosticadas associadas aos exames complementares (leucograma, cultura bacteriana e antibiograma), bem como, animais com outras patologias e animais saudáveis. Os critérios de exclusão de filhotes no grupo sepsé foram neonatos com outras doenças infecciosas associadas, tais como infecções parasitárias e virais. A exclusão foi realizada após exames complementares que confirmaram outras afecções concomitantes.

Foram avaliados 762 neonatos, incluindo 113 animais no grupo sepsé, 19 dos quais foram incluídos no grupo choque séptico. Dos 649 animais restantes, 419 foram incluídos no grupo saudável. O grupo de sepsé incluiu recém-nascidos com sinais clínicos de infecção neonatal (como diarreia, apatia, tríade neonatal, eritema abdominal/corporal, onfalite, hemorragia abdominal e cianose ou necrose das extremidades), conforme descrito por Sorribas (2008) [16], leucopenia em um leucograma e agentes isolados em cultura bacteriana. O grupo de choque séptico incluiu neonatos com diagnóstico de sepsé que desenvolveram os seguintes sinais clínicos: palidez de mucosas/corporal, bradicardia intensa, dispneia, bradipneia, respiração agônica, estupor/atonía muscular, epistaxe, oligúria/anúria e saturação periférica de oxigênio reduzida, conforme descrito por Lopez-Quintana (2015) [14], Montealegre-Golcher (2018) [15] e Brierley et al., (2009) [17]. O grupo saudável incluiu recém-nascidos com condições clínicas favoráveis, sem sinais clínicos de infecção ou leucograma sem alterações.

Informações como raça, idade, sinais clínicos, falha no ganho de peso, glicemia, frequência cardíaca e respiratória, temperatura, hidratação, reflexos (sucção, procura da

mama, e endireitamento vestibular), tônus muscular, saturação de oxigênio periférica, agentes bacterianos identificados, e presença de infecção materna foram registrados.

O peso foi avaliado com balança digital, a glicemia foi aferida com glicosímetro portátil (On Call Plus®). A frequência cardíaca foi auscultada com estetoscópio do lado esquerdo do tórax e a frequência respiratória foi avaliada observando-se os movimentos torácicos. A temperatura corporal foi aferida com um termômetro digital por via retal, e a hidratação avaliada pela coloração da urina e pelo hemograma (observando-se hemoconcentração). A saturação periférica de oxigênio foi avaliada utilizando o monitor de oximetria (R40VET Rzvet®), disposto na região da artéria femoral dos cães neonatos.

Os reflexos e o tônus muscular foram avaliados quanto ao grau de depressão (apatia) neonatal, conforme descrito por Vassalo et al., (2015). O reflexo da sucção foi avaliado inserindo-se a ponta do dígito mínimo do examinador na boca do neonato, observando-se a força da sucção. O reflexo de endireitamento foi estimulado colocando-se o neonato em decúbito dorsal sob uma superfície macia e aquecida. A resposta esperada deste reflexo correspondeu ao endireitamento corporal do neonato com retorno rápido ao decúbito ventral. Já o reflexo da procura da mama foi realizado colocando-se a mão do examinador próximo a face do neonato, que deve procurar a mama imediatamente.

Cada reflexo recebeu uma pontuação de 0, 1 ou 2 (resposta ausente, fraca ou forte, respectivamente), a soma identificou a vitalidade neonatal. A interpretação da pontuação foi avaliada pelo escore 0-2 vitalidade fraca, 3-4 vitalidade moderada e 5-6 vitalidade normal. Já o tônus muscular foi determinado com o neonato na posição de supinação, observando-se movimentos ativos e respostas aos movimentos passivos dos membros.

A origem da infecção, início precoce (0 a 2 dias de idade), (3 a 10 dias de idade), início tardio (11 a 20 dias de idade), (21-30 dias de idade) e taxas de mortalidade geral, precoce e tardia também foram descritas.

Diagnóstico e tratamento da sepse e choque séptico

Após avaliação clínica neonatal e suspeita de infecção, foram realizadas colheitas de sangue de 0,4 ml pela veia jugular, para realização do leucograma. A interpretação do leucograma neonatal foi realizada de acordo com os parâmetros de referência para a semana de idade dos pacientes, conforme descrito por Bird (2011) e Von Dehn (2014). Avaliação clínica e leucograma também foram realizados nas mães. Com a confirmação da sepse, após a colheita para culturas, instituiu-se imediatamente antibioticoterapia empírica até que os resultados da hemocultura e antibiograma estivessem disponíveis. Dependendo da suspeita da origem da infecção, foram solicitadas hemoculturas neonatais, culturas de líquido torácico neonatal após óbito, de fluidos uterinos ou secreção vaginal, secreção oronasal materna e neonatal, e leite

materno, além de antibiogramas colhidos previamente à instituição da antibioticoterapia.

Para as hemoculturas, foram realizadas colheitas de 0,4 ml de sangue em seringas com 0,02 ml de heparina. As colheitas para cultura bacteriana do líquido torácico, fluidos uterinos, secreção vaginal, leite e oronasal foram realizadas com swab com haste de plástico estéril e meio de transporte Stuart. Para a coleta do leite, a desinfecção foi realizada primeiramente com álcool 70%. O swab foi cuidadosamente aproximado da gota de leite durante a ordenha sem tocar na pele, para evitar contaminação. A colheita de fluido uterino foi realizada com esfregaços endometriais durante cesarianas, quando havia suspeita de infecção materna ou neonatal. As amostras foram cultivadas em Ágar sangue, Ágar MacConkey e enriquecidas em meio BHI (brain heart infusion). Os antibiogramas foram realizados em Ágar Mueller Hinton.

Os principais antibióticos utilizados para os tratamentos dos pacientes neonatos deste estudo pertenciam às classes das cefalosporinas ou penicilinas (ceftriaxona 30 a 50 mg/kg, ceftiofur 2,2 a 4,4 mg/kg, ou amoxicilina com clavulanato de potássio 20 mg/kg), conforme descrito por Munnich; Kuchenmeister (2014) e Lourenço (2015). A terapia antimicrobiana foi instituída antes do resultado do antibiograma, e posteriormente alterada caso necessário. A via de administração utilizada foi a parenteral, os filhotes receberam inicialmente antibióticos por via intravenosa, pela veia jugular, e posteriormente por via subcutânea. A jugular foi acessada com catéter 24 gauge, este fixado com esparadrapo ou atadura elástica ao redor do pescoço do paciente (Fig.1). A duração do tratamento variou com o tempo de melhora clínica e dos exames laboratoriais dos neonatos, entre cinco a 10 dias.

Nos neonatos que apresentavam concomitantemente a tríade neonatal (hipotermia, hipoglicemia e desidratação), os cuidados de suporte foram realizados, como aquecimento gradual em incubadora, com controle da temperatura e umidade de acordo com a semana de idade, fluidoterapia com solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) ou ringer lactato, 4 ml por 100 gramas de peso, por via intravenosa, intraóssea, ou subcutânea, e reposição de glicose 12,5%, 0,5 ml por 100 gramas de peso, por via intravenosa.

Nos pacientes em choque séptico, além da antibioticoterapia intravenosa, foram realizados bolus de fluido cristalóide (cloreto de sódio 0,9%) 1 a 2 ml por 100 gramas de peso em três minutos. Não havendo resposta (melhora clínica), foram realizadas administrações de bolus de colóide (hidroxietilamido 6%) 0,5 ml/100 gramas em 15 minutos. Nos casos de hipotensão refratária à reposição volêmica adequada, foram realizadas administração de noradrenalina 0,1 a 0,4 mcg/kg por via intravenosa, pela veia jugular. Durante os procedimentos foi realizada oxigenioterapia por máscara.

Neonatos críticos foram avaliados clinicamente a cada 10 minutos para monitorização dos parâmetros vitais, evolução do tônus muscular e reflexos. Os filhotes permaneceram internados até a observação da melhora clínica.

O suporte nutricional dos neonatos com reflexo de sucção fraco ou ausente foi realizado com alimentação por sonda orogástrica, com substituto comercial do leite materno ou ordenhando-se o leite/colostró materno quando possível. Em neonatos que não ingeriram colostro, foi instituída a administração de solução hiperimune (plasma ou soro sanguíneo canino) de um animal adulto, hígido e vacinado, como fonte de imunidade passiva, administrada na dose de 2 ml por 100 gramas de peso, por via subcutânea, conforme descrito por Bouchard et al., (1992) e Mila et al., (2017).

Para o acompanhamento da evolução e melhora da infecção, a avaliação clínica e o leucograma foram repetidos com 24 horas, três, e sete ou 10 dias, variando entre as ninhadas, dependendo da disponibilidade do tutor. A cura foi definida com a melhora dos parâmetros clínicos e normalidade dos exames laboratoriais.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-smirnov. As variáveis foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos, com utilização do procedimento GLM do programa estatístico SAS versão 9.2, considerando o grupo (saudável, sepse e choque séptico) como um efeito fixo no modelo. Os resultados foram considerados significativos para probabilidade quando inferiores a 5% ($p < 0,05$), aplicando-se o teste de comparação de médias de Tukey.

Resultados

Um total de 152 ninhadas e 762 neonatos foram tratados no hospital veterinário durante o período do estudo. Destes animais, 55% (419/762) eram saudáveis e 45% (343/762) apresentavam alguma alteração ou patologia. As ninhadas eram de diversas raças: Pug, Pinscher miniatura, Rottweiler, Pitbull, Bulldog francês, Bulldog inglês, Lhasa Apso, Dachshund, Labrador retriever, Golden retriever, Maltês, American bully, American staffordshire terrier, Cavalier king charles spaniel, Border collie, Bull terrier, Cocker spaniel inglês, Cane corso, Beagle, Boiadeiro australiano, Schnauzer, Shar-pei, Spitz alemão, Poodle, Yorkshire, Shih-tzu e sem raça definida.

No total, 34,2% (261/762) dos filhotes foram diagnosticados com infecção bacteriana, destes, 43,3% (113/261) apresentavam sepse ou choque séptico, 38,7% (101/261) infecção sistêmica, e 18% (47/261) infecção local (onfaloflebite 61,7% (29/47), conjuntivite/oftalmia neonatal 25,5% (12/47), abscessos 19,1% (9/47), impetigo e outras piodermites 14,9% (7/47).

A ocorrência de infecções neonatais variou de acordo com a idade. Entre os recém-nascidos com sepse, 80,5% (91/113) tinham entre 0 e 2 dias de idade e apresentavam infecções precoces, principalmente adquiridas no útero, e apresentavam sinais clínicos ao nascimento ou nas primeiras horas de vida; 11,5% (13/113) tinham entre 3 e 10 dias de idade; 5,3% (6/113) tinham entre 11 e 20 dias de idade; e 2,7% (3/113) tinham entre 21 e 30 dias de idade. Entre os recém-nascidos com infecção

sistêmica, 63,3% (64/101) tinham entre 0 e 2 dias de idade; 23,7% (24/101) tinham entre 3 e 10 dias de idade; 9% (9/101) tinham entre 11 e 20 dias de idade; e 4% (4/101) tinham entre 21 e 30 dias de idade.

A mortalidade total dos filhotes com infecção bacteriana foi de 20,3% (53/261), destes, 28,3% (15/53) eram natimortos devido à infecção intrauterina, 17% (9/53) vieram a óbito por infecção sistêmica e 54,7% (29/53) vieram a óbito por sepse. Não houve mortalidade em neonatos com infecções bacterianas exclusivamente locais.

O leucograma foi avaliado de acordo com os parâmetros de referência para a semana de idade dos neonatos. As alterações mais observadas em recém-nascidos em sepse foram: leucopenia 85,8% (97/113), neutropenia 64,6% (73/113), linfopenia 59,3% (67/113), desvio a esquerda 23% (26/113), neutrófilos tóxicos 38,9% (44/113), e monocitose 54,8% (62/113). A média e valor mínimo e máximo dos parâmetros do leucograma ($10^3/\mu\text{L}$) foram: leucopenia 2,9 (1,4-5,4); neutropenia 1,3 (0,1-2,3); linfopenia 0,6 (0,3-1,2); desvio a esquerda 0,48 (0,36-0,6); monocitose 2,5 (2,3-3,6).

No total, 14,8% (113/762) dos filhotes atendidos foram diagnosticados com sepse, 25,6% (29/113) vieram a óbito, e dentre estes, 58,6% (17/29) estavam em choque séptico. A mortalidade precoce (excluindo-se os natimortos) de filhotes em sepse (0 a 2 dias de idade) foi de 69% (20/29), e a mortalidade tardia (3 a 30 dias de idade) correspondeu à 31% (9/29) dos neonatos afetados. No entanto, neonatos em sepse foram tratados com sucesso em 74,4% (84/113) dos casos. A assistência neonatal precoce e especializada foi essencial para a maior taxa de sobrevivência destes pacientes.

Dos antibióticos utilizados, 60,2% (68/113) dos pacientes foram tratados com ceftriaxona, 16,8% (19/113) com ceftiofur e 23% (26/113) com amoxicilina com clavulanato de potássio. Destes, a sobrevivência dos neonatos correspondeu à 79,4% (54/68), 63,1% (12/19) e 69,2% (18/26), respectivamente.

O tempo para a evolução e normalidade dos parâmetros clínicos e do leucograma dos neonatos curados variou entre ninhadas e entre filhotes dentro da mesma ninhada, bem como de acordo com a gravidade da infecção. Cerca de 82,1% (69/84) dos neonatos apresentaram melhora dos parâmetros do exame físico em 24 horas, e 17,9% (15/84) em até três dias. Quanto à evolução no leucograma, 35,7% (30/84) dos filhotes apresentaram melhora relevante em 24 horas, 52,3% (44/84) em três dias, e 12% (10/84) em sete a 10 dias.

Os sinais clínicos observados nos recém-nascidos em sepse foram: tríade neonatal (hipotermia, hipoglicemia, desidratação), apatia (letargia) (Fig.1), baixa vitalidade (tônus muscular e reflexos de sucção, procura da mama, e endireitamento vestibular reduzidos ou ausentes), vocalização, perda de peso, hipertermia, bradicardia, mucosas congestas ou cianóticas (Fig.2), diarreia (Fig.3), diarreia sanguinolenta, proctite (Fig.4), hematúria, vômito, eritema abdominal/corporal (Fig.5), onfalite/onfaloflebite (Fig.6), conjuntivite/oftalmia neonatal (Fig.7), secreção nasal mucopurulenta/pneumonia, descamação da pele (síndrome da pele escaldada) (Fig.10),

abscessos, convulsão, equimoses ou hematomas abdominais (Fig. 8), extremidades de membros, cauda ou orelhas de coloração violácea (cianótica) (Fig. 9), e necrose tecidual em membros e coxins ou em outras extremidades do corpo (Fig. 11).

Os sinais clínicos mais observados de 0 a 2 dias de idade foram: diarreia ou diarreia do mecônio, tríade neonatal, mucosas congestas ou cianóticas, eritema abdominal / corporal, onfalite / onfaloflebite, apatia, baixa vitalidade, perda de peso, bradicardia, hematúria, equimoses ou hematomas abdominais e extremidades de membros, caudas ou orelhas violáceas (cianóticas).

Dos 3 aos 20 dias de idade, os sinais mais frequentes foram: diarreia ou diarreia com sangue, tríade neonatal, mucosas congestas ou cianóticas, eritema abdominal / corporal, onfalite / onfaloflebite, apatia, baixa vitalidade, perda de peso, bradicardia, conjuntivite ou oftalmia neonatal, hematúria, proctite, equimose ou hematoma abdominal, extremidades de membros, caudas ou orelhas violáceas (cianóticas), necrose do tecido das extremidades dos membros, coxins ou outras partes do corpo, corrimento nasal mucopurulento / pneumonia e abscessos.

Dos 21 aos 30 dias de idade, os sinais mais frequentes foram: diarreia, mucosas congestas, tríade neonatal, apatia, eritema abdominal / corporal, hipertermia e emagrecimento.

A evolução para choque séptico foi identificada pela alteração do padrão cardiorrespiratório do neonato para dispneia, bradipneia, respiração agônica (Fig. 12) e bradicardia intensa, além da alteração da coloração das mucosas/corpo para palidez (Fig.13), epistaxis (Fig. 14), oligúria/anúria e redução intensa da saturação de oxigênio periférica (Fig. 15). A tabela 1 descreve a frequência destes sinais clínicos nos pacientes neonatos em sepse e em choque séptico.

Houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os parâmetros da frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR), glicemia, temperatura corporal, saturação de oxigênio (SO_2) periférica e reflexos de neonatos em sepse, choque séptico quando comparados à neonatos hígidos. Não houve diferença significativa ($p = 0,94$) entre os pesos dos neonatos. A média dos parâmetros avaliados, erro padrão, significância estatística, valores mínimo e máximo estão descritos na tabela 2.

No total, 14,4% (22/152) das ninhadas estavam em sepse. Destas, 41% (9/22) das cadelas não apresentavam infecção sistêmica, 31,8% (7/22) foram diagnosticadas com infecção sistêmica, e 27,2% (6/22) estavam em sepse. Das cadelas, 12 eram primíparas e 10 pluríparas, e cerca de 81,8% (18/22) não realizaram exames pré-natais. Devido à infecção, seis cadelas 27,2% (6/22) apresentaram pelo menos um caso de abortamento, maceração fetal ou natimortalidade na ninhada. Das cadelas pluríparas, 40% (4/10) apresentaram casos de mortalidade fetal ou neonatal em ninhadas anteriores.

As alterações do leucograma mais observadas nas mães das ninhadas em sepse foram: leucocitose 31,8% (7/22), neutrofilia 31,8% (7/22), monocitose (5/22),

linfocitose (4/22), leucopenia 27,2% (6/22), neutropenia 27,2% (6/22), linfopenia (4/22), aumento dos bastonetes (5/22), neutrófilos tóxicos (12/22), e 41% (9/22) não apresentaram alterações relevantes. Cerca de 36,3% (8/22) das mães apresentaram algum sinal clínico durante o exame físico, como febre e apatia. A média e valor mínimo e máximo dos parâmetros do leucograma ($10^3/\mu\text{L}$) foram: leucocitose 23,2 (19-32,7); neutrofilia 25,4 (13,5- 31,4); monocitose 1,5 (1,6-1,9); linfocitose 5,8 (5-6,2); leucopenia 3,4 (1,7-5,2); neutropenia 1,6 (1,3-2,7); linfopenia 0,62 (0,7-0,9); aumento dos bastonetes 0,45 (0,4-0,5).

Quanto à origem da infecção nos neonatos em sepse, em 40,7% (46/113) dos filhotes a causa foi relacionada à infecção bacteriana sistêmica materna (com nascimento de filhotes em sepse), 27,5% (31/113) infecção bacteriana restrita ao útero (com ausência de infecção sistêmica na cadela e nascimento de filhotes em sepse), 16% (18/113) à mastite e consequente síndrome do leite tóxico, 4,4% (5/113) onfaloflebites/falha na desinfecção do cordão umbilical, 3,5% (4/113) secreção da orofaringe materna, e em 7,9% (9/113) dos neonatos em sepse, não foram identificadas a origem da infecção (suspeitando-se de contaminação ambiental).

Os agentes bacterianos identificados foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Streptococcus* beta hemolítico, *Streptococcus* alfa hemolítico, *Proteus mirabilis*, *Mannheimia haemolytica*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. *Pasteurella multocida* e *Enterobacter* sp. A *Escherichia coli* foi a bactéria mais frequentemente isolada na sepse neonatal (Fig. 16), correspondendo a 25,6% (29/113) dos casos. No total, *E. coli* foi isolada de sete cadelas, sendo três com sepse, uma com infecção sistêmica e três sem infecção sistêmica. Em 71,4% (5/7) dos casos, *E. coli* foi isolada do endométrio durante a cesariana (isolada de três cadelas com sepse e duas sem infecção sistêmica) e detectada em hemoculturas de filhotes com sepse ao nascimento e culturas de fluido torácico de natimortos, e em 28,6% (2/7) dos casos, a bactéria foi isolada do colostro / leite (isolada de uma cadela com infecção sistêmica e outra sem infecção sistêmica) e detectada em hemoculturas de filhotes com sepse. A tabela 3 descreve a frequência destes agentes na sepse neonatal e a resistência bacteriana à antibióticos. Os tipos de amostras em que as bactérias foram isoladas estão disponíveis na tabela 4.



Figura 1. Neonato em sepse, com acesso venoso central para realização do tratamento, apresentando apatia, com ausência de tônus muscular e reflexos.



Figura 2. Coloração cianótica corporal e em extremidade distal dos membros pélvicos em neonato em sepse (à esquerda). Neonato após o tratamento apresentando coloração rósea corporal e de extremidades (à direita).



Figura 3. Diarreia neonatal (à esquerda) e diarreia do mecônio ao nascimento (à direita) em neonatos em sepse.



Figura 4. Proctite em neonato em sepse.



Figura 5. Eritema abdominal/corporal em neonato em sepse.



Figura 6. Onfalites/onfaloflebites em neonatos em sepse.



Figura 7. Conjuntivite/oftalmia neonatal em neonato em sepse.



Figura 8. Hematomas/equimoses abdominal em neonato em sepse.



Figura 9. Extremidade de membro pélvico de coloração violácea (cianótica) em neonato em sepse.



Figura 10. Descamação da pele (síndrome da pele escaldada), extremidade de membro torácico de coloração cianótica, e onfalite em neonato em sepse por *Staphylococcus* sp. ao nascimento.



Figura 11. Perda de parte do membro superior direito após necrose de extremidade em recém-nascido com sepse.



Figura 12. Respiração agônica em neonato em choque séptico.



Figura 13. Palidez corporal, diarreia, dilatação e hematomas abdominal em neonato em choque séptico.



Figura 14. Epistaxis e cianose de dígito em membro esquerdo em neonato em sepse.

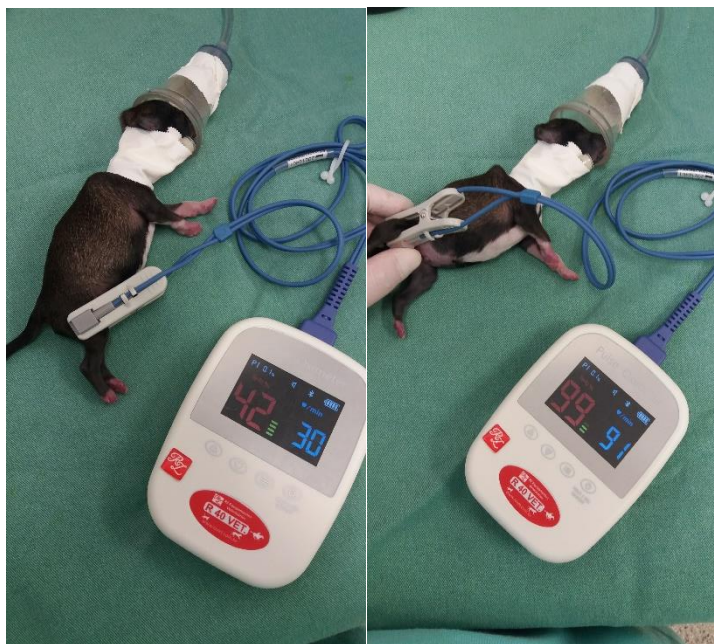


Figura 15. Redução intensa da saturação de oxigênio periférica em neonato em choque séptico (à esquerda). Melhora clínica após tratamento com bolus de fluido e noradrenalina intravenosa (à direita).



Figura 16. Infecção por *Escherichia coli*. Da esquerda para a direita: necrose tecidual em útero, conteúdo uterino com maceração fetal, e filhote nascido vivo em sepse, apresentando diarreia do mecônio e proctite.

Tabela 1. Frequência dos sinais clínicos apresentados por neonatos em sepse.

Sinais clínicos	N	(%)
Hipotermia	(65/113)	57,5%
Hipoglicemia	(74/113)	65,5%
Desidratação	(72/113)	63,7%
Apatia	(52/113)	46%
Tônus muscular reduzido	(56/113)	49,5%
Reflexo de sucção reduzido	(70/113)	62%
Reflexo de procura reduzido	(67/113)	59,2%
Endireitamento vestibular reduzido	(55/113)	48,6%
Vocalização	(17/113)	15%
Falha no ganho de peso*	(37/113)	32,7%
Hipertermia	(8/113)	7%
Mucosas congestionadas ou cianóticas	(59/113)	52,2%
Diarreia	(105/113)	93%

Diarreia sanguinolenta	(18/113)	16%
Hematúria	(26/113)	23%
Vômito	(5/113)	4,4%
Proctite	(32/113)	28,3%
Eritema abdominal/corporal	(77/113)	68,1%
Onfalite/onfaloflebite	(29/113)	25,6%
Conjuntivite/oftalmia neonatal	(12/113)	10,6%
Secreção nasal mucopurulenta/pneumonia	(4/113)	3,5%
Descamação da pele (síndrome da pele escaldada)	(5/113)	4,4%
Abscessos	(9/113)	8%
Convulsões	(5/113)	4,4%
Equimoses ou hematomas abdominais	(16/113)	14,1%
Extremidades de membros, cauda ou orelha de coloração violácea (cianótica)	(33/113)	29,2%
Necrose tecidual em membros, coxins e outras extremidades do corpo	(15/113)	13,2%
Bradycardia	(62/113)	54,8%
Dispneia	(22/113)	19,4%
Bradipneia	(19/113)	16,8%
Respiração agônica	(19/113)	16,8%
Epistaxis	(7/113)	6,2%
Mucosas pálidas	(16/113)	14,1%
Oligúria/anúria	(19/113)	16,8%
Redução da SO ₂ periférica	(31/113)	27,4%

*A falha no ganho de peso foi descrita apenas em ninhadas cujo peso foi registrado diariamente pelos tutores.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos parâmetros avaliados, erro padrão, significância estatística entre os grupos e valores mínimo e máximo.

Parâmetros	Hígidos (n=349*)	Sepse (n=94)	Choque séptico (n=19)
FC (bpm)	238 ± 19,5 ^a (212-260)	200 ± 7,68 ^b (190-216)	110 ± 44,3 ^c (30-168)
FR (mpm)	33,2 ± 5 ^a (24-40)	37 ± 9 ^a (20-52)	12 ± 4 ^b (8-20)
Glicemia (mg/dL)	125,4 ± 22,6 ^a (106-182)	81 ± 36,5 ^b (25-142)	37,6 ± 32,3 ^c (12-114)
Temperatura (°C)	36 ± 0,61 ^a (35-37)	34 ± 1,6 ^b (31,7-36,5)	32,5 ± 0,85 ^c (31,1-33,9)
SO ₂ periférica (%)	99 ± 0 ^a	98,6 ± 0,65 ^a (97-99)	66,2 ± 19,8 ^b (42-92)
Escore reflexos (0-6)	5,9 ± 0,44 ^a (5-6)	3,9 ± 0,40 ^b (0-6)	0,4 ± 0,46 ^c (0-3)
Peso (gramas)	222,0 ± 31,4 ^a (98-350)	208,9 ± 27,2 ^a (64-370)	208,6 ± 29,8 ^a (95-382)

^{a,b,c} Letras diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas entre os grupos avaliados (p<0,05).

Bpm= batimentos por minuto; mpm= movimentos por minuto.

*A tabela demonstra apenas o número de animais hígidos cujo todos estes parâmetros foram avaliados.

Tabela 3. Frequência dos agentes bacterianos na seps neonatal e resistência à antibióticos.

Agentes bacterianos	N filhotes	(%)	Resistência à antibióticos
<i>Escherichia coli</i>	(29/113)	25,6%	AC, CX, SU, AZ
<i>Staphylococcus</i> sp.	(10/113)	8,8%	AC, PE
<i>Streptococcus</i> sp.	(6/113)	5,3%	CE, CEF, AZ
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	(5/113)	4,4%	AM, LE, CLO
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	(14/113)	12,3%	AC, NE, CI
<i>Proteus mirabilis</i>	(6/113)	5,3%	Não
<i>Mannheimia haemolytica</i>	(9/113)	7,9%	CI, GE, LE, NO
<i>Enterococcus</i> sp.	(5/113)	4,4%	AC, ST
<i>Pseudomonas</i> sp.	(4/113)	3,5%	CE, CEF, CEFO, PE, CX, CL, ST
<i>Klebsiella</i> sp.	(4/113)	3,5%	AMO, PE, CL, ST
<i>Pasteurella multocida</i>	(3/113)	2,6%	Não
<i>Enterobacter</i> sp.	(2/113)	1,7%	CE, CEF, AM
Agentes não identificados	(16/113)	14,1%	-

AC= amoxilina com clavulanato; AM= amicacina; AMO= amoxilina; AZ= azitromicina, CE= ceftriaxona; CEF= ceftiofur; CEFO= ceftiofur; CI= ciprofloxacina; CL= clindamicina; CLO= cloranfenicol; CX= cefalexina; GE= gentamicina; LE= levofloxacina; NE= neomicina; NO= norfloxacina; PE= penicilina; ST= sulfadiazina com trimetropim; SU= sulfazotrim.

Tabela 4. Agentes bacterianos isolados de acordo com o tipo de amostra avaliada.

Agentes bacterianos	Fluidos uterinos/ secreção vaginal	Hemocultura neonatal/ líquido torácico	Colostro/leite	Secreção oronasal materna e neonatal
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	+	+	
<i>Streptococcus</i> sp.	+	+	+	
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	+	+		
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	+	+	+	
<i>Proteus mirabilis</i>		+	+	
<i>Mannheimia haemolytica</i>	+	+		
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+		
<i>Pseudomonas</i> sp.				+
<i>Klebsiella</i> sp.				+
<i>Pasteurella multocida</i>	+	+		
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+		

Discussão

A determinação do período neonatal em cães é controversa, alguns autores descrevem até as três primeiras semanas de idade (Kustritz, 2011; Mila et al., 2015) como um período no qual os filhotes se tornam mais independentes de suas mães e caminham, urinam e defecam espontaneamente. Porém, a tendência atual de alguns autores é considerar o período neonatal como um período em que o filhote ainda depende da mãe para sobreviver, em média até dos 30 dias de idade, uma vez que, a capacidade termorregulatória do filhote torna-se semelhante à dos adultos, seguido pelo

início do desmame, que ocorre a partir deste período (Grundy, 2006; Lourenço, 2015). Este estudo incluiu filhotes até a quarta semana de idade.

As infecções bacterianas são comuns na rotina neonatal, estudos demonstraram que a sepse é a principal causa de mortalidade em cães durante os primeiros 21 dias de idade, e é maior durante a primeira semana de vida (Daniels; Spencer, 2011; Meloni et al., 2014; Munnich; Kuchenmeister, 2014). Neste estudo, a maior incidência de sepse ocorreu de 0 a 2 dias de idade e de 3 a 10 dias de idade, e a maior taxa de mortalidade em neonatos com sepse, que foi de aproximadamente 69%, foi observada nos primeiros dias de vida (mortalidade precoce).

Essas altas taxas de sepse e mortalidade precoce podem estar associadas ao estado imunossupressor dos cães ao nascimento, aumentando a suscetibilidade dos recém-nascidos a infecções por bactérias consideradas comensais (Daniels. Spencer, 2011). Além disso, a maioria dos neonatos deste estudo nasceu com sepse (com infecção materna sistêmica ou uterina como fonte), o que levou a uma alta incidência de 0 a 2 dias, e como a sepse pode progredir de forma hiperaguda com morte súbita de neonatos (Daniels; Spencer, 2011; Veronesi, 2013; Meloni et al., 2014), pode resultar em maior mortalidade nos primeiros dois dias de vida. Outra consideração a respeito dessa maior incidência de 0 a 2 dias neste estudo, é que os filhotes foram diagnosticados precocemente devido à avaliação clínica minuciosa e exames complementares ao nascimento. Quando as avaliações clínicas neonatais não são realizadas ao nascimento, a sepse será diagnosticada posteriormente. Além disso, a falha na transferência de imunidade passiva está intimamente relacionada com uma maior probabilidade de infecção neste período até os 10 dias de idade ou durante todo o período neonatal período (Mila et al., 2017; Chastant; Mila, 2019). Condições que levam à ingestão inadequada de colostro, como agalactia ou hipogalactia materna, falha do instinto materno de amamentação, fenda labial e/ou palatina, prematuridade e baixo peso ao nascimento, foram observadas neste estudo e podem ser fatores de risco para falha de transferência da imunidade passiva. Portanto, a infecção bacteriana pode ter sido a principal causa de morte em filhotes nascidos com infecções. Em outros casos, a infecção foi provavelmente secundária em cães com falha na transferência de imunidade passiva, devido à ingestão inadequada de colostro.

Quanto aos sinais clínicos apresentados pelos recém-nascidos em sepse, a tríade neonatal (hipotermia, hipoglicemia, desidratação) foi comumente observada nos pacientes. Neonatos doentes desenvolvem depressão e letargia (baixa vitalidade), e podem evoluir para tríade rapidamente devido à redução ou ausência do reflexo de sucção, culminando na inadequada ingestão de colostro/leite e perda de peso (Peterson; Kutzler, 2011; Lourenço, 2015). Frequentemente, a falha no ganho de peso é percebida antes dos sinais clínicos da infecção (Peterson; Kutzler, 2011; Wilborn, 2018), por este motivo, é essencial que os tutores sejam instruídos a monitorar o ganho peso diário e avaliar suas ninhadas constantemente, para que uma intervenção precoce pode ser realizada.

Cães recém-nascidos possuem maior predisposição à manifestação da tríade, em decorrência da imaturidade dos sistemas orgânicos (Peterson; Kutzler, 2011; Munnich; Kuchenmeister, 2014; Lourenço, 2015). A hipotermia foi predominantemente observada nos pacientes sépticos em relação à hipertermia. Isto ocorre devido à imaturidade do sistema termorregulador do cão neonato, que ainda está em desenvolvimento em relação ao animal adulto. Portanto, é frequente observar hipotermia nas infecções neonatais. Os quadros de hipertermia avaliados neste estudo corresponderam à alguns pacientes acima dos 17 dias de idade, possivelmente devido à maior maturidade e controle da termorregulação. Contudo, a completa funcionalidade da termorregulação (próxima ao adulto) ocorre por volta dos 30 dias de idades em neonatos (Peterson; Kutzler, 2011; Lourenço, 2015).

Devido à imaturidade dos diversos sistemas, particularmente o cardiovascular, neonatos em choque séptico não desenvolvem resposta compensatória à hipotensão com taquicardia, como observado em adultos. Cães recém-nascidos possuem fisiologicamente baixa pressão arterial (média de 60 mmHg), inervações autonômicas do coração/vasculares imaturas e baixa resposta barorreflexa, com percepção inadequada de variações na pressão arterial (Mace; Levy, 1983; Grundy, 2006; Rickard, 2011). Além disso, a contratilidade do miocárdio não está completamente desenvolvida, resultando em uma resposta compensatória limitada (Rickard, 2011). Desta forma, observa-se bradicardia intensa nestes pacientes, o que piora o quadro de hipoperfusão. É importante que o clínico tenha conhecimento das particularidades fisiológicas do recém-nascido, e como estas diferenças entre pacientes adultos e neonatos podem impactar no adequado diagnóstico e intervenção clínica.

Ainda, devido à imaturidade cardiovascular e escassez de estudos sobre este tema em cães neonatos, a resposta ao bolus de fluido cristalóide/colóide e aos fármacos vasoativos é incerta. Contudo, em nossos pacientes, após o tratamento do choque, observamos melhora temporária da coloração das mucosas, aumento do tônus muscular, frequência cardíaca e saturação de oxigênio periférica, e melhora da respiração agônica, demonstrando que apesar da imaturidade houve resposta ao tratamento, no entanto, os parâmetros mantiveram-se instáveis. A sobrevivência dos neonatos em choque séptico dependeu da gravidade do caso, neonatos clinicamente instáveis evoluíram para parada cardiorrespiratória. A mortalidade por choque séptico foi de 89,4% (17/19).

Em muitos casos, os sinais clínicos de doenças apresentados por recém-nascidos são inespecíficos, a exemplo da depressão, tríade neonatal e falha no ganho de peso, que são comuns a qualquer alteração ou afecção. No entanto, neonatos podem manifestar sinais clínicos mais específicos relacionados às infecções. Estes sinais clínicos são comumente observados nas infecções neonatais, e podem ser percebidos por médicos veterinários e criadores, como diarreia, eritema corporal, onfaloflebitis, extremidades de membros cianóticas, entre outros descritos neste estudo. Contudo, a infecção deve ser confirmada com leucograma e cultura bacteriana.

É imprescindível que neonatos sejam avaliados minuciosamente e monitorados em busca destes sinais clínicos mais específicos, já que, em nossa rotina de atendimento, observamos que dependendo da gravidade ou do tempo de infecção, neonatos podem ainda manifestar boa vitalidade e amamentação adequada. Desta forma, a falha na avaliação clínica pode acarretar uma falsa interpretação de que os filhotes apresentam-se hígidos, e a infecção passar despercebida. Portanto, em muitos casos, a infecção é descoberta tardiamente e o prognóstico é ruim. Como a evolução clínica é rápida, o diagnóstico precoce é essencial para a maior taxa de sobrevivência nestes pacientes.

Apesar da diarreia ser o sinal clínico mais comumente observado na sepse neonatal do presente estudo, ocorrendo em 93% dos pacientes afetados, não é patognomônica desta afecção, devendo sempre ser investigada outras etiologias, como infecções parasitárias e virais, ou ainda causas nutricionais. Contudo, o sinal clínico de coloração violácea (cianótica) de extremidades de membros e cauda (com possível evolução para necrose tecidual), apesar de ocorrer em menor frequência, cerca 29,2% dos recém-nascidos do estudo, pode ser considerado um forte indício para sepse neonatal. Todos os filhotes que apresentavam este sinal clínico foram diagnosticados com sepse. O desenvolvimento de áreas de coloração cianótica em extremidades está relacionada à hipóxia, por hipoperfusão sanguínea em recém-nascidos com SIRS, em consequência da vasodilatação sistêmica e hipotensão, além de uma vasculite causada diretamente pelo agente infeccioso (Fitzgerald; Newquist, 2011). Em decorrência disto, também pode ser observada a redução da saturação de oxigênio periférica, que neste estudo foi proeminente em filhotes em choque séptico, devido à hipoperfusão grave.

Na rotina, há dificuldade em se aferir a pressão arterial sistêmica de cães neonatos, o que seria importante no diagnóstico do choque séptico. No entanto, devido ao pequeno tamanho dos pacientes, esta avaliação ainda é uma limitação do nosso estudo. Em medicina, não é necessária a observação de hipotensão para o diagnóstico de choque em neonatos, em muitos casos, a avaliação clínica é suficiente (Brierley et al., 2009). Em nossa rotina de atendimento, observamos clinicamente a evolução do cão neonato para choque séptico, pela alteração do padrão cardiorrespiratório para bradicardia intensa, dispneia, bradipneia, respiração agônica, redução intensa da saturação de oxigênio periférica e palidez de mucosas/corporal. A relevância da observação das alterações dos padrões clínicos foi demonstrada neste estudo, com diferença significativa no grupo choque séptico em comparação ao grupo sepse ou neonatos hígidos.

Apesar do baixo peso ao nascimento (em comparação à média da raça) ser um fator de risco para infecção e mortalidade em neonatos (Mila et al., 2017), não houve diferença significativa entre os pesos dos neonatos dos grupos hígidos, sepse ou choque séptico deste estudo. Isto ocorreu provavelmente devido à variação de raças e portes dentro de cada grupo.

Quanto à origem das infecções, a cadela foi supostamente a principal fonte de infecção para a ninhada. Assim como demonstrado em um estudo que avaliou a relação genética de cepas bacterianas idênticas isoladas em filhotes com infecção e suas mães (Munnich; Kuchenmeister, 2014). A falta do sequenciamento genético bacteriano é uma limitação do nosso estudo, sendo importante para confirmação da origem da infecção. Contudo, evidenciamos em cerca de 87,6% (99/113) dos casos de sepse, que possivelmente a fonte de infecção foi relacionada à mãe, pela avaliação clínica e cultura bacteriana materna e neonatal.

A infecção bacteriana muitas vezes é transmitida da cadela para feto/neonato durante a gestação, parto ou, após o parto, por meio de secreções maternas infectadas, como secreções vaginais, oronasais, fezes e leite (Schäfer-Somi et al. 2003; Münnich; Lübke-Becker, 2004; Meloni, 2014). No presente estudo, a maioria das infecções foi transmitida ainda durante a gestação, cerca de 68% (77/113) dos casos de sepse neonatal. A maior fonte de infecção para os neonatos foi o útero, seguido do leite materno e outras secreções da fêmea.

É importante salientar que a ausência de infecção sistêmica na cadela não isenta filhotes de nascerem com infecção. Das ninhadas em sepse, cerca de 41% (9/22) das cadelas não apresentavam infecção sistêmica, contudo, os filhotes nasceram em sepse, em decorrência de infecção intrauterina. Isto demonstra a importância da avaliação clínica neonatal minuciosa ao nascimento, já que as infecções neonatais podem passar despercebidas quando a cadela apresentar avaliação clínica e leucograma sem alterações.

Além disso, os cuidados com os filhotes iniciam-se antes do nascimento. O monitoramento e a prevenção de infecções maternas e neonatais incluem cuidados pré-natais adequados, avaliações clínicas, exames complementares como leucograma, exame bacteriológico do trato genital feminino e leite/colostró e constante limpeza e saneamento ambiental (Sager; Remmers, 1990; Lourenço, 2015).

A saúde materna também pode influenciar na recuperação de filhotes com sepse. As cadelas doentes podem não fornecer os cuidados essenciais aos seus recém-nascidos e a mastite pode interferir com a amamentação adequada, necessitando de manejo de órfãos em muitos casos. No entanto, mais estudos são necessários para determinar a influência da saúde materna na recuperação de filhotes sépticos.

Além disso, possivelmente o parto vaginal ou cesariana pode influenciar a incidência de sepse. Em recém-nascidos humanos e camundongos recém-nascidos, a cesariana afeta a microbiota intestinal e a imunidade neonatal e, consequentemente, o risco de infecção bacteriana (Zachariassen et al., 2019; Shao et al., 2019). Em cães, foram demonstradas diferenças entre a microbiota dos filhotes nascidos de parto vaginal e cesariana, o que afetou o desenvolvimento dos recém-nascidos, com taxas de crescimento e ganho de peso mais rápido nos filhotes nascidos de parto normal do que nos nascidos de cesariana (Zakosek-Pipan et al., 2020). Mais estudos também são

necessários para determinar o impacto do tipo de parto na imunidade neonatal e na defesa contra infecções em cães.

Diversos estudos descreveram os agentes bacterianos associados com infecções neonatais, dentre eles, os mais frequentemente isolados são *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (Hoskins, 2001; Münnich 2008, Meloni et al., 2014; Munnich; Kuchenmeister, 2014), em concordância com o demonstrado neste estudo. A *Escherichia coli* foi o principal agente responsável pela sepse neonatal, da mesma forma que observado por Münnich, 2008, Meloni et al., 2014, e Munnich; Kuchenmeister, 2014. Em nosso estudo, a sepse por *Escherichia coli* ocorreu em 25,6% (29/113) dos recém-nascidos acometidos.

As infecções verticais (da mãe para o feto ou neonato) parece ser a rota de infecção mais comum para *Escherichia coli* em filhotes (Munnich; Kuchenmeister, 2014). Alguns autores sugerem que as cepas bacterianas podem ser transmitidas diretamente aos filhotes da microbiota intestinal comensal das mães ou de cepas que colonizam a placenta materna e a vagina (Munnich; Kuchenmeister, 2014; Pipan et al., 2020). Apesar de fazerem parte da microbiota comensal da cadela, muitos agentes bacterianos são associados com infecções oportunistas, principalmente em animais imunocomprometidos (Daniels; Spencer, 2011; Pipan et al., 2019). Entretanto, esses estudos ainda não permitem concluir que os recém-nascidos são colonizados pela microbiota uterina. Por exemplo, a *E. coli* não está presente na microbiota saudável de mecônio e na placenta durante a gravidez (Rota et al., 2021). A colonização por *E. coli* provavelmente ocorre durante a passagem pela vagina durante o parto natural, pelo contato com a microbiota oral da mãe ou por contaminação ambiental (Zakosek-Pipan et al., 2020). No entanto, em nosso estudo, *E. coli* foi isolada do endométrio de cadelas durante a cesariana e de ninhadas com infecções ao nascimento (sinais clínicos de infecção e confirmação por leucograma e hemocultura), o que pode sugerir infecção bacteriana uterina ascendente nessas cadelas, conforme descrito por Graham; Taylor (2012).

Todas as amostras de *E. coli* derivadas de fluidos uterinos neste estudo foram isoladas durante a cesariana de mães com recém-nascidos que nasceram com sepse, que foram então comparadas com os achados da hemocultura neonatal. Para confirmar essa relação, deve ser realizado o sequenciamento genético bacteriano, o que estava além do escopo deste estudo; o foco do presente estudo foi a identificação precoce de sinais clínicos de sepse em neonatos.

O *Streptococcus* beta-hemolítico foi o segundo principal agente responsável pela sepse neonatal neste estudo, correspondendo a 12,3% dos casos. Estudos demonstraram que o *Streptococcus* beta-hemolítico foi associado à sepse neonatal em cães com base na sua detecção em órgãos do recém-nascido (Schäfer-Somi et al., 2003; Vela et al., 2006; Meloni et al., 2014), útero materno (Sager; Remmers, 1990) e secreções vaginais (Guerrero et al., 2018), bem como nas secreções mamárias de cadelas com mastite

clínica e subclínica (Schäfer-Somi et al., 2003) cujos filhotes foram diagnosticados com sepse. Neste estudo, o *Streptococcus* foi isolado do fluido torácico de filhotes natimortos, hemoculturas de filhotes com sepse e do endométrio e colostro/leite das mães dessas ninhadas, o que pode indicar a origem da infecção nesses pacientes.

Os antibióticos utilizados para o tratamento da sepse no presente estudo (ceftriaxona, ceftiofur e amoxilina com clavulanato de potássio) são beta-lactâmicos de amplo espectro de ação e considerados seguros para cães neonatos. As cefalosporinas e penicilinas são classes de antibióticos frequentemente utilizadas e recomendadas na terapêutica das infecções neonatais (Daniels; Spencer, 2011; Mata; Papich, 2011; Munnich; Kuchenmeister, 2014; Lourenço, 2015). Devido à imaturidade hepática e renal dos cães recém-nascidos, a capacidade de metabolização e depuração são limitadas, desta forma, fármacos hidrossolúveis, como os beta-lactâmicos, são mais seguros em comparação aos lipossolúveis (que por sua vez, necessitam de metabolismo hepático para se tornarem mais hidrossolúveis e serem excretados pelo rins) (Grundy, 2006; Rickard, 2011; Mata; Papich, 2011). Os neonatos do estudo, receberam administrações intravenosas pela veia jugular, e após a melhora clínica, as administrações foram alteradas para via subcutânea. A administração inicial deve ser preferencialmente por via intravenosa ou intraóssea, já que na sepse ou choque séptico há baixa perfusão de capilares periféricos, sendo outras vias pouco eficazes (Daniels; Spencer, 2011).

Nos pacientes deste estudo, foram utilizadas inicialmente as maiores doses descritas para cães dos antibióticos utilizados. Devido às particularidades fisiológicas dos neonatos referentes à distribuição e metabolismo de fármacos, algumas alterações na antibioticoterapia podem ser necessárias. O neonato possui cerca de 85% de água corporal, desta forma, o volume para distribuição dos fármacos hidrossolúveis é maior, assim, a dose inicial deve ser aumentada para atingir concentrações plasmáticas adequadas (Rickard, 2011; Mata; Papich, 2011; Lourenço, 2015).

A antibioticoterapia foi instituída antes dos resultados das culturas bacterianas e antibiogramas, posteriormente, em casos de resistência bacteriana, os fármacos foram alterados. O tratamento empírico pode ser iniciado pela suspeita de infecção após a avaliação clínica, com base na experiência (Jones, 1987; Munnich; Kuchenmeister, 2014). A espera pelos resultados de exames complementares pode levar à perda de filhotes ou da ninhada inteira, já que a sepse pode ter evolução hiperaguda e morte em um curto período de tempo. Assim, justifica-se o tratamento empírico e precoce nas infecções neonatais (Daniels; Spencer, 2011; Munnich; Kuchenmeister, 2014).

É importante salientar a importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência destes pacientes. O sistema imune do cão recém-nascido é imaturo e de reatividade lenta, o que predispõe filhotes às diversas doenças infecciosas e reduz a capacidade de combate às infecções bacterianas, resultando em maior risco de morte até o desmame (Peterson; Kutzler, 2011; Klein et al., 2013; Chastant- Maillard; Mila, 2019). A falha na transferência da imunidade passiva é correlacionada com altas taxas

de mortalidade no período neonatal, cerca de 40% (MILA et al., 2014). Desta forma, em casos de déficit na ingestão do colostro, a sobrevivência do recém-nascido dependerá do suporte imune, por meio de uma fonte de imunidade passiva adequada, que pode ser oferecida por um substituto do colostro comercialmente disponível, banco de colostro/ordenha de uma lactante, soro ou plasma sanguíneo, ou produtos à base de ovo em pó hiperimunizado (Mila et al., 2017; Chastat-Maillard; Mila, 2019).

A alta mortalidade também está associada à falta de assistência adequada ou especializada a estes pacientes, bem como, ao atraso do tutor em encaminhar a ninhada para o atendimento. O conhecimento em neonatologia é fundamental para a conduta clínica adequada e maior taxa de sobrevivência neonatal. É essencial que durante as consultas pré-natais ou após a assistência ao parto, os tutores sejam instruídos sobre como avaliar e monitorar suas ninhadas. Desta forma, podem identificar precocemente sinais clínicos de neonatos em risco, como a falha no ganho de peso, recorrendo ao auxílio veterinário de forma precoce.

Conclui-se que a morbimortalidade da sepse neonatal em cães é alta, contudo, pode ser maior em locais sem assistência materna e neonatal adequada. A realização do pré-natal, monitorização, avaliação clínica minuciosa e diagnóstico precoce, são imprescindíveis para o sucesso do tratamento e para medidas preventivas em futuras ninhadas, contribuindo para a redução da taxa de mortalidade nestes pacientes.

Funding

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant number 2019/21366-0. The funding agency FAPESP provided financial support for the execution of the study.

Referências

- Bird KE. Hematological and lymphoid systems [Small Animal Pediatrics]. 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.
- Bouchard G, Plata-Madrid H, Youngquist RS, Buening GM, Ganjam VK, Krause GF, Allen GK, Paine AL. Absorption of an alternate source of immunoglobulin in pups. *Am. J. Vet. Res.* 1992;53:230-233.
- Brierley J, Carcillo JA, Choong K, Cornell T, DeCaen A, Deymann A, et al. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock: 2007 update from the American College of Critical Care Medicine. *Crit. Care Med.* 2009;37(2):666-688.
- Chastant S, Mila H. Passive immune transfer in puppies. *Anim. Reprod. Science.* 2019;207:162-170.

- Chastant-Maillard S, Guillemot C, Feugier A, Mariani C, Grellet A, Mila H. Reproductive performance and pre-weaning mortality: Preliminary analysis of 27.221 purebred female dogs and 204.537 puppies in France. *Reprod. Domest. Anim.* 2017;52:158-62.
- Daniels J, Spencer E. Bacterial infections. [Small Animal Pediatrics] 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.
- Fitzgerald KT, Newquist KL. Care of newborn animals [Small Animal Pediatrics] 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.
- Gill MA. Perinatal and late neonatal mortality in the dog. [PhD Thesis]. 2001. 190p. University of Sydney, New South Wales.
- Graham EM, Taylor DJ. Bacterial reproductive pathogens of cats and dogs. *Vet. Clin. Small Anim.* 2012;42:561–582.
- Grundy SA. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. *Vet. Clin. Small Anim.* 2006;36:443–459.
- Guerrero AE, Stornelli MC, Jurado SB, Giacoboni G, Sguazza GH, De la Sota RL, Stornelli MA. Vaginal isolation of beta-haemolytic *Streptococcus* from bitches with and without neonatal deaths in the litters. *Reprod. Domest. Anim.* 2018;53(3):609-616.
- Hoskins JD. Puppy and kitten losses. [Veterinary Pediatrics Dogs and Cats from Birth to Six Months] 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2001.
- Indrebø A, Trangerud C, Moe L. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Vet. Scand.* 2007;49:1-5.
- Jones RL. Special considerations for appropriate antimicrobial therapy in neonates. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1987;17:577– 601.
- Klein RP, Lourenço MLG, Moutinho FQ, Takahira RK, Lopes RS, Martins RR, Machado LP, Silveira VF, Ferreira H. Imunidade celular em caninos neonatos – do nascimento ao 45º dia de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2014;66:745-756.
- Konde AM, Gitau GK, Kiptoon J, Gakuya D. Puppy morbidity and mortality among breeding kennels in Nairobi, Kenya. *J. J. Vet. Sci. Res.* 2015;1(4):1-7.
- Kustritz MVR. Anamnesis and physical examination of the neonate. [Small Animal Pediatrics] 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.
- Lopez-Quintana A. Ten tips for successfully treating sepsis. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, 2015. In: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=14365&catId=73680&id=7259206>.
- Lourenço MLG. Cuidados com neonatos e filhotes. [Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos]. 1st ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2015.

Mace SE, Levy MN. Neural control of heart rate: a comparison between puppies and adult animals. *Pediatr. Res.* 1983;17:491–495.

Mata J, Papich MG. Pharmacological considerations in young patients. [Small Animal Pediatrics] 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.

Meloni T, Martino PA, Grieco V, Pisu MC, Banco B, Rota A, Veronesi MC. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. *Vet. Ital.* 2014;50:293-299.

Mila H, Grellet A, Delebarre M, Mariani C, Feugier A, Chastant-Maillard S. Monitoring of the newborn dog and prediction of neonatal mortality. *Prev. Vet. Med.* 2015;143:11-20.

Mila H, Grellet A, Mariani C, Feugier A, Guard B, Suchodolski J, Steiner J, Chastant-Maillard S. Natural and artificial hyperimmune solutions: impact on health in puppies. *Reprod. Domest. Anim.* 2017;52:163–169.

Montealegre-Golcher F. Surviving Sepsis in Veterinary Medicine. 2018. In: <https://www.isvma.org/wp-content/uploads/2018/10/SurvivingsepsisinVeterinary-Medicine.pdf>.

Mosier JE. Canine pediatrics - The neonate. In: *Proceedings 48th AAHA Annual Meeting Proceedings*, 1981.

Münnich A, Küchenmeister U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: Cornerstones of practical approach. *Reprod. Domest. Anim.* 2014;49:64–74.

Münnich A, Lübke-Becker A. Escherichia coli infections in newborn puppies-clinical and epidemiological investigation. *Theriogenology.* 2004;62:562-575.

Münnich A. The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Vet. Res. Commun.* 2008;32:S81-S85.

Peterson ME, Kutzler MA. [Small Animal Pediatrics] 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.

Rickard V. From birth to the first 24 hours. [Small Animal Pediatrics] 1st ed. Elsevier, Saint Louis, 2011.

Rota A, Del Carro A, Bertero A, Del Carro A, Cucuzza AS, Banchi P, Corrà M. Does bacteria colonization of canine newborns start in the uterus? *Animals.* 2021;11:1415.

Sager M, Remmers C. Perinatal mortality in dogs. A clinical, bacteriological and pathological study. *Tierarztl. Prax.* 1990;18(4):415-419.

Schäfer-Somi S, Spargser J, Breitenfellner J, Aurich JE. Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies-a retrospective study. *J. Vet. Med. B.* 2003;50(7):343-346.

- Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, Vervier K, Strang A, Simpson N, Kumar N, Stares MD, Rodger A, Brocklehurst P, Field N, Lawley TD. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature*. 2019;574:117–121.
- Sorribas CH. Atlas de neonatología y pediatría en caninos. 1st. ed. Inter-Médica, Buenos Aires, 2008.
- Vassalo FG, Simões CRB, Sudano MJ, Prestes NC, Lopes MD, Chiacchio SB, Lourenço MLG. Topics in the Routine Assessment of Newborn Puppy Viability. *Top. Companion Anim. Med.* 2015;30(1):16-21.
- Vela AI, Falsen E, Simarro I, Rollan E, Collins MD, Domínguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Neonatal Mortality in Puppies Due to Bacteremia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(2):666-668.
- Veronesi MC, Panzani S, Faustini M, Rota A. An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*. 2009;72:401-407.
- Von Dehn B. Pediatric clinical pathology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2014;44:205-219.
- Wilborn RR. Small animal neonatal health. *Vet. Clin. Small Anim.* 2018;48:683-699.
- Zachariassen LF, Krych L, Rasmussen SH, Nielsen DS, Kot W, Holm TL, Hansen AK, Hansen CHF. Cesarean section induces microbiota-regulated immune disturbances in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 2019; 202(1):142-150.
- Zakosek-Pipan M, Kajdic L, Kalin A, Plavec T, Zdovc I. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology*. 2020;152:18-28.
- Zakosek-Pipan M, Svara T, Zdovc I, Papic B, Avbersek J, Kusar D, Mrkun J. *Staphylococcus pseudintermedius* septicemia in puppies after elective cesarean section: confirmed transmission via dam's milk. *BMC Vet. Res.* 2019;15:1-8.