

**FRANCISCA MARIA MORGADINHO LOGRADO DE
FIGUEIREDO**

**DETEÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS
CANINO NO TRATO GENITAL DE CADELAS NAS
DIFERENTES FASES DO CICLO ÉSTRICO**

Orientadora:

Professora Doutora Ana Sousa Lopes

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

**FRANCISCA MARIA MORGADINHO LOGRADO DE
FIGUEIREDO**

**DETEÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS
CANINO NO TRATO GENITAL DE CADELAS NAS
DIFERENTES FASES DO CICLO ÉSTRICO**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, no dia 26 de abril de 2023, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação de Júri N.º 243/2023, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Eduardo Marcelino, por delegação da Professora Doutora Laurentina Pedroso.

Arguente: Professora Doutora Mariana Batista.

Orientadora: Professora Doutora Ana Sousa Lopes.

Co-orientadores: Professora Doutora Margarida Alves,
Professora Doutora Ana Amaral

Orientador externo: Professor Paulo Borges

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Dedicatória

À minha Avó Mé, a mulher mais forte que já conheci.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Sousa Lopes, pela sua orientação nesta dissertação de mestrado, ajudando-me com toda a disponibilidade e dedicação.

Ao meu orientador de estágio e coorientador desta dissertação, Doutor Paulo Borges, que contribuiu para o meu gosto por esta área e que acompanhou de forma incansável sempre com enorme dedicação, paciência e carinho não só os meses de estágio como a realização deste trabalho. Por todas as horas despendidas, mensagens trocadas e palavras de encorajamento, o meu sincero obrigada.

À Professora Doutora Margarida Alves, que assegurou a minha orientação na parte experimental deste trabalho, sempre com imensa paciência, carinho e gosto pelo ensino, sem a qual este projeto não teria sido possível.

À Professora Doutora Ana Amaral, com quem nunca tive oportunidade de ter aulas mas que foi uma ajuda essencial e um enorme apoio neste projeto.

Ao Hospital Veterinário Anicura Atlântico, que me recebeu e me fez sentir em casa durante todo o meu estágio. À Dra. Sónia por me ter proporcionado esta oportunidade de aprendizagem neste Hospital. A todo o corpo clínico – médicos, enfermeiros, auxiliares e rececionistas – que me acolheram e que estiveram sempre prontos para me ensinar e dar a mão quando precisei. O meu sincero agradecimento a todos os médicos que faziam questão de nos ensinar e que foram uma inspiração. Aos “super-enfermeiros” que nos ensinaram todos os procedimentos práticos sempre com imensa paciência e simpatia. Às rececionistas que melhoravam o nosso dia com a sua boa disposição. Às auxiliares que muitas vezes perdiam tempo a ajudar-me a preparar as coisas para este projeto, com especial agradecimento à Sara Roque que teve um papel essencial neste trabalho por tratar de toda a parte logística do centro de reprodução.

Aos estagiários que partilharam comigo estes meses – Maria, Rúben, Madalena, Martim, Rian, Rute, Margarida, Ana Rita e Marianas - por toda a boa disposição e amizade, sem vocês não teria sido o mesmo. À Maria Carlos, Inês Gonçalves e Inês Jerónimo que foram uma enorme ajuda na recolha das amostras para esta dissertação.

A toda a equipa do laboratório E 2.1, que tinham sempre uma palavra de força durante os meses em que fiz a parte experimental deste trabalho. À Joana Santos e

Gonçalo Portela, companheiros “juvenis” do laboratório que me encorajaram e acompanharam todo o processo laboratorial. À Professora Doutora Adriana que me deixou “invadir” o seu laboratório e aos Professores Doutores Marta Martins e Nuno Saraiva, no CBIOS, que me deixaram utilizar os seus laboratórios. À Doutora Ana Duarte, do INIAV, que amavelmente me cedeu o DNA do herpesvírus.

A toda a minha família – pais, irmãos, sobrinhos, tios e avós – que sempre me encorajaram a trabalhar e a seguir os meus sonhos desde pequena, e que sem eles, o sonho da Medicina Veterinária não teria sido possível.

Aos meus amigos de sempre e para sempre - Ana, Rodrigo, Neusa, Jéssica, Bárbara e Nastia – que sempre me apoiaram e acreditaram em mim ao longo de todos estes anos.

Aos meus amigos de curso que se tornaram amigos para a vida – Lara, Patanita, Maria, Tomás, Pedro, Ana, Capucho e Rúben– que acompanharam todo o meu percurso estes anos, obrigada foram de facto o melhor que a faculdade me deu e tornaram estes últimos 6 anos num dos períodos mais felizes de sempre.

À Nicky, a prova de que a amizade não vê distâncias e me ensinou que não há desculpas para desistir.

À Doutora Cláudia Correia, do Alcabideche Vet, e ao Professor Doutor João Martins, os Médicos Veterinários que me conheceram de fraldas e os responsáveis por me ter encantado por esta profissão.

Aos meus cães - Ollie e Emmy - que me relembram diariamente do motivo de todo o esforço durante este percurso.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona por ter sido a minha casa nos últimos 6 anos, e a todos os docentes que contribuíram para a minha formação.

A todos vocês, o meu sincero obrigada.

Resumo

O herpesvírus canino tipo I (HVC-1) está amplamente disseminado entre cães, com uma seroprevalência na Europa de 40 a 90%, sendo encontrado principalmente em canis de reprodução. Em animais adultos, a infeção varia de assintomática a doença ligeira, com sinais clínicos genitais, respiratórios e oculares. É também considerada uma causa frequente de infertilidade, distúrbios reprodutivos e mortalidade neonatal. Numa grande parte da população canina adulta, a infeção permanece latente e pode ser reativada durante eventos causadores de *stress*. No entanto, a correlação entre a disseminação do vírus e a fase do ciclo éstrico é ainda desconhecida.

O presente trabalho teve como objetivo identificar a presença de HVC-1 em cadelas e correlacionar a presença do vírus com as diferentes fases do ciclo éstrico, a sua saúde reprodutiva, parâmetros epidemiológicos e condições de manejo que possam constituir fatores de risco que favoreçam a transmissão da infeção. Entre Setembro de 2021 e Abril de 2022, foram recolhidas amostras por zaragatoa vaginal de 60 cadelas de várias idades e raças, apresentadas à consulta de reprodução no Centro de Reprodução Veterinária da Anicura Atlântico (CRVA). Para cada animal, foi determinada a fase do ciclo éstrico, realizada um esfregaço vaginal, através de zaragatoa, solicitando aos proprietários o preenchimento de um questionário sobre a saúde das cadelas e o seu historial reprodutivo. Através das zaragatoas vaginais, foi realizada a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “Deoxyribonucleic acid”) e uma reação em cadeia polimerase (PCR, do inglês “Polymerase chain reaction”) em tempo real para deteção da presença do DNA HVC-1.

O DNA HVC-1 foi detetado em 2 das 60 amostras (3,3%). Ambas as amostras pertenciam a animais adultos em fase de estro, sem vacinação contra o HVC-1, pertencentes a canis reprodutores, apresentando ambas histórico de infertilidade. Que seja do conhecimento da autora, o presente trabalho constitui a primeira descrição da deteção molecular de HVC-1 em cadelas em Portugal.

O facto do vírus ter sido identificado em animais em fase de estro, sem vacinação contra o HVC-1 e pertencentes a coletividades pode indicar que estes fatores podem ter favorecido a transmissão da infeção. O facto de ambos os animais positivos para HVC-1 terem historial de distúrbios reprodutivos é também de realçar. Globalmente, os resultados obtidos evidenciam a necessidade de mais estudos que permitam aprofundar o

conhecimento sobre a transmissão do vírus e a sua relação com a saúde reprodutiva das cadelas.

Palavras-chave: herpesvírus canino; infertilidade; PCR

Abstract

Canine herpesvirus type I (CHV-1) is widely spread among dogs, with a 40-90% distribution in Europe, mainly found in breeding kennels. In adult animals, the infection ranges from asymptomatic to mild illness with genital, respiratory and ocular clinical signs. It is also considered to be a major cause of infertility, reproductive disorders and neonatal mortality. In a large part of the adult canine population, infection remains latent and can be reactivated during stressful events. However, the correlation between the shedding of the virus and the phase of the oestrous cycle is still unknown.

The present study aimed to identify the presence of CHV-1 in bitches and to correlate the presence of the virus with the different phases of the oestrous cycle, the bitches' reproductive health, epidemiological parameters and management conditions that may constitute risk factors that favour infection transmission. Between September 2021 and April 2022, vaginal samples were taken from 60 bitches of various ages and breeds attending the reproduction consultation at Anicura Atlântico Veterinary Reproduction Centre. For each animal, the phase of the estrous cycle was determined, a vaginal swab was performed and the owners filled in a questionnaire about the bitches' health and reproductive history. The vaginal swabs were submitted to deoxyribonucleic acid (DNA) extraction and real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) to detect the presence of CHV-1 DNA.

CHV-1 DNA was detected in 2 of the 60 samples (3,3%). Both were adult animals in estrus, without vaccination against CHV-1, belonging to breeding kennels and both with history of infertility. As far as the author is aware, the present study constitutes the first description of CHV-1 molecular detection in female dogs in Portugal.

The fact that this virus was identified during estrus and in non-vaccinated animals against CHV-1 belonging to communities, may lead to hypothesize that these points may favour the disease transmission. Moreover, the observation that both animals positive for CHV-1 have a history of reproductive disorders should also be highlighted. Overall, the results obtained show the need for more studies that allow for a deeper understanding of the transmission of the virus and its relationship with the reproductive health of female dogs.

Keywords: canine herpesvirus; infertility; PCR

Abreviaturas, siglas e símbolos

< - Menor que

> - Maior que

° C – Graus Celsius

% – Percentagem

® – Marca registada

10× – Objetiva com ampliação de 10 vezes

40× – Objetiva com ampliação de 40 vezes

µL – Microlitro

β-actina – Beta-actina

ALT – Alanina aminotranferase

BLAST – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local , do inglês “Basic Local Alignment Search Tool

C- – Controlo negativo

C+ – Controlo positivo

CBIOS – Research Center for Biosciences & Health Technologies

Cm – Centímetros

CRVA – Centro de Reprodução Veterinário do Anicura Atlântico

C_T – Limiar de deteção, do inglês “Cycle threshold”

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

dNTP's – Desoxirribonucleótidos trifosfato, do inglês “Deoxynucleotide triphosphate”

ECAR – Colégio Europeu de Reprodução Animal, do inglês “European College of Animal Reproduction”

ELFA – Ensaio enzimático fluorescente ligado a enzima, do inglês “Enzyme-linked fluorescent assay”.

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

Et al. – E outros, da locução latina “*et alli*”

FMV-ULusófona – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona

FSH – Hormona folículo-estimulante , do inglês “Follicle-stimulating hormone”

g – Grama

g – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

GH – Hormona de crescimento, do inglês “Grown hormone”

H – Horas

HVA – Hospital Veterinário Anicura Atlântico

HVC-1 – Herpevírus canino tipo 1

HVF – Herpevírus felino

ICNF – Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas

IgG – Imunoglobulina G

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPMA – Teste da imunoperoxidase em monocamada, do inglês “Immunoperoxidase Monolayer Assay”

LACH – Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia

MDCK – Células Madin Darby de rim canino, do inglês “Madin- darby canine kidney cells”

Mg – Miligramas

mL – Mililitros

Mm – Milímetros

m/v – Rácio massa:volume

Ng – Nanograma

Nm – Nanometro

Pb – Pares de bases

PBS – Tampão Fosfato Salino, do inglês “Phosphate Buffered Saline”

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

Pg – Picograma

PGE2 – Prostaglandina E2

pH – Potencial de Hidrogénio

pmol – picomole

PO – Por via oral, da locução latina “*per os*”

P4 – Progesterona

SPR – Recetáculo de fase sólida, do inglês “Solid phase receptacle”

U – unidade

TAC – Tomografia Axial Computorizada

TBE – Tampão Tris-borato EDTA

TM – Temperatura de *Melting*

ULusófona – Universidade Lusófona

Índice

I. Casuística de Estágio.....	18
1.1. Hospital Veterinário Anicura do Atlântico.....	18
II. Detecção molecular de herpesvírus canino no trato genital de cadelas nas diferentes fases do ciclo éstrico.....	24
1. Introdução.....	24
1.1. Herpesvírus canino.....	24
1.1.1 Etiologia.....	24
1.1.2 Epidemiologia e fatores de risco.....	25
1.1.3 Patogenia e sinais clínicos.....	27
1.1.3.1 Cachorros recém-nascidos.....	28
1.1.3.1.1 Infecção transplacentária.....	28
1.1.3.1.2 Infecção pós natal em cachorros.....	29
1.1.3.2 Jovens e adultos.....	31
1.1.3.2.1 Sinais clínicos respiratórios.....	31
1.1.3.2.2 Sinais clínicos oculares.....	32
1.1.3.2.3 Sinais clínicos genitais.....	33
1.1.3.2.1.1 Infertilidade na cadela.....	33
1.1.4 O herpesvírus noutras espécies.....	34
1.1.5 Diagnóstico.....	35
1.1.5.1 Isolamento viral.....	36
1.1.5.2 Serologia.....	37
1.1.5.3 Diagnóstico molecular por PCR.....	38
1.1.5.4 Necrópsia.....	39
1.1.6 Tratamento e prognóstico.....	40
1.1.7 Profilaxia.....	42
1.1.7.1 Gestão da coletividade.....	43
1.1.7.2 Imunidade passiva.....	45
1.1.7.3 Vacinação.....	45
1.2 Aspetos da fisiologia reprodutiva da cadela.....	46
1.2.1 Ciclo éstrico.....	47
1.2.1.1 Proestro.....	48

1.2.1.2 Estro.....	50
1.2.1.3 Diestro.....	53
1.2.1.4 Anestro.....	53
1.2.2 Técnicas para determinação do ciclo éstrico na cadela.....	54
1.2.2.1 Citologia vaginal.....	54
1.2.2.2 Medição da concentração de progesterona.....	54
1.2.2.3 Ecografia abdominal.....	55
2. Material e Métodos.....	57
2.1 Objetivos.....	57
2.2 Descrição da amostra em estudo.....	57
2.3 Recolha de amostras.....	58
2.4 Avaliação citológica.....	59
2.5 Quantificação da progesterona.....	61
2.6 Deteção molecular de herpesvírus canino.....	61
2.6.1 Extração de DNA.....	62
2.6.2 Quantificação do DNA isolado.....	63
2.6.3 Avaliação da qualidade de DNA extraído.....	64
2.6.4 Deteção de HVC-1 por PCR em tempo real.....	65
2.6.5 Purificação dos produtos de PCR e sequenciação.....	67
3. Resultados.....	68
3.1 Caracterização da amostra estudada.....	68
3.1.1 Caracterização por idade.....	68
3.1.2 Caracterização por raça.....	68
3.1.3 Caracterização por proveniência dos animais.....	69
3.1.4 Caracterização por número de gestações.....	70
3.1.5 Caracterização por presença de atual patologia urogenital.....	70
3.1.6 Caracterização por presença de histórico de infertilidade.....	71
3.1.7 Caracterização por métodos profiláticos.....	72
3.1.8 Caracterização por fase do ciclo éstrico.....	73
3.2 Análise molecular.....	74
3.2.1 Amplificação de um fragmento do gene <i>β-actina</i>	74
3.2.2 Deteção do DNA de HVC-1 por PCR em tempo real.....	74

3.2.3 Sequenciação de DNA.....	75
3.2.4 Caracterização dos animais positivos para HVC-1.....	75
4. Discussão.....	77
5. Conclusão.....	88
6. Referências bibliográficas.....	89
7. Apêndices.....	100
Apêndice A – Ficha de registo individual preenchida pelos tutores.....	100
Apêndice B – Póster apresentado no congresso do CIISA, nos dias 11 e 12 de Novembro de 2022.....	103

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição absoluta e relativa das consultas por especialidade durante o período de estágio.....	20
Tabela 2 – Distribuição absoluta e relativa de exames de diagnóstico realizados durante as consultas e internamentos.....	21
Tabela 3 – Distribuição absoluta e relativa dos atos médicos acompanhados durante as consultas e internamentos.....	22
Tabela 4 – Relação entre as concentrações plasmáticas de progesterona e a evolução da fase folicular (proestro e estro) na cadela.....	55
Tabela 5 – Protocolo de coloração <i>Diff-Quick</i> (Panótico Rápido kit®).....	60
Tabela 6 – Protocolo de coloração <i>Harris-Shorr</i> (Kit Diag-oestro®).....	60
Tabela 7 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação de um fragmento do gene da <i>β-actina</i> (Maia <i>et al.</i> , 2010).....	64
Tabela 8 – <i>Primers</i> utilizados na amplificação do DNA de HVC-1 por PCR em tempo real (Decaro <i>et al.</i> , 2010).....	66
Tabela 9 – Distribuição da amostra por raça.....	69

Índice de Figuras

Figura 1 – Imagem representativa da técnica de colheita de material para realização de citologia vaginal (Adaptado fr Johnston, Kustritz & Olson, 2001).....	59
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento do gene <i>β-actina</i>	74
Figura 3 – Curva de <i>melting</i> de uma das amostras positivas.....	75
Figura 4 – Resultado da sequenciação de Sanger de uma das amostras positivas.....	75

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição relativa dos animais observados no HVA durante o período de estágio.....	19
Gráfico 2 – Distribuição relativa das diferentes áreas cirúrgicas acompanhadas no HVA durante o período de estágio.....	23
Gráfico 3 – Distribuição relativa da amostra estudada em função da idade.....	68
Gráfico 4 – Distribuição absoluta da amostra de acordo com o número de gestações.....	70
Gráfico 5 – Distribuição relativa da amostra por presença de atual patologia urogenital.....	71
Gráfico 6 – Distribuição absoluta da amostra por tipo de patologia reprodutiva.....	72
Gráfico 7 – Distribuição absoluta da amostra por fase do ciclo éstrico.....	73
Gráfico 8 – Distribuição absoluta da amostra por fase folicular, lútea ou anestro.....	73

I. Casuística do Estágio

O estágio curricular para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária teve a duração de 5 meses, no período compreendido entre 15 de Setembro a 15 de Fevereiro de 2022, no Hospital Veterinário Anicura Atlântico (HVA), sob a orientação do Professor Paulo Borges, com o acompanhamento da Dra. Rita Antunes e do Dr. Rúben Silva, Médicos Veterinários responsáveis pelo acompanhamento dos estagiários no HVA.

Após o estágio no HVA, o mesmo teve seguimento no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (FMV-ULusófona), onde durante 4 meses foi realizada a parte experimental do estudo conducente à presente Dissertação. O estágio no Laboratório do Hospital da ULusófona, foi orientado pela Professora Doutora Margarida Alves e Professora Doutora Ana Amaral, fomentando o desenvolvimento de competências na prática laboratorial e permitindo o acompanhamento de todas as fases do estudo desta Dissertação, que será descrito com maior detalhe no Capítulo 2 (Material e Métodos).

1. Hospital Veterinário Anicura do Atlântico

O HVA é um Hospital de referência situado no concelho de Mafra que se destaca pela formação contínua da sua equipa multidisciplinar e pela inovação tecnológica, encontrando-se na vanguarda da Medicina Veterinária em Portugal, oferecendo um serviço de excelência.

O Centro de Reprodução Veterinário Anicura Atlântico (CRVA), funciona estruturalmente em paralelo com o HVA, e é coordenado pelo Dr. Paulo Borges, especialista pelo Colégio Europeu de Reprodução Animal (ECAR, do inglês European College of Animal Reproduction), recebendo animais de pequeno porte de todo o País. Oferece um serviço de consultas de reprodução assistida para seguimento de cio, inseminação artificial, acompanhamento ecográfico de gestação, realização de cesarianas, cirurgias laparoscópicas na área da reprodução e recolha e acondicionamento de sémen no banco de sémen do CRVA, para além de todo o apoio na área da patologia da reprodução.

No decorrer do estágio, a distribuição dos horários era realizada com base numa rotação quinzenal pelos diversos Médicos Veterinários, permitindo a passagem pelas

diversas especialidades, com duas folgas semanais, um turno noturno semanal e turnos de fim de semana quinzenais.

Dia 21 de Fevereiro foi iniciado o estágio extra-curricular exclusivamente no CRVA com a duração de 6 semanas, realizando o horário em paralelo com o Dr. Paulo Borges, que correspondia a 3 vezes por semana das 9h às 18h. Com este estágio foi possível solidificar os conhecimentos na área da reprodução de pequenos animais e recolher um maior número de amostras para esta dissertação. Foi possível observar e participar, também, na realização de consultas, seguimentos de cio, diagnósticos de gestação, acompanhamento ecográfico de gestação, inseminações, vaginoscopias e cirurgias na área da reprodução, incluindo cirurgias através de técnica laparoscópica.

Ao longo de todo o período de estágio foram observados 915 animais, onde 60% eram cães (n=552), 39% (n=361) gatos e 0,22% (n=2) corresponderam a animais exóticos, como se encontra descrito no Gráfico 1.

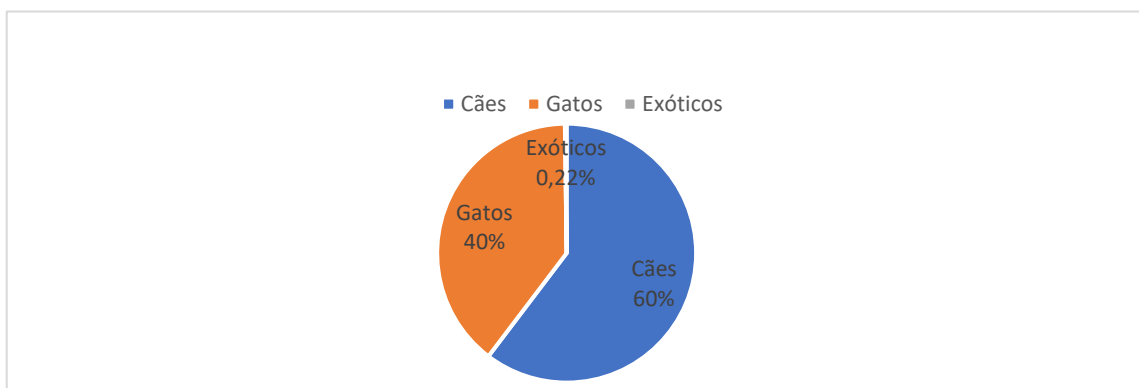


Gráfico 1 – Distribuição relativa dos animais observados no HVA durante o período de estágio.

Consultas

Durante o estágio foi possível acompanhar os Médicos Veterinários na realização de várias consultas nas diversas áreas. Foram acompanhadas 983 consultas. Nas mesmas, observou-se e realizaram-se anamnese, exame físico, recolha de material para análise e discussão com o Médico Veterinário, diagnósticos diferenciais, plano de tratamento, complicações e prognóstico. As diversas consultas de especialidade estão descritas com mais detalhe na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição absoluta e relativa das consultas por especialidade durante o período de estágio.

<i>Especialidades</i>	<i>Frequência absoluta</i>	<i>Frequência relativa</i>
<i>Neurologia</i>	10	1,01%
<i>Oftalmologia</i>	9	0,92%
<i>Otorrinolaringologia</i>	5	0,51%
<i>Gastroenterologia</i>	91	9,26%
<i>Pneumologia</i>	86	8,75%
<i>Cardiologia</i>	78	7,93%
<i>Urologia/Nefrologia</i>	76	7,73%
<i>Dermatologia</i>	14	1,42%
<i>Endocrinologia</i>	37	3,76%
<i>Oncologia</i>	13	1,32%
<i>Ortopedia e Sistema Músculo-esquelético</i>	14	1,42%
<i>Doenças Infeciosas</i>	73	7,43%
<i>Reprodução</i>	235	23,91%
<i>Urgências</i>	76	7,73%
<i>Animais exóticos</i>	2	0,20%
<i>Consulta de Reavaliação Pós-Cirúrgica</i>	7	0,72%
<i>Medicina Preventiva</i>	143	14,55%
<i>Medicina Paliativa</i>	3	0,31%
<i>Eutanásias</i>	11	1,12%
Total	983	100%

Internamento

O internamento encontra-se dividido por área de cães, gato, unidade de doenças infetocontagiosas e serviço de neonatologia. No internamento foi possível a realização de exames físicos aos animais: avaliação do estado mental, coloração das membranas mucosas, medição do tempo de repleção capilar, medição da frequência cardíaca, medição da frequência respiratória, avaliação do pulso e medição da temperatura. Ajudou-se também na realização de todas as medicações e alimentações e na realização de exames complementares laboratoriais ou de imagiologia.

Todos os exames complementares de diagnóstico realizados no momento da consulta e em internamento estão descritos na Tabela 2. Todos os atos médicos assistidos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2 – Distribuição absoluta e relativa de exames complementares de diagnóstico realizados durante as consultas e internamento.

<i>Exames de diagnóstico</i>	<i>Frequência absoluta</i>	<i>Frequência relativa</i>
<i>Hemograma</i>	380	18,71%
<i>Microhematócrito</i>	20	0,99%
<i>Esfregaço de sangue</i>	4	0,20%
<i>Ionograma</i>	203	10,00%
<i>Análises bioquímicas</i>	364	17,93%
<i>Análises endócrinas</i>	24	1,18%
<i>Medição do valor de progesterona</i>	150	7,39%
<i>Tempos de coagulação</i>	3	0,15%
<i>Gasimetria</i>	2	0,10%
<i>Testes rápidos (FIV e FeLV; Leishmaniose; Parvovírus)</i>	38	1,87%
<i>Citologia auricular</i>	3	0,15%
<i>Citologia vaginal</i>	195	9,61%
<i>Espemograma</i>	29	1,43%
<i>Radiologia</i>	198	9,75%
<i>Ecocardiografia</i>	76	3,74%
<i>Eletrocardiografia</i>	5	0,25%
<i>Ecografia abdominal</i>	220	10,84%
<i>Tomografia computadorizada e mielografia</i>	14	0,69%
<i>Punção aspirativa por agulha fina</i>	2	0,10%
<i>Teste de fluoresceína e shirmer</i>	6	0,30%
<i>Fluoroscopia</i>	4	0,20%
<i>Cistocentese</i>	56	2,75%
<i>Abdominocentese</i>	22	1,08%
<i>Pleurocentese e pericardiocentese</i>	12	0,59%
Total	2030	100%

Tabela 3 – Distribuição absoluta e relativa de atos médicos acompanhados durante as consultas e internamento.

Atos Médicos	Frequência absoluta	Frequência relativa
<i>Preparação e administração de medicação</i>	2100	81,49%
<i>Colheita de sangue</i>	95	3,68%
<i>Cateterização venosa</i>	95	3,68%
<i>Preparação sistema de soro</i>	95	3,68%
<i>Transfusão de sangue / plasma</i>	8	0,31%
<i>Administração de quimioterapia</i>	4	0,16%
<i>Colocação de Microchip</i>	3	0,12%
<i>Algáliação</i>	8	0,31%
<i>Lavagem vesical</i>	4	0,16%
<i>Descompressão Gástrica</i>	8	0,31%
<i>Lavagem Gástrica</i>	8	0,31%
<i>Colocação e administração de alimentação por entubação nasogástrica e esofágica</i>	6	0,23%
<i>Drenagem Pleural /Abdominal</i>	4	0,16%
<i>Inseminação Artificial Transcervical</i>	18	0,70%
<i>Cuidados Neonatais</i>	70	2,72%
<i>Recolha de sémen</i>	14	0,54%
<i>Congelação de sémen</i>	4	0,16%
<i>Entubação Endotraqueal</i>	6	0,23%
<i>Pensos</i>	19	0,74%
<i>Lavagem auricular</i>	8	0,31%
Total	2577	100%

Cirurgia

Nas cirurgias foi possível desempenhar diversas funções tais como a função de circulante, cirurgião assistente, preparação anestésica (que inclui cateterização, entubação endotraqueal, sedação, tricotomia, limpeza e assepsia do campo cirúrgico), ajuda na seleção dos fármacos anestésicos mais adequados, monitorização anestésica e auxílio no recobro (extubação, monitorização da frequência cardíaca e respiratória no pós-cirúrgico). Foi possível observar e auxiliar os Médicos Veterinários em diversas cirurgias – tecidos moles, ortopédicas, de mínima invasão e endoscopia - programadas e algumas de urgência. Nas cesarianas realizadas, foi possível auxiliar na reanimação neonatal e prestar cuidados neonatais nas primeiras horas de vida dos cachorros.

A distribuição entre as diversas áreas cirúrgicas está descrita com maior detalhe no Gráfico 2.

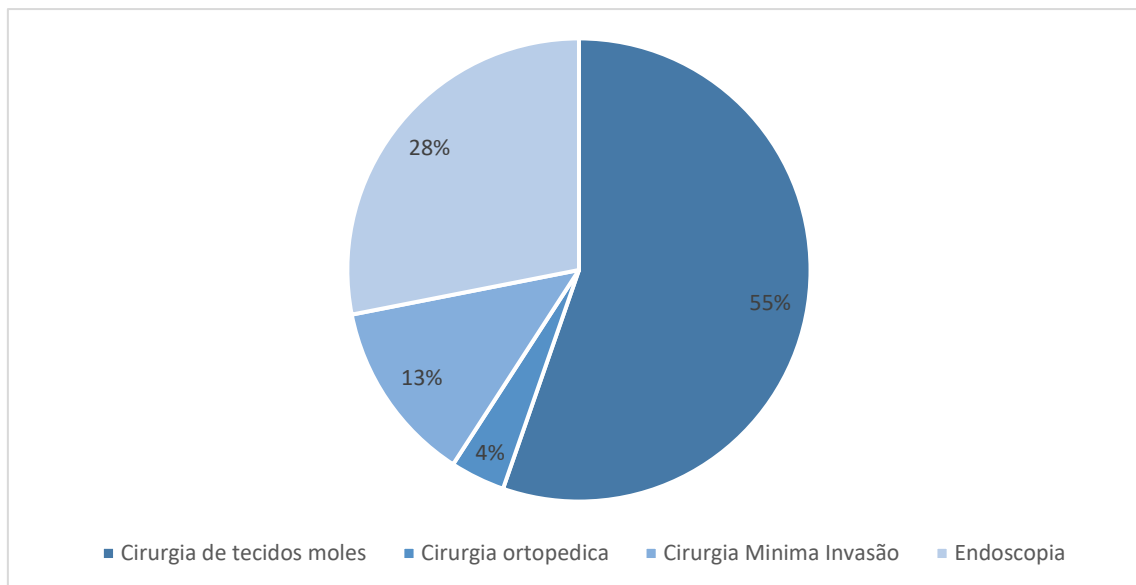


Gráfico 2 – Distribuição relativa das diferentes áreas cirúrgicas acompanhadas no HVA durante o período de estágio.

II. Detecção molecular de herpesvírus canino no trato genital das cadelas nas diferentes fases do ciclo éstrico

1. Introdução

1.1 Herpesvírus canino

1.1.1 Etiologia

O herpesvírus canino do tipo 1 (HVC-1) foi descrito pela primeira vez em 1965 por Carmichael *et al.* e foi classificado mais tarde como um vírus do género *Varicelovírus* da subfamília *Alphaherpesviridae* (Fontbonne, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

É um vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”), com envelope e com capacidade de rápida replicação intracelular, característica comum a todos os Herpesvírus. Esta replicação é seguida por um efeito citopático acompanhado por formação de inclusões intranucleares e, em alguns casos, responsável pela indução de sincícios intra-celulares (Greene, 2012).

Devido ao seu invólucro, este vírus é facilmente inativado por desinfetantes e solventes lipídicos, tais como o éter e o clorofórmio. A inativação ocorre em algumas horas quando exposto a temperaturas superiores a 37 graus Celcius (°C). Apresenta a capacidade de permanecer estável a temperaturas de -20°C durante 5 dias. Este vírus é também sensível a variações no potencial de hidrogénio (pH), sendo inativado quando exposto a valores de pH inferiores a 5 ou superiores a 8 (Parzefall, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

O ambiente ótimo para a sua replicação ocorre em temperaturas com valores entre os 35 a 37°C. Estes valores de temperatura coincidem com a temperatura encontrada nas mucosas do aparelho reprodutivo e vias respiratórias, e em cachorros durante as primeiras semanas de vida. Tal está relacionado com os potenciais locais de excreção viral e o modo de contaminação horizontal deste agente patogénico, implicando normalmente proximidade entre animais (Parzefall, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012).

Uma característica relevante comum a todos os Herpesvírus, consiste na sua capacidade de latência. Quando infetado, o hospedeiro permanece portador do vírus na sua forma latente, sem replicação viral. O HVC-1, durante o período de latência, localiza-se principalmente no tecido ganglionar e linfóide, em zonas de contágio como a mucosa reprodutiva e a mucosa oral (Rootwelt *et al.*, 2011).

Segundo Carmichael (1999), o vírus latente persiste nos gânglios do nervo trigêmeo, gânglios lombo sacrados, amígdalas e glândulas salivares parótidas.

Quando o vírus entra em estado de latência não há manifestação de sinais clínicos, o que dificulta o seu diagnóstico. Quebras na imunidade do animal que poderão dever-se a fatores tais como o *stress*, presença de outras patologias, gestação ou administração de determinados fármacos, poderão ser suficientes para causar reativação do vírus (Ledbetter *et al.*, 2009; Greene, 2012). Quando o anterior acontece, ocorre replicação e excreção viral, levando ao aparecimento de sinais clínicos ligeiros ou mesmo ausentes, possibilitando uma transmissão viral de forma eficaz entre hospedeiros suscetíveis (Franco *et al.*, 2012). Como já foi referido, esta replicação ocorre no núcleo das células, originando corpos de inclusão intranucleares que são achados citológicos importantes para o diagnóstico de animais portadores (Greene, 2012).

O HCV-1 apresenta como hospedeiros um grupo restrito de espécies, sendo que apenas é patogénico em animais domésticos e animais selvagens da família Canidae.

1.1.2 Epidemiologia e fatores de risco

O HVC-1 é um vírus ubiquitário e a sua prevalência varia bastante, quer entre diferentes canis, como também entre diferentes países (Kawakami *et al.*, 2010). É um vírus que pode ser encontrado comumente na população canina, estando relatado a sua presença em todos os continentes (Krogenaes *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Ledbetter em 2013, sugerem que a infeção pelo HVC-1 se distribui a nível mundial e a seroprevalência varia bastante entre países, com valores compreendidos entre 6 e 100%.

As maiores taxas de seroprevalência são encontradas na Europa, com especial foco nos canis de criação. De acordo com Greene (2012), este facto poderá ser explicado pelo aumento da disseminação do vírus, devido ao maior agrupamento de cães nos sistemas de criação.

Está descrita a presença de títulos de anticorpos superiores em sistemas de criação com práticas de higiene questionáveis quando comparadas a sistemas de criação com boas práticas de higiene (Okuda *et al.*, 1993). Estes relatos reforçam a importância da transmissão oronasal (Kawakami *et al.*, 2010).

A prevalência de HVC-1 entre sistemas de criação e animais de propriedade privada varia bastante entre autores. Babaei *et al.* (2010) e Ronsse *et al.* (2004) relataram

que não existe diferença significativa observada entre propriedade privada e canil. Estes autores sugeriram que a prevalência de HVC-1 não é necessariamente maior em coletividades de cães e que a superlotação ou fatores de gestão poderão desempenhar papéis que são mais importantes. Por outro lado, Dalhbom *et al.* (2009) descreveram a presença de cães em canis com elevado número de animais apresentavam títulos de HVC-1 mais elevados do que cães de unidades menores. Segundo um estudo realizado por Ronsse *et al.* (2005), onde foram investigados fatores que poderiam influenciar a seroprevalência deste vírus, não foram descritas diferenças entre raça e gênero. No entanto, foram encontradas grandes variações nos níveis de anticorpos, quando comparando amostras de cães com diferentes idades. Animais com menos de seis meses não apresentavam anticorpos, no entanto a partir dos 2 anos de idade, os títulos aumentavam consideravelmente (Acar *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012; Yesilbag *et al.*, 2012). Possíveis explicações encontradas para estes achados poderão ser o reduzido tempo de exposição dos animais jovens ao vírus ou poderá estar também relacionado pela ocorrência da puberdade e dos seus efeitos hormonais que poderão reativar o vírus e produzindo conseqüentemente maior número de anticorpos (Ronsse *et al.*, 2004). Dahlbom *et al.* (2009) relatou a relação entre a infecção por HVC-1 e a ocorrência de patologias reprodutivas, como é o caso de problemas de infertilidade de acordo com Van Gucht *et al.* (2001), dado que cães de coletividade com títulos elevados de HVC-1 apresentaram maior número de patologias reprodutivas comparativamente a cães com títulos inferiores.

Foi também observada uma semelhança entre os padrões de titulação de anticorpos existentes entre fêmeas nunca sujeitas a cobrição e fêmeas já cobertas, sugerindo que a principal via de transmissão do vírus será a via oronasal (Krogenæs *et al.*, 2014; Ronsse *et al.*, 2005). No entanto, de acordo com Babaei *et al.* (2010), do ponto de vista epidemiológico a transmissão venérea apresenta maior relevância.

Ronsse *et al.* (2005) não detetou diferenças significativas entre padrões de títulos de anticorpos consoante a fase do ciclo em que a cadela se encontrava. A titulação tende a variar durante a vida do animal e, apesar de não haver correlação direta com a fase do ciclo, sabe-se que durante o diestro algumas fêmeas tendem a apresentar um nível de anticorpos mais baixo (Ronsse *et al.*, 2005).

Segundo Pratelli *et al* (2014) o HVC-1 é considerado pouco imunogénico, pelo que os anticorpos, geralmente, estão presentes em maiores concentrações durante 4 a 8 semanas após o contacto com o vírus, dificultando o cálculo da sua prevalência real.

1.1.3 Patogenia e sinais clínicos

Em cachorros, a infeção pelo HVC-1 poderá ocorrer através do contacto direto com outros cachorros infetados; por via transplacentária; na passagem pelo canal vaginal; no contacto com as secreções oronasais da mãe ou ainda, apesar de menos comum, através de fómites. O seu período de incubação está compreendido entre 3 a 10 dias (Morresey, 2004). A mortalidade é bastante elevada em recém-nascidos com menos de uma semana, dado que são bastante suscetíveis a infeções generalizadas. Cachorros com mais de 3 semanas, geralmente desenvolvem apenas sintomatologia leve ou até assintomáticos, tornando-os mais resistentes à infeção (Decaro *et al.*, 2008).

Em cães adultos, o vírus desenvolve-se nas mucosas do trato genital, amígdalas, e nasofaringe, com disseminação posterior para órgãos alvo como baço, rins, linfonodos retrofaríngeos e brônquicos, e menos frequentemente pulmões. Em adultos com uma resposta imunitária competente contra o vírus, este integrar-se-á no DNA celular do hospedeiro e, com poucos ou nenhuns sinais clínicos, desenvolvendo latência em tecidos nervosos e linfóides de forma crónica (Fontbonne, 2011; Green, 2012).

De acordo com alguns autores, acredita-se que os locais de latência do HVC-1 estão associados à sua via de transmissão. Quando existe latência nas glândulas salivares parótidas, amígdalas, gânglios do nervo trigémio ou linfonodos retro-faríngeos, pensa-se que a transmissão é geralmente realizada através das secreções da mucosa oronasal. Por outro lado, quando existe latência nos gânglios lombo-sagrados, pensa-se que a sua transmissão é realizada principalmente através do trato reprodutivo. O vírus é detetado mais frequentemente em tecidos relacionados com a mucosa oronasal, o que é concordante com a sua principal via de transmissão (Burr *et al.*, 1996).

Em caso de reativação, a disseminação do vírus geralmente dura apenas poucos dias, enquanto que, em casos de infeção primária, a disseminação é mais prolongada e as titulações mais altas (Ronsse *et al.*, 2005).

1.1.3.1 Cachorros recém-nascidos

O HVC-1 está descrito como sendo a infecção viral mais comum e grave em cachorros neonatos, podendo atingir taxas de mortalidade de 100% numa ninhada (Carmichael, 2004; Decaro *et al.*, 2008). Em casos menos graves, nem todos os cachorros da ninhada são infetados, podendo os sinais clínicos e a gravidade dos mesmos variarem entre animais da mesma ninhada (Sykes, 2014). Displasia da retina e encefalite granulomatosa são alguns exemplos de sequelas graves que os cachorros, que sobrevivem, poderão apresentar (Greene, 2012; Percy *et al.*, 1971).

Estudos comprovaram que este vírus está presente de uma forma persistente nos linfonodos lombo-sagrados, entrando em circulação quando reativado. Dá-se posteriormente a sua replicação nas mucosas e consequente excreção pelas mucosas genitais contaminando os neonatos durante o parto e provocando possível transmissão do vírus (Green, 2012).

Geralmente as fêmeas que têm cachorros que morreram com infecção pelo HVC-1 tornam-se portadoras assintomáticas. A localização genital em cadelas faz com que seja transmitido, não apenas sexualmente, mas também no momento do parto (Greene, 2012).

1.1.3.1.1 Infecção transplacentária

O contacto com o vírus por cadelas gestantes que não tenham títulos protetores de anticorpos consiste uma ameaça à gestação (Fontbonne, 2011). Caso ocorra infecção primária ou reativação viral durante a gestação da cadela, esta poderá originar não só infecção do feto por via transplacentária mas também originar lesões degenerativas e necrosantes na placenta (Morresey, 2004; Ronsse *et al.*, 2004; Noakes *et al.*, 2008; Forsberg, 2010; Maclachlan & Dubovi, 2011).

A transmissão placentária ocorre geralmente entre o período médio e o período final da gestação, apresentando diferentes consequências, dependendo do período gestacional. A infecção através desta via poderá resultar em reabsorção embrionária, aborto, morte fetal, mumificação, nascimento prematuro, nados-mortos ou nascimento de cachorros debilitados (Evermann *et al.*, 2011).

Caso a infecção ou reativação ocorra nos primeiros 30 a 40 dias de gestação, esta poderá provocar reabsorção ou morte fetal (Hashimoto *et al.*, 1983). É importante referir que, por vezes, os criadores apenas se queixam de problemas de fertilidade, porque nem sempre detetam a presença de uma gestação e a perda da mesma (Fontbonne, 2011). A

reabsorção embrionária poderá ser detetada com recurso à ecografia (Ronsse *et al.*, 2005). Infecções mais tardias, entre os 40 a 55 dias de gestação, podem ser responsáveis por mumificações, nascimentos prematuros, nados mortos ou nascimento de cachorros fracos que poderão morrer até 2 semanas após o nascimento (Hashimoto *et al.*, 1982).

Pode acontecer também, na mesma ninhada nascerem cachorros infetados e outros não, no entanto, os cachorros que nascem vivos, geralmente apresentam menor tamanho comparativamente à restante ninhada e apresentam fraqueza (Greene, 2012).

As placentas poderão também ser afetadas, apresentando necrose multifocal, com antigénio viral e corpos de inclusão no epitélio do trofoblasto e nas células endoteliais. O vírus pode ser também responsável por vasculite e degenerescência da parede dos vasos sanguíneos alantóicos (Hashimoto *et al.*, 1982).

1.1.3.1.2 Infecção pós-natal em cachorros

Os sinais clínicos são inespecíficos. A maioria dos cachorros desenvolve infecção sistémica fatal, até nove dias após o nascimento. No entanto, alguns cachorros podem sobreviver à infecção sem evidenciar quaisquer sinais clínicos, mantendo somente o vírus latente nos seus tecidos (Green, 2012).

Nas primeiras 24 horas após a exposição viral, a replicação primária ocorre nas células epiteliais das mucosas, entrando depois na corrente sanguínea através dos macrófagos. A presença do vírus nas células fagocitárias mononucleares dos linfonodos e no baço, resultam numa disseminação celular conduzindo a uma hiperplasia linfóide com necrose hemorrágica multifocal em vários órgãos, nomeadamente nos rins, baço, pulmões, fígado e glândulas adrenais (Green, 2012).

Cachorros, durante a primeira e segunda semanas de vida podem desenvolver doença fatal hemorrágica e necrosante, de aparecimento agudo e progressão fatal, o que torna este período, o mais crítico na progressão da infecção (Oliveira *et al.*, 2009).

Cães a partir das 2-3 semanas de vida geralmente são assintomáticos (Greene, 2012). A partir desta idade, os animais geralmente sobrevivem à infecção, passando por um breve período de excreção do vírus, com sintomatologia clínica ligeira ou mesmo nula, ficando o vírus posteriormente presente nos tecidos em estado latente (Evermann *et al.*, 2011). No entanto, segundo Brumitt *et al.*, (2005) existem relatos de infecções fatais nestas idades.

A nível de sinais clínicos, cachorros com menos de 3 semanas de idade infectados com HVC-1, poderão apresentar distúrbios gastrointestinais e respiratórios graves, hipotermia, hipoglicemia, necrose hemorrágica multifocal progressiva, necrose das extremidades provocada por fenómenos de vasculite. A circulação deste vírus em ninhadas representa grandes perdas a nível económico, sobretudo em canis de reprodução (Evermann & Kennedy, 2011; Fontbonne, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Os cachorros recém-nascidos são incapazes de regular eficientemente a sua temperatura corporal podendo entrar facilmente em hipotermia. Geralmente apresentam temperatura rectal de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, inferior à dos cães adultos que se compreende entre os 38.4°C e 39.3°C (England & Heimendahl, 2010). Por esta razão, são mais suscetíveis à infeção pelo HVC-1, uma vez que a temperatura ótima para replicação viral varia entre os 35°C e 36°C (Fontbonne, 2011).

Outro fator responsável pela alta suscetibilidade dos neonatos à infeção viral consiste na sua incapacidade de provocar um estado de piroxia e resposta inflamatória, não sendo, portanto, capazes de reduzir de replicação viral (Lee *et al.*, 2014).

Segundo Greene (2012), os cachorros com infeção sistémica apresentam sinais clínicos tais como prostração, depressão, anorexia, perda de peso, dispneia, fezes com coloração amarelo-esverdeado, choro incessante e desconforto à palpação abdominal. Podem-se observar hemorragias petequiais nas mucosas, e as regiões inguinal e abdominal apresentam, por vezes, eritemas papulares ou vesiculares com edema subcutâneo.

O processo de infeção por este vírus é normalmente seguido de trombocitopénia generalizada. O HVC-1 pode ainda ser transportado posteriormente ao longo dos axónios até ao sistema nervoso central, causando meningoencefalite. No entanto, os cachorros geralmente morrem antes de poderem ser observadas manifestações clínicas neurológicas (Carmichael, 2004).

Por norma, o cachorro pode sobreviver 1 a 3 dias, desde a manifestação dos sinais clínicos até à morte, sendo que, com base nos dados descritos anteriormente, sabe-se que o período de maior risco é no período de três semanas antes ou após o parto (Evermann & Kennedy, 2011).

Antes da morte, pode instalar-se um quadro de convulsões, opistótonos e perda de consciência (Greene, 2012). Cegueira, alterações de equilíbrio e ataxia são algumas das manifestações clínicas que poderão persistir em cachorros que sobrevivam. Quando

são infectados pelo HVC-1 somente a partir da terceira semana de vida, caso desenvolvam meningoencefalite poderão desenvolver secundariamente lesões oftalmológicas e neurológicas (Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012).

O facto de a cadela ser portadora de herpesvírus é um fator importante na progressão da infeção nos cachorros, uma vez que a transmissão do vírus à ninhada por outros animais do canil por via oronasal durante este “período crítico” terá consequências muito mais graves do que em casos de transmissão do vírus pela progenitora seropositiva, dado que neste último caso a ninhada está protegida pelos anticorpos da progenitora (Rootwelt *et al.*, 2011).

1.1.3.2 Jovens e adultos

Cachorros com mais de 3 ou 4 semanas e cães adultos, quando infectados, geralmente não demonstram qualquer sintomatologia ou apenas desenvolvem sinais respiratórios ou oculares ligeiros (Everman *et al.*, 2011). No entanto, estão documentados casos em que a infeção sistémica poderá ocorrer também em adultos com manifestações clínicas semelhantes à infeção sistémica neonatal (Gadsden *et al.*, 2012).

1.1.3.2.1 Sinais clínicos respiratórios

Embora o papel do HVC-1 ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que este é um dos vírus presentes no complexo de doenças respiratória infecciosas. Vários autores descrevem uma relação entre o HVC-1 e a traqueobronquite canina. Sabe-se que o vírus da parainfluenza canina e a *Bordetella bronchiseptica* são agentes infecciosos frequentemente envolvidos no desenvolvimento desta patologia respiratória, no entanto ainda não foi clarificado o papel do HVC-1 na traqueobronquite infecciosa canina (Evermann & Kennedy, 2011; Fontbonne, 2011).

Segundo Reagan and Sykes (2020), este vírus infeta as células epiteliais da mucosa respiratória superior e o período de incubação é de 6 a 10 dias.

Além das infeções sistémicas provocadas pelo HVC-1, estão também descritas infeções respiratórias com manifestações clínicas tais como rinite, broncopneumonia, corrimento nasal, tosse seca, dispneia, ou pirexia podendo tornar-se fatais em casos mais graves (Kumar *et al.*, 2014), principalmente no caso de animais imuno-comprometidos (Evermann *et al.*, 2011; Kawakami *et al.*, 2010).

Segundo Green (2012), o HVC-1 tem sido isolado de pulmões de cães com o vírus da esgana e com conjuntivite aguda. Existem relatos de animais onde se encontrou HVC-1 no trato respiratório acompanhado por rinite necrosante, necrose alveolar multifocal e pneumonia bronco-intersticial (Bunavoglia & Martella, 2007).

1.1.3.2.2 Sinais clínicos oculares

O vírus instala-se em gânglios sensoriais do nervo trigêmio levando a afeções oculares recorrentes devido à infecção e replicação viral. A manifestação ocular mais comum na infecção por HVC-1 é a conjuntivite e pode ocorrer de forma isolada ou associada a outras patologias da pálpebra e córnea (Ledbetter, 2013).

Apesar dos sinais clínicos de conjuntivite serem frequentemente indistinguíveis de outras etiologias, as petéquias conjuntivais são frequentemente relatadas em cães com infecção por HVC-1. Embora não seja específica da infecção por este agente, este achado clínico não é comum na maioria das outras etiologias da conjuntivite e deverá ser considerado sugestivo de infecção por HVC-1 (Evermann *et al.*, 2011).

Sinais clínicos, tais como conjuntivite, blefarite e queratite ulcerativa e não ulcerativa consistem em manifestações comuns de animais adultos infetados (Malone *et al.*, 2010). Além destes sinais mais típicos de conjuntivite, podem também apresentar úlceras e hemorragias petequiais conjuntivais. A inoculação tópica de HVC-1 começa com uma conjuntivite auto-limitante, podendo posteriormente disseminar o vírus pela mesma via (Ledbetter *et al.*, 2009).

Estas lesões podem ser uni ou bilaterais, sendo que, infecções oculares primárias apresentam lesões tipicamente bilaterais enquanto que as lesões recorrentes podem manifestar-se de forma uni ou bilateral (Ledbetter, 2013). A gravidade das manifestações clínicas poderá não ser simétrica entre os olhos. Geralmente, a infecção ocular primária por este agente resolve-se espontaneamente e sem lesões oculares permanentes, no entanto os cães recuperados correm o risco de desenvolver doença ocular recrudescente associada à reativação do vírus latente (Evermann *et al.*, 2011).

É comum neonatos apresentarem panuveíte associada a infecção intraocular, no entanto, as manifestações oculares não são muito valorizadas neste grupo etário, uma vez que a progressão da doença ocorre de forma muito rápida (Ledbetter, 2013).

A idade e o estatuto imunitário do animal são fatores que influenciam as infecções oculares. Lesões subclínicas ou lesões ligeiras auto-limitantes são típicas de cães adultos

imunocompetentes, enquanto que, lesões oculares mais graves e persistentes são geralmente encontradas em cães imunodeprimidos ou em neonatos (Ledbetter, 2013).

Os animais afetados para além da conjuntivite, poderão ter também alguns sinais típicos de desconforto ocular tais como blefarospasmo, fotofobia, protusão da membrana nictitante e prurido (Ledbetter, 2013).

1.1.3.2.3 Sinais clínicos genitais

Hemorragias submucosas ou petéquias, hiperplasia linfoide folicular, lesões pápulo-vesiculares e hiperémia da mucosa são achados frequentemente encontrados a nível genital em fêmeas infetadas (Decaro *et al.*, 2008).

Durante o período de proestro poderão ser observadas lesões vesiculares vaginais na fêmea, que poderão sofrer involução durante o período de anestro (Holst *et al.*, 2012).

Segundo Green (2012), os machos podem ter lesões semelhantes na base do pénis e apresentarem corrimento prepucial. O HVC-1 poderá provocar também balanopostite vesicular e hiperplasia linfoide folicular dos bulbos penianos, ou apenas existir nos tecidos em estado de latência sem qualquer manifestação clínica (Green, 2012).

1.1.3.2.3.1 Infertilidade na cadela

As principais causas de infertilidade na cadela podem classificar-se de acordo com a sua origem como estruturais, fisiológicas, neoplásicas ou infecciosas (Zubair *et al.*, 2014). As doenças infecciosas são provavelmente um dos fatores mais relevantes na infertilidade da cadela, apesar de serem frequentemente sub-diagnosticadas e poderão ser causadas por agentes bacterianos, fúngicos ou virais (Fontbone, 2011).

Estas doenças podem provocar infertilidade através de vários mecanismos: influenciar a motilidade espermática, ação espermicida na vagina, provocar cilioestase ou aumentar a penetração de agentes infecciosos no útero durante o proestro e estro (Fontbone, 2011).

A infeção uterina conduz à infiltração da parede uterina por linfócitos, criando um ambiente hostil tanto para o sémen, interferindo no desenvolvimento do zigoto ou provocando a morte embrionária precoce. Mais tarde, durante a gestação, poderá ocorrer placentite, endometrite ou infeções placentárias, podendo provocar consequentemente

reabsorções fetais. Várias viroses demonstraram ter um papel importante na fertilidade canina, como é o caso do HVC-1. Quando uma cadela gestante é infetada, o vírus propaga-se até ao feto podendo causar aborto, mumificação, nascimentos prematuros e nados-mortos (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Abortos por infeção por HVC-1 geralmente são auto-limitantes após a cadela desenvolver imunidade. É sabido que cadelas com perda fetal ou mortalidade neonatal não têm de afetar as ninhadas seguintes. Apesar de muitos animais adultos já terem sido expostos aos vírus e criado imunidade, é muito importante evitar a exposição de cadelas gestantes sem imunidade, como é o caso de cadelas jovens ou cadelas que não tenham contacto com outros cães (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

A história pregressa da cadela deverá ser recolhida, de modo a tentar identificar a etiologia do problema. É importante recolher não apenas o histórico reprodutivo, mas também o histórico geral incluindo questões sobre o ambiente, contacto com outros animais, profilaxia (vacinações e desparasitações), patologias, medicações e realização de viagens recentes. De grande relevância consta a idade da cadela, a periodicidade dos ciclos, métodos de determinação de ovulação usados no passado, datas de cruzamento/inseminação, gestações prévias, método de diagnóstico de gestação, ocorrência de reabsorções ou abortos, número e tamanho das ninhadas e histórico reprodutivo dos restantes animais da ninhada da fêmea (Grundy *et al.*, 2002). Os mesmos autores recomendam, após esta recolha detalhada de história pregressa, a realização de um exame físico geral e direcionado para o sistema reprodutivo, acompanhado de ecografia abdominal para visualização dos ovários e útero e realização de análises – hemograma, bioquímicas, análise urinária e despiste de *Brucella canis*.

1.1.4 O herpesvírus noutras espécies

Herpesviridae é uma família de vírus que apresenta diversos hospedeiros e encontra-se presente não só no ser humano, mas em várias espécies de mamíferos, aves e répteis, estando descritas atualmente, cerca de 130 espécies diferentes deste vírus (Maclachlan & Dubovi, 2011).

Segundo Griffin *et al.* (2010), a maioria dos Herpesvírus de importância médico-veterinária fazem parte do género *Varicellovirus* da subfamília *Alphaherpesviridae*.

Algumas destas espécies podem ter grande impacto zoonótico, como é o caso do *Herpesvirus simiar* (herpesvírus B), que possui como reservatório natural o macaco

rhesus e que pode ser transmitido ao homem através da saliva, por mordeduras ou ainda por aerossóis através do nariz, faringe e conjuntiva (Hofmann-Sieber *et al.*, 2010). Caso ocorra infecção no homem, recomenda-se fortemente tratamento com fármacos antivirais, uma vez que a taxa de mortalidade poderá chegar aos 80% (Hofmann-Sieber *et al.*, 2010). Alguns estudos descrevem também a possibilidade de infecção de animais por herpesvírus humanos (Milman *et al.*, 2011).

O HVC-1 tem como hospedeiros um grupo restrito de espécies, sendo que apenas é patogénico em animais domésticos e animais selvagens da família Canidae. Esta especificidade para determinadas espécies deve-se à presença de 20 recetores específicos existentes na superfície das células. Conhece-se a existência de proximidade genética deste vírus com o Herpesvírus felino (Greene, 2012), partilhando cerca de 51% do seu genoma (Rota & Maes, 1990), no entanto, até hoje não foi descrita nenhuma infecção do HVC-1 em gatos (Appel, 1987). Um estudo realizado por Evermann *et al.*, (1982), sugere uma reação antigénica unidirecional entre o herpesvírus felino tipo 1 (HVF-1) e o HVC-1, uma vez que se observou uma sero-neutralização consistente e baixa do HVC-1 pelo soro hiper-imune anti HVF-1, no entanto, a mesma sero-neutralização não ocorreu aquando da utilização do soro hiper-imune anti-HVC contra o HVF-1.

Segundo Griffin (2010), os herpesvírus são altamente específicos da espécie, o que explica o facto de o cão não ficar naturalmente infetado com as estirpes humanas e o agente canino não infetar humanos.

1.1.5 Diagnóstico

O HVC-1 pode ser fortemente suspeito através da combinação da história clínica, sinais clínicos e evolução da infecção. No período neonatal é importante ter em consideração o quadro de diagnósticos diferenciais, contemplando patologias causadas por agentes infecciosos para além do HVC-1 tais como: *Brucella canis*, *Mycoplasma spp.*, parvovírus canino, entre outros; e patologias não infecciosas, tais como: malformações congénitas, intoxicações ou traumas. O diagnóstico definitivo é realizado através de achados de necropsia e pela deteção de DNA viral nos órgãos (Rootwelt *et al.*, 2011).

A história pregressa do animal é importante na suspeita da ocorrência de infecção pelo HVC-1. As alterações em exames laboratoriais como hemograma e bioquímicas são inespecíficas, no entanto está descrito observarem-se frequentemente alterações tais como

trombocitopenia e aumento da alanina aminotransferase (ALT) em neonatos infectados (Green, 2012).

1.1.5.1 Isolamento viral

O teste de triagem para o diagnóstico de HVC-1 consiste no isolamento viral, principalmente a partir dos rins, baço, pulmões, linfonodos, glândula adrenal e fígado de cachorros que morreram por infecção sistêmica. Além disso, é possível obter o crescimento viral em cultura de linhas celulares imortalizadas obtidas originalmente a partir de rim canino, designadas de células de rim canino Madin-Darby (MDCK, do inglês “Madin Darby canine kidney cells”) uma vez que em caso de infecção, podem ser observadas nestas células efeitos citopáticos e citolíticos (Lara *et al.*, 2016).

Um dos aspectos negativos deste teste passa pelas necessidades exigentes de condições do meio de cultura e armazenamento de amostra. As amostras para cultura deverão ser frescas ou congeladas, uma vez que a deterioração dos tecidos no período *post-mortem* dificulta a detecção viral. É importante ter em consideração, no caso de recolha de material através de zaragatoas, o local de recolha das amostras coincidir com o local de excreção viral, isto é, no caso de o animal apresentar sintomas respiratórios, deverá colher-se material da mucosa nasal, caso apresente sintomas de patologia genital, a amostra deverá então ser colhida na mucosa genital (Fontbonne, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

No entanto, este método de diagnóstico apresenta frequentemente resultados falsos negativos, visto em diversas situações não conseguir detetar o vírus, como por exemplo, caso a excreção seja baixa, de forma intermitente ou quando ocorra degradação de partículas virais (Reagan & Sykes, 2020). Para além do anterior, o isolamento viral não tem a capacidade de detetar o vírus no seu estado latente (Burr *et al.*, 1996). Assim, após o período de infecção aguda, este teste apenas seria fiável caso fosse realizado num período de 2 a 3 semanas após a infecção. Assim, só se justifica realizar esta técnica quando existem sinais clínicos ativos a nível respiratório e/ou reprodutivo. A confirmação do isolamento viral em cultura de células pode ser efetuada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês “Polimerase Chain Reaction”), microscopia eletrónica ou imunofluorescência (Green, 2012).

1.1.5.2 Serologia

Os dois testes serológicos mais utilizados são o teste de sero-neutralização viral e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”). Este último, devido à sua facilidade de realização, alta especificidade e sensibilidade é o teste mais utilizado (Ronsse *et al.*, 2002).

Os títulos de anticorpos detetados em animais previamente expostos podem ser muito variáveis e o limiar de reatividade (*cut-off*) pode variar conforme os diferentes testes serológicos. No entanto, segundo Morresey (2004), devido ao facto do HVC-1 ser pouco imunogénico, um título superior a 1:2 associado a sinais clínicos pode ser considerado sugestivo de diagnóstico clínico. O título de anticorpos aumenta após a infeção e pode permanecer elevado durante 1 a 2 meses. Após este período, o nível começa a diminuir, no entanto ainda é possível detetar anticorpos num período até 2 anos (Greco & Davidson, 2017).

Os cães seropositivos assintomáticos são animais que já foram expostos ao vírus e que, apesar de não terem uma infeção ativa, tornam-se portadores. Tendo em conta a latência do vírus e o facto do período de duração dos anticorpos circulantes ser curto, há que considerar a possibilidade de ocorrência de resultados falsos negativos, sendo que animais seronegativos não significa forçosamente que não possuam o vírus (Greene, 2012; Ronsse, 2005).

Tendo isto em consideração, de forma a obter maior fiabilidade na interpretação dos resultados exige-se a realização de análises seriadas em cada animal. Este método de diagnóstico não é normalmente utilizado em neonatos com menos de 3 semanas, devido ao curto espaço de tempo entre a exposição ao vírus e à manifestação dos sinais clínicos (Fontbonne, 2011).

A utilização deste teste é limitada, uma vez que os anticorpos que se desenvolvem em resposta à vacinação não ser distinguidos dos produzidos, devido a infeção ou a infeção subclínica (Reagan & Sykes, 2020).

Para além do teste ELISA e teste da sero-neutralização, para deteção de anticorpos contra o HVC-1 poderão ser também utilizadas a imunofluorescência direta (Sonne, 2009) e indireta (Góngora *et al.*, 2007), o teste da imunoperoxidase em monocamada (IPMA, do inglês “imunoperoxidase monolayer assay”) (Krogenæs *et al.*, 2012; Krogenæs *et al.*, 2014), a inibição da hemaglutinação (Nemoto *et al.*, 1990) e seroneutralização viral com e sem adição de complemento (Ronsse *et al.*, 2002). No

entanto, os anteriores não são testes padronizados e têm sido observadas discrepâncias entre resultados de testes realizados em diferentes laboratórios (Green, 2012).

1.1.5.3 Diagnóstico molecular por PCR

Segundo Everman *et al.* (2011) a técnica de reação em cadeia de polimerase é a mais sensível quando comparada com outros testes diagnósticos e evidencia a natureza e a extensão do vírus latente. Decaro *et al.* (2010) verificaram o sucesso da utilização da técnica PCR para identificar o HVC-1 em vários tecidos de cães adultos que não tinham tido exposição evidente ao HVC-1, nem sinais clínicos causados pelo mesmo. Esta consiste numa técnica que permite a multiplicação em milhões de cópias do genoma de qualquer organismo (Decaro *et al.*, 2010). Consiste, por esta razão, numa ferramenta útil para confirmar o diagnóstico, e representa um ótimo método na avaliação da eficácia de vacinas e fármacos antivirais (Decaro *et al.*, 2010).

A colheita de amostras para realização de PCR consiste na recolha de secreções de fêmeas suspeitas através de zaragatoas oculares, nasais ou vaginais (Kawakami *et al.*, 2019). Tal como acontece com a testagem por isolamento viral, a localização da recolha da amostra é um fator importante, uma vez que poderão ocorrer falsos negativos, caso a amostra não seja recolhida de um local onde o vírus esteja presente ou caso existam poucas cópias do genoma viral (Burr *et al.*, 1996). A ausência de lesões e reduzida excreção viral durante a fase de latência poderão criar resultados falsos negativos (Greco & Davidson, 2017).

Dado isto, é importante tentar perceber se o momento da realização do teste irá influenciar o seu resultado. Devemos ter então em conta que, animais com serologia negativa não é indicador direto de ausência de contacto com o vírus ou que não o contenham em latência nos seus tecidos. O título de anticorpos poderá ser positivo ou negativo, e caso seja positivo, poderá apresentar títulos altos ou baixos desta titulação (Andre-Fontaine, 2015).

Para além destes fatores, a existência de vários testes serológicos não estandardizados, pode ainda resultar numa variação significativa dos resultados e consequentemente afetar as conclusões relativamente à prevalência dos mesmos (Greco & Davidson, 2017).

De todas as técnicas de PCR, a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizada por Decaro *et al.* (2010), com possibilidade de quantificação viral, é, até ao momento, o que apresenta maior sensibilidade.

1.1.5.4 Necrópsia

Segundo Green (2012), na necrópsia podem observar-se sinais de hemorragia e locais de necrose multifocal no parênquima de alguns órgãos como rins, fígado, baço, pulmões e glândulas adrenais. As cavidades abdominal e torácica poderão apresentar fluido sero-sanguinolento. Os intestinos e omento poderão demonstrar hemorragias petequiais ao nível das serosas e poderá observar-se uma esplenomegalia generalizada devido à hiperplasia do sistema mononuclear fagocitário. Os pulmões poderão encontrar-se hiperémicos, firmes e edemaciados, com hemorragias focais e com lesões histológicas compatíveis com broncopneumonia intersticial (Green, 2012; Kumar *et al.*, 2014).

Histologicamente, as lesões por HVC-1 são caracterizadas por focos de necrose no parênquima pulmonar, renal e hepático, acompanhadas frequentemente por hemorragias periféricas com infiltração de macrófagos e linfócitos. Um achado importante na necrópsia para diagnóstico de HVC-1 consiste na presença de corpos de inclusão intranucleares eosinofílicos, que se originam devido à rápida destruição e replicação viral (Ronsse *et al.*, 2003; Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012). Segundo Lara *et al.*, (2016) a nível neurológico poderá ocorrer congestão vascular grave, meningoencefalite difusa não supurativa grave, infiltração linfocítica perivascular e a presença de corpos de inclusão intranuclear nos neurónios. Dependendo do estadio da infeção celular e do método de fixação, inclusões basófilas ou acidófilas poderão ser encontradas, no entanto, estas não são tão comuns como em infeções causadas por outros herpesvírus. Quando observadas, estas poderão ser mais facilmente encontradas no epitélio nasal ou renal comparativamente ao pulmão e rim, uma vez que estas últimas consistem em áreas de maior necrose (Green, 2012).

As lesões mucocutâneas vesiculares que por vezes se observam, consistem em acantólise resultante da degenerescência epitelial profunda.

Testes de imunofluorescência em neonatos a partir de criosecções de rins, fígado ou pulmões também poderão ser realizados em cadáveres, para tentar obter a

confirmação do diagnóstico (Parzefall, 2010). A microscopia eletrônica pode também ser usada para evidenciar a presença de partículas virais em tecidos infectados. No entanto, esta técnica é pouco utilizada por se tratar de um processo demorado (Parzefall, 2010).

1.1.6 Tratamento e Prognóstico

Atualmente não existe nenhum tratamento 100% efetivo para o HVC-1.

Está descrita a administração de aciclovir, um fármaco antiviral com atividade inibitória *in vitro* e *in vivo* contra os herpesvírus simplex em humanos (Wiebe, 2015). Em neonatos em que a infecção sistêmica ainda não esteja totalmente instalada, existem relatos de tratamentos eficazes com este fármaco (Green, 2012). A dose recomendada por este autor para cachorros é de 7-10 miligramas (mg) com administração por via oral (PO, da locução latina *per os*) a cada 6 horas até às 3 semanas e meia de vida (Evermann *et al.*, 2011). No entanto, segundo Green (2012), a dose terapêutica em Medicina Veterinária ainda não está estabelecida e requer mais estudos. É importante ter em consideração que este fármaco, devido ao seu efeito tóxico no miocárdio e sistema nervoso central, apresentam algumas consequências negativas a nível cardíaco. Para além disto, encontra-se descrito que doses elevadas de aciclovir apresenta uma panóplia de efeitos secundários que incluem anorexia, alterações gastrointestinais e nefropatias obstrutivas (Rootwelt *et al.*, 2011). Recomenda-se então, a discussão com o tutor sobre a administração deste fármaco e a sua utilização cautelosa (Greco & Davidson, 2017; Krogenæs *et al.*, 2017).

Como alternativa, vários estudos sugerem a administração intraperitoneal de 1-2 mililitros (ml) de soro hiper-imune, um soro rico em anticorpos que pode ser obtido a partir de cadelas que tenham tido recentemente ninhadas infectadas ou cadelas seropositivas para este vírus, tendo demonstrado uma redução da mortalidade em ninhadas infectadas pelo HVC-1. Devido ao curto período de suscetibilidade, apenas é necessária uma única injeção. Este tratamento demonstrou provocar uma redução das perdas em ninhadas expostas ao vírus, mas o seu sucesso está muito dependente da presença em níveis suficientes de anticorpos no soro hiper-imune, bem como da sua administração antes da progressão da doença a nível sistémico (Sykes & Davidson, 2014; Green, 2012).

Um estudo realizado por Mila *et al.* em 2014 sugeriu a suplementação oral de plasma hiper-imune, numa dose de 1,5 ml/100 gramas (g) nas primeiras 4 horas de vida

dos cachorros, seguida por uma segunda administração da mesma quantidade nas 4 horas seguintes. Esta administração seria simultânea à alimentação dos cachorros, de modo a evitar a digestão das imunoglobulinas sanguíneas devido aos inibidores da tripsina presente no colostro. A administração pode ser realizada também por via subcutânea (2-4 ml/100g), no entanto foram relatadas lesões consequentes a esta via de administração (Mila *et al.*, 2017).

A reversão torna-se menos provável nos casos onde exista manifestação de sinais neurológicos. Regra geral, a terapia em cachorros que apresentem sintomas de infecção por HVC-1 é muito limitada e não tem grande relevância no prognóstico (Greene, 2012).

De acordo com Green (2012), um fator que diminui substancialmente a replicação viral consiste no aumento da temperatura da maternidade e tem demonstrado influenciar positivamente o tratamento e diminuir a manifestação dos sinais clínicos.

Segundo Green (2012), em condições experimentais onde, após terem sido expostos ao vírus, aumentaram a temperatura da maternidade, foi observada uma diminuição da gravidade dos sinais clínicos e uma redução da mortalidade. O autor concluiu então que, a manutenção da temperatura corporal dos cachorros a 38° C diminui significativamente a replicação viral.

Para isto, segundo o mesmo autor, deverá manter-se as maternidades a uma temperatura superior a 30° C e com uma percentagem de humidade compreendida entre 45 e 55% (Green, 2012). No entanto, caso a infecção sistémica já esteja instalada, o aumento da temperatura das maternidades não é suficiente para influenciar a recuperação (Green, 2012).

Segundo Evermann *et al.* (2011), testou-se um tratamento com 5-iodo-2-desoxiuridina, um anti-viral, mas que não foi bem sucedido. Num estudo posterior, 2 cachorros com 15 dias de vida foram infetados por HVC-1 e morreram, tendo sido administrada vidarabina quando se identificou o agente, tendo os restantes sobrevivido todos (Greene, 2012).

Por fim, está demonstrada a utilização da lactoferrina, que pode ser administrada oralmente para proteger cachorros clinicamente saudáveis que tenham sido expostos ao vírus ou que haja suspeita da sua exposição. A lactoferrina consiste numa proteína globular multifuncional isolada inicialmente de leite bovino que parece ter um efeito imunomodelador na cavidade oral, uma vez que esta tem capacidade para aumentar a atividade fagocítica das células (Green, 2012). No entanto, A lactoferrina demonstrou, *in*

vitro, atividade antivírica contra o HVC-1 (Tanaka *et al.*, 2003), no entanto, o mesmo não foi conseguido *in vivo* (Evermann *et al.*, 2011).

No caso da existência de manifestações clínicas respiratórias ou genitais, recorre-se ao tratamento sintomático, com recurso a antibióticos no caso do aparecimento de infeções bacterianas concomitantes.

Segundo um estudo realizado em 2016 por Spertus *et al.*, “no caso das infeções oculares para além da utilização de antimicrobianos tópicos para prevenção destas mesmas infeções e de atropina tópica como midriático, foi possível realizar, com sucesso, tratamento antiviral composto por uma solução oftálmica de 0,1% de idoxuridina ou de trifluridina a 1%”. A idoxuridina e a trifluridina são análogos de nucleótidos, são bons antiherpéticos e são bem tolerados pelos cães quando aplicados topicamente como formulações oculares. Ambos os antivirais são administrados 6 a 8 vezes por dia durante as primeiras 48 horas e depois 4 vezes ao dia até à resolução dos sinais clínicos oculares. Como antiviral oftálmico alternativo, poderá administrar-se a solução oftálmica de aciclovir 0,5%, com duas administrações por dia (Evermann *et al.*, 2011).

Para os casos onde existam manifestações clínicas oculares, Evermann *et al.*, (2011) recomenda terapia imunossupressora, incluindo corticosteróides oculares tópicos, ciclosporina ocular tópica, corticosteróides sistémicos e uma variedade de quimioterapias antineoplásicas (por exemplo, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina). No entanto, é de notar que corticoterapia sistémica prolongada poderá causar maior imunossupressão nestes animais.

Caso apresente sinais clínicos genitais, em 2016 foi patenteado um duche vaginal com componente antivírico como é o caso do aciclovir, que não só diminui as manifestações genitais do vírus, como elimina a sua excreção e consequente transmissão (US20160051663 A1, 2016).

O prognóstico é muito variável uma vez que se trata de uma patologia crónica, cuja gravidade dependerá da idade do animal, da evolução da doença, da fase em que o vírus é detetado, do sistema imunitário do animal e da sua resposta ao tratamento.

1.1.7 Profilaxia

O HVC-1 atualmente apresenta seroprevalências elevadas e distribuídas mundialmente, o que torna a sua erradicação, por enquanto, muito difícil (Green, 2012).

Evermann *et al.* (2010), identificaram como fatores de risco: canis de criação; idade; animais que tenham reproduzido ou não; fase do ciclo éstrico; presença de patologia respiratória (tosse do canil); dimensões do canil; gestão de criação (utilização de machos fora da coletividade) e higiene e biossegurança.

1.1.7.1 Gestão da coletividade

De acordo com Rootwelt *et al.* (2011) é importante que os animais do canil se encontrem em boas condições de saúde e que cumpram o plano vacinal em vigor, uma vez que qualquer infecção poderá levar à reativação do vírus, caso este se encontre no seu estado latente.

A higiene do canil consiste num ponto de enorme relevância tanto para o HVC-1 como para todas as doenças de carácter infeccioso.

O HVC-1, dadas as suas características, é facilmente inativado pelos desinfetantes tais como a lixívia ou clorexidina, pelo que a limpeza regular ajudará na diminuição da propagação do vírus (Rootwelt *et al.*, 2011).

É importante ter em consideração que o ser humano, apesar de não contrair o vírus, poderá disseminá-lo através das fómites, pelo que é de grande relevância a desinfecção de todas as pessoas que estão em contacto com os neonatos (Evermann *et al.*, 2011).

Segundo vários autores, o número de animais por canil é um fator com grande importância. Segundo Ronsse *et al.* (2004), uma maior densidade de animais por canil aumenta o risco de infecção por herpesvírus canino e, sempre que possível, esta deve ser reduzida. Para além disto, deverá evitar-se o contacto de animais que apresentem sinais de patologia respiratória, ocular ou genital com neonatos (Green, 2012).

A introdução de novos animais no canil pode desencadear *stress*, contribuir para a reativação do vírus (Ronsse *et al.*, 2004), pelo que se deverá isolar as fêmeas reprodutoras nas semanas imediatamente antes e depois do nascimento dos cachorros (Fontbonne, 2011).

Para os cachorros, o período mais crítico de infecção é a gestação e logo após o parto. Assim, o isolamento das cadelas gestantes e dos neonatos de outros cães é uma medida prática importante. As cadelas deverão ser isoladas durante a gestação (principalmente durante as últimas 3 semanas) e até pelo menos 3 semanas depois do

parto, as cadelas (especialmente as que não foram previamente expostas ao vírus) e os neonatos, devem ser isolados de outros cães para evitar que haja exposição durante este período (Sykes & Davidson, 2014).

Como já foi referido, este vírus estando no seu estado de latência pode ser reativado em situações de *stress*. Como tal, é fundamental evitar que as fêmeas reprodutoras sejam sujeitas a situações de *stress* como é o caso de exposições, viagens longas e mudanças de ambiente. Deverão ser também evitadas gestações em todos os ciclos e oferecer uma alimentação nutritiva e adequada para a fase de gestação, de modo a garantir que as suas necessidades energéticas sejam cumpridas, garantindo deste modo a eficiência do seu sistema imunitário (Green, 2012).

A transmissão através do sémen dos é uma possibilidade, no entanto existem poucos estudos sobre o tema (Torres *et al.*, 2015). Assim, acredita-se que a inseminação artificial consista numa opção mais segura para proteção do macho ou quando se suspeita que este possa ser portador (Green, 2012).

De acordo com Fontbonne (2011), a realização de cesarianas eletivas como medida preventiva é desnecessária, uma vez que esta apenas previne a contaminação através do canal de parto, mas não impede a transmissão transplacentária, nem a oronasal após o nascimento.

Em 2016, Sanjay Kapil patenteou uma manga vaginal que impede os cachorros de contrair HVC-1 por contacto com a parede vaginal da mãe durante o parto. A manga é inserida na vagina da fêmea gestante, antes do parto, e ao atravessarem o canal de parto, através da manga, evitando assim o contato direto com o tecido vaginal de modo a evitarem a infeção (US20160051663 A1, 2016).

De acordo com Green (2012), uma vez que a maioria dos cães já foi exposto ao vírus, não se justifica a realização de exames a todos os cães do canil para determinar o seu estatuto serológico. No entanto, a realização de exames na altura do cruzamento ou durante a gestação apresenta mais relevância, uma vez que o estatuto serológico pode mudar a qualquer altura, isto é, os animais testados negativos poderão passar a ser positivos (Green, 2012).

Pensa-se que expor cadelas jovens a cães mais velhos (que muito provavelmente já foram expostos ao vírus) antes da primeira gestação, poderá dar oportunidade a que desenvolvam anticorpos protetores de HVC-1 e consequentemente transmiti-los aos seus descendentes (Greco & Davidson, 2017). Esta primeira exposição deverá ser realizada

sempre, antes da primeira gestação e nunca durante o cruzamento, gestação ou amamentação (Green, 2012).

1.1.7.2 Imunidade passiva

Durante a gestação, apenas uma pequena parte dos anticorpos são transferidos para o feto, sendo 90% dos anticorpos obtidos através do colostro da mãe. Pensa-se que isso se deva ao facto da placenta destes animais ser endoteliocorial zonal. Segundo Stoffel & Hartmann (2000), a transferência materno-fetal de imunoglobulina G (IgG) durante o último trimestre de gestação ocorre através de uma subpopulação de vasos sanguíneos maternos provenientes apenas da zona labiríntica da placenta, não tendo sido demonstrado nenhum transporte transplacentário a partir de outras regiões placentárias. Assim, o colostro, nas primeiras horas de vida, é essencial para a proteção contra as infeções, conferindo quantidades adequadas de imunoglobulinas nas primeiras 8 horas após o nascimento (Carmichael, 2004). É importante assegurar que todos os cachorros da ninhada ingiram o colostro, uma vez que até às 24 horas de vida, as células intestinais dos neonatos são substituídas por células mais maduras e o espaço intercelular diminui, o que impede a absorção das imunoglobulinas colostrais (Barreto & Prestes, 2014), sendo importante ter em conta que esta ingestão deverá ocorrer nas primeiras horas dado que o pico de absorção destas imunoglobulinas ocorre nas primeiras 12 horas de vida (Capuzzi, 2010).

Pensa-se que a imunidade adquirida pela mãe possa ser uma importante condição para a sobrevivência dos cachorros infetados. Segundo Green (2012), os neonatos que ingerem o colostro de mães seropositivas geralmente mantêm-se assintomáticos após o contacto com o vírus, enquanto os neonatos que ingerem colostro de mães seronegativas desenvolvem mais frequentemente uma infeção com maior gravidade caso contactem com o vírus, tal como já foi referido anteriormente. Este facto ocorre porque as cadelas, previamente infetadas por HVC-1, têm anticorpos específicos que conferem alguma imunidade aos cachorros, durante as duas primeiras semanas (Carmichael, 2004; Morresey, 2004).

1.1.7.3 Vacinação

Segundo vários autores, o melhor método profilático para neonatos é através da imunização passiva com colostro, após imunização ativa das fêmeas. Está contraindicado,

pela possibilidade de o vírus ficar latente nos tecidos, da utilização de vacinas vivas, mesmo atenuadas (Green, 2012). Uma vez que a vacina se trata de uma vacina de subunidade, esta não terá interferência com o teste PCR ou com o teste por isolamento viral (Green, 2012).

A vacina inativada contra o HVC-1 está atualmente licenciada na Europa (*Eurican Herpes 205®*, Merial, França). Esta vacina deverá ser administrada por via subcutânea, a cadelas reprodutoras antes do parto, de modo a assegurar um nível de anticorpos mínimo na altura do parto. É aconselhada a administração da primeira dose no período do estro ou 7 a 10 dias após o cruzamento e a segunda dose cerca de 6 a 7 semanas após a primeira, coincidindo com o período 2 semanas antes do parto (Rootwelt *et al.*, 2011). Segundo Green (2012), esta vacina demonstrou uma eficácia alta. Quando testados por PCR, neonatos que nasceram destas cadelas vacinadas, quando expostos ao vírus por via oronasal com 3 dias de idade, 100% estavam protegidos das manifestações clínicas e 93,5% não demonstraram infeção viral. Em contraste, 81% dos cachorros do grupo de controlo morreram quando infetados com HVC-1 entre o 6º e 14º dia de vida.

É aconselhado repetir a vacinação a cada gestação, uma vez que esta não demonstra uma proteção a longo prazo. No entanto, esta vacina não consta no plano de vacinação, uma vez que é apenas administrada na altura da concepção e parto, tendo por base estas datas. Só assim é possível proteger os cachorros neonatos durante as 2 a 3 primeiras semanas de vida (Rootwelt *et al.*, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Dada a baixa prevalência de manifestações clínicas e pouca gravidade de sinais clínicos em animais adultos, a vacina torna-se justificável maioritariamente em canis problemáticos, isto é, canis com condições de higiene fracas, com grandes densidades populacionais ou elevada percentagem de animais com doenças infecciosas (Green, 2012).

1.2 Aspetos da fisiologia ovárica e uterina da cadela

A identificação correta das alterações ovulatórias consiste num dos fatores mais importantes para conseguir determinar-se com precisão o estado reprodutivo fisiológico das cadelas, tornando a fisiologia reprodutiva um enorme desafio para o manejo reprodutivo (Groppetti *et al.*, 2015).

A observação de sinais clínicos, a citologia vaginal, a vaginoscopia, doseamento hormonal e a ecografia abdominal, são alguns dos métodos utilizados para monitorizar as

alterações nas estruturas do trato reprodutivo relacionadas com o período peri-ovulatório. (Moxon *et al.*, 2012; Levy, 2016).

Tendo em conta as variações fisiológicas e características individuais de cada cadela, tais como a duração de cada fase do ciclo, o intervalo inter-éstrico e as diferentes manifestações clínicas, é de enorme importância a realização de interpretações cautelosas correlacionando toda a história pregressa e achados clínicos de meios complementares de diagnóstico tais como a citologia vaginal e a medição da progesterona (P4). Esta é a única forma de ser preciso no manejo reprodutivo, uma vez que todas as cadelas demonstram entre elas diferenças nas manifestações clínicas, duração de cada fase do ciclo éstrico e intervalo entreaios (Wilborn & Maxwell, 2012).

1.2.1 Ciclo éstrico

As cadelas são monoéstricas, tipicamente não-sazonais e ovulam de forma espontânea (Concannon, 2011).

Apresentam intervalos de interestro de 5-12 meses e o estro pubertal ocorre entre os 6-14 meses na maioria das raças. Sabe-se que o estro pubertal está correlacionado positivamente com o tamanho da raça, isto é, quanto maior o tamanho da raça mais tarde será o mesmo. O ciclo éstrico da cadela está dividido em quatro fases: o proestro com duração de 5 a 20 dias; o estro com duração de 5 a 15 dias; o diestro com duração de 50 a 80 dias; e o anestro que dura geralmente 80 a 240 dias (Evans & Cole, 1931).

Segundo Schaefer-Okkens (2005), também se pode realizar uma classificação dividida em: fase folicular (proestro), fase pré-ovulatória e ovulatória (estro), fase lútea (diestro) e anestro. No entanto, há autores que consideram a fase folicular como a fase correspondente ao proestro e estro (Concannon, 2011). Para esta dissertação, consideremos os estudos mais recentes que consideram a fase folicular como correspondente à fase de proestro e estro.

O ambiente endometrial está sob o controlo de hormonas sexuais durante o ciclo reprodutivo. Para além disto, estas hormonas estão também envolvidas no influxo e localização de células imunitárias no endométrio (Chotimanukul & Sirivaidyapong, 2011).

O estrogénio tem efeitos pró-inflamatórios no útero e tem sido associado a um influxo de leucócitos na fase de estro. Por outro lado, a progesterona tem sido associada à atividade anti-inflamatória e suprime a resposta imune tornando o útero mais suscetível

à infecção bacteriana. Em humanos, roedores e bovinos, a progesterona suprime a função imunitária e uterina ao diminuir a capacidade proliferativa dos linfócitos (Chotimanukul & Sirivaidyapong, 2011).

Outro estudo, conduzido por Watts e colaboradores em 1996, demonstrou que bactérias são frequentemente encontradas no interior do útero de cadelas durante o proestro e estro e raramente são encontradas nas restantes fases. Este aumento de bactérias na fase folicular poderá dever-se a maior facilidade de acesso das bactérias ao útero e da existência de condições mais propícias para o crescimento bacteriano.

O aumento das concentrações de prostaglandina E2 (PGE2) no lúmen uterino podem contribuir para a diminuição da imunidade celular durante o diestro (Silva *et al.*, 2009). Sabe-se que esta prostaglandina, cujas concentrações aumentam após estimulação pelas endotoxinas (Helliwell *et al.*, 2004), tem efeitos imunossupressivos, os quais foram observados em linfócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos (Rocca & FitzGerald, 2002).

1.2.1.1 Proestro

A fase do proestro tem uma duração média de 9 dias e ocorre quando começam a ser observados sinais externos devido à influência de estrogénios (Feldman & Nelson, 2004a). Estes sinais podem manifestar-se como corrimento sero-sanguinolento vulvar; aumento progressivo de tamanho e turgor vulvar; proliferação do epitélio vaginal, cornificação e edema; presença de células epiteliais nas citologias vaginais; e secreção vaginal de feromonas atrativas para machos (Davidson & Feldman, 2004).

O perfil das células epiteliais vaginais altera-se ao longo do ciclo, desde células parabasais (acompanhadas eventualmente pela presença de neutrófilos) até serem dominadas sucessivamente por pequenas células intermédias; grandes intermédias; grandes células cornificadas até finalmente serem inteiramente cornificadas e haver ausência visual de neutrófilos por estes não serem capazes de atravessar o epitélio espessado (Johnston, Kustritz & Olson, 2001). O pico de cornificação celular varia entre 1 a 6 dias antes do pico de hormona luteinizante (LH, do inglês “luteinizing hormone”). É observado nesta fase uma quantidade variável de eritrócitos intactos e lisados que se devem à diapedese no útero. No entanto, não nos devemos guiar pelas alterações na quantidade e aparência destes eritrócitos, uma vez que variam entre animais (Concannon, 2011).

Vaginoscopicamente, a mucosa aparece edematosa, mudando progressivamente de uma coloração rosada para pálida, com presença de fluido sero-sanguinolento na superfície e no aprofundamento das pregas vaginais que se tornam mais proeminentes em ambos os eixos, criando a aparência de paralelepípedos (Concannon, 2011).

A nível comportamental, ocorre um declínio progressivo na resposta agressiva ao interesse de machos. A refusa às tentativas de monta alteram progressivamente desde agressiva, a ambivalente, a “brincalhona”, até passivamente se deitarem receptivamente (Concannon, 2011).

Segundo Pérez-Rivero e colaboradores (2009), foi identificado metil p-hidroxibenzoato (metilparabeno) nas secreções vaginais de cadelas em estro como um atraente sexual, que juntamente com as feromonas é responsável pela atração do macho.

Na cadela, durante esta fase, podem ser observados 3 tipos de reflexos sexuais: resposta da pele dorsal da vulva ao toque; a curvatura ipsilateral das pernas traseiras em resposta ao toque junto à região vulvar; e o desvio vertical ou contralateral da cauda em resposta ao toque junto à região vulvar. Estes reflexos sexuais estão ausentes durante o anestro, aumentam durante o proestro e atingem o seu pico no início do estro (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Endocrinologicamente, o proestro consiste na fase do ciclo estrico em que as concentrações séricas de estradiol aumentam para níveis que resultam nos sinais clínicos do proestro anteriormente mencionados (Johnston, Kustritz & Olson, 2001). Segundo Concannon (2011), o estradiol sérico aumenta de 5 a 15 picogramas (pg)/ml inicialmente, até atingir picos de comportamento recetivo ocorrendo tipicamente 0,5 a 3 dias após o pico de estradiol e um dia antes do pico pré-ovulatório de LH. O proestro fisiológico termina com o pico pré-ovulatório de LH.

Após este aumento, as concentrações de estradiol sérico diminuem antes da cadela se tornar recetiva ao acasalamento, marcando o início do estro. As concentrações de progesterona encontram-se em níveis basais (<1 a 2 nanogramas (ng)/ml) até ao proestro tardio, momento em que as concentrações de progesterona começam a aumentar, devido ao início da luteinização pré-ovulatória folicular (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

As concentrações séricas de testosterona aumentam durante o proestro tardio, atingindo concentrações de 0,3 a 1,0 ng/ml no momento do pico de LH, níveis que são semelhantes aos valores encontrados em cães machos inteiros. As concentrações séricas

de LH permanecem perto dos níveis basais durante a maior parte do proestro (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

A foliculostatina (inibina), hormona que é produzida pelos folículos ovários em desenvolvimento e que, devido ao seu mecanismo de retro-controlo negativo, suprime a hormona folículo-estimulante (FSH, do inglês follicle-stimulating hormone) provocando a sua diminuição (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

A prolactina poderá ter influência sobre o início do anestro e início do proestro, embora as concentrações sejam variáveis durante todo o proestro. A supressão da prolactina, através do uso de uma molécula dopaminérgica (por exemplo, a bromocriptina) durante o anestro precoce, poderá resultar num proestro precoce, visto este ser marcado por uma diminuição da prolactina (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

1.2.1.2 Estro

O comportamento de estro é caracterizado por uma recetividade proativa, onde a fêmea aumenta a procura de machos até aceitar ser montada e o seu início é marcado pelo pico de LH. Esta fase tem uma duração média de 9 dias, no entanto é muito variável e depende das características fisiológicas de cada cadela (Feldman and Nelson 2004a; Schaefers-Okkens 2005).

Clinicamente, o estro dura até a anatomia e citologia vaginal não refletirem máxima cornificação, mas sim extensa descamação regional; aparecimento de células não cornificadas; e diminuição do espessamento epitelial com migração de neutrófilos para o lúmen, alterações que ocorrem tipicamente entre os dias 6 a 11 dias após o pico de LH (Concannon, 2011).

É importante salientar que o início do estro citológico nem sempre coincide com o início da recetividade sexual ou com o pico de LH. Citologicamente, define-se o início do estro quando mais de 90% das células epiteliais vaginais são células superficiais (Concannon, 2011).

A vulva permanece aumentada durante o estro, mas geralmente é mais macia do que durante o proestro. Poderá observar-se presença de corrimento vulvar durante esta fase, no entanto em menor quantidade e com uma coloração mais escura (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

O início do estro fisiológico não é distinguido citologicamente, mas anatomicamente é refletido pelo início do enrugamento e crenulação da mucosa vaginal, observado endoscopicamente, que ocorre como resposta à inversão do rácio

estrogénio:progesterona 1 dia após o pico de LH. O máximo enrugamento ocorre entre o dia 4 e 5 de estro (Concannon, 2011).

A duração do pico pré-ovulatório de LH pode variar de 24 a 66 horas. Após o pico de LH, as concentrações de LH diminuem. De modo geral, a ovulação ocorre 36 a 50 horas após a libertação de LH pré-ovulatória e esta pode durar entre 24 a 36 horas. São necessárias 54 a 60 horas para ocorrer a maturação do oócito no oviduto, para este se encontrar fertilizável (Miranda *et al.*, 2018).

O embrião poderá permanecer no oviduto por 9 a 10 dias após a ovulação, entrando no útero quando se encontra em fase de mórula compacta ou fase de jovem blastocisto (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

O momento da ovulação nem sempre coincide com o início do comportamento sexual. Em alguns casos, poderá ocorrer ovulação e, apesar disso, as cadelas não estarem recetivas ao acasalamento (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Endocrinologicamente, a fase de estro na cadela ocorre em resposta à diminuição do estrogénio que normalmente começa logo antes o pico de LH e que continua durante o estro. O início do estro é facilitado sinergicamente pelo aumento rápido da progesterona resultante do pico de LH (Concannon, 2011).

Os valores de estrogénio continuam a descer para valores de 10 a 20 pg/ml. A progesterona sérica rapidamente aumenta para 1 a 3 ng/ml durante o pico pré-ovulatório de LH, e imediatamente (ou após uma pausa de 1 a 3 dias) aumenta chegando a valores de 10 a 25 ng/ml pelo dia 10, do final do estro ou logo após (Concannon, 2011).

O momento exato da ovulação é difícil de determinar, mesmo recorrendo à ecografia, mas pode ser estimado realizando a medição da progesterona ou LH. A medição de LH não é muito utilizada, uma vez que a hora exata do pico de LH é difícil de determinar num cenário clínico dado que pode ocorrer num único dia e esse momento poderá ser facilmente perdido a menos que sejam obtidas amostras diárias seriadas ao longo de vários dias. Assim, a medição da progesterona fornece um método indireto que é útil para prever o momento da ovulação e maturação do oócito (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

1.2.1.3 Diestro

O diestro (designado por metaestro por alguns autores), corresponde à porção pós-estro da fase lútea, e inicia-se quando o comportamento de estro termina (Concannon, 2011).

A citologia vaginal indicativa de início de diestro ocorre quando há diminuição acentuada de células superficiais e aumento de pequenas células intermédias em esfregaços vaginais. É também visível a presença de neutrófilos em pequena quantidade (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Endocrinologicamente, o estrogénio varia entre valores intermédios de 15-30 pg/ml com perfis até certo ponto paralelos ao da progesterona, mais altos a meio da fase lútea e depois diminuem (Concannon, 2011). Em caso de gestação, estes valores aumentam nas últimas semanas (Feldman and Nelson 2004a; Davidson and Feldman 2005).

A progesterona sérica aumenta para picos de 15-80 ng/ml entre o dia 20 e 35 do ciclo e lentamente diminui atingindo valores inferiores a 1 ng/ml a partir do dia 55-90 (média de 70) (Concannon, 2011).

Estas concentrações elevadas de progesterona poderão provocar alterações físicas, que incluem desenvolvimento mamário e eventualmente aumento aparente de largura abdominal (Kustritz, 2007).

O início da lactação está relacionado com a diminuição da progesterona sérica e o aumento da prolactina que ocorre perto do parto ou no final de diestro. Por este motivo, cadelas gestantes geralmente lactam perto do momento do parto e cadelas não gestantes também podem lactar perto do final do diestro (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Concentrações de testosterona sérica declinam durante o diestro na cadela a partir dos níveis presentes no proestro e permanecem baixas (<0,1 ng/ml) durante toda a fase lútea (Concannon, 2011).

O início do anestro é definido pela regressão do aumento mamário, pela reparação histológica do endométrio e pela redução dos níveis de progesterona sérica para níveis persistentemente abaixo de 1 ou 2 ng/ml, o que influencia a prolactina e a hormona de crescimento (GH, do inglês growth hormone) (Feldman and Nelson 2004a; Schaefer-Okkens 2005).

Se o fim do diestro for definido pelo declínio da progesterona para 1 a 2 ng/ml, o período de diestro em gestantes é em média 62 a 64 dias a partir da ovulação, uma vez

que a progesterona cai abruptamente no momento do parto. Em cadelas não gestantes, o diestro pode ser prolongado, uma vez que poderá haver um declínio mais variável nas concentrações de progesterona séricas, podendo o diestro durar 49 a 79 dias desde o momento da ovulação (Concannon, 2011).

Foi demonstrado que os corpos lúteos perdem a sua capacidade de produção de progesterona após 60 a 120 dias da ovulação, no entanto estes poderão ser visíveis nos ovários até ao proestro seguinte. Toda a progesterona durante esta fase do ciclo é produzida pelos corpos lúteos, que são mantidos de forma autónoma no início do diestro, mas dependem da secreção de LH e prolactina produzida pela hipófise na segunda metade do diestro (Kustritz, 2017).

1.2.1.4 Anestro

O anestro canino envolve a ausência de evidência de atividade ovárica, e é considerado ser obrigatório durar, no mínimo 7 semanas, após a progesterona descer para valores abaixo de 1-2 ng/ml, tendo uma duração média de 18-20 semanas. Esta fase é importante para a reparação do endométrio, que será concluída por volta do dia 120 a 130 após o final do diestro (Concannon, 2011).

O índice apoptótico e a percentagem de células epiteliais degeneradas no endométrio é alta durante a fase média lútea, baixa em início de anestro e ausente a partir do dia 120 (Po-yin *et al.*, 2006).

Na citologia vaginal poderão ser observadas células parabasais esparsas em número variável. A vulva demonstra-se pequena sem presença de corrimento (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Os valores de estrogénio são variáveis, mas geralmente encontram-se baixos com valores de 5-10 pg/ml. A progesterona sérica permanece abaixo de 1 ng/ml (Concannon, 2011).

A LH e a FSH nesta fase apresentam pulsos esporádicos, com valores baixos (<1-2 ng/ml) e valores mais elevados (50-400 ng/ml, média 140), respetivamente. (Concannon, 2011). Assim, irá ocorrer libertação de FSH, que é necessária para a foliculogénese, e, conseqüentemente para a libertação de LH, iniciando assim um novo ciclo (Okkens & Kooistra, 2006).

1.2.2 Técnicas para determinação do ciclo éstrico na cadela

1.2.2.1 Citologia vaginal

A citologia vaginal consiste num procedimento rápido, simples, de custo baixo e não invasivo, que permite a identificação da fase do ciclo éstrico em cadelas, permitindo também realizar o diagnóstico de algumas patologias do trato genital, tais como patologias neoplásicas, inflamatórias ou disfunções hormonais (Groppetti *et al.*, 2012).

Esta técnica diagnóstica foi desenvolvida na década de 80, e baseia-se no facto do epitélio vaginal sofrer alterações durante o ciclo éstrico da cadela, à medida que ocorrem alterações nas concentrações de estrogénio (Levy & Fontbonne, 2007).

Esta alteração ocorre uma vez que o epitélio vaginal é um dos vários tecidos-alvo das hormonas ováricas. O aumento dos níveis circulantes de estradiol estimula o crescimento do epitélio vaginal, que chega a ter 20 a 30 camadas celulares de espessura no final do proestro (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

À medida que o número de camadas celulares do epitélio vaginal aumenta, maior é o número de células epiteliais superficiais que se desprendem para os fluidos vaginais, sendo possível monitorizar a progressão do proestro e estro através da percentagem de células superficiais observadas na citologia (Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

Podem ser encontrados vários tipos de células, dependendo da fase do ciclo da cadela: as células parabasais, as células intermédias e as células superficiais, variando a sua distribuição ao longo do ciclo da cadela, tal como descrito acima.

1.2.2.2 Medição da concentração de progesterona

Segundo Alves *et al.* (2002), uma vez que a citologia vaginal apenas permite determinar a impregnação estrogénica dos tecidos, é necessário realizar a medição de LH ou progesterona de modo a determinar o momento do pico de LH e o momento da ovulação. Segundo o mesmo autor, o ideal seria após o início do corrimento sanguinolento, isto é, na fase de proestro, realizar-se um conjunto de citologias seriadas até se obter a citologia que mais corresponda às células de estro, iniciando nesse momento, as medições hormonais. A análise usada mais frequentemente em conjugação com a citologia é a medição da progesterona (Alves *et al.*, 2002).

Ao contrário das outras espécies domésticas, no caso da cadela, as concentrações de progesterona sérica começam a aumentar 2 a 3 dias antes da ovulação (Tabela 4). Valores aumentam rapidamente para mais de 1 ng/ml antes do pico pré-ovulatório de LH

e continuam a aumentar ao longo do estro para atingir picos iniciais de 15 a 90 ng/ml em 15 a 30 dias após o pico de LH (Concannon, 2011).

Na altura da ovulação, a progesterona atinge níveis séricos de 4 a 10 ng/ml. Assim, ao medir-se a concentração de progesterona durante o estro, poderá prever-se o melhor momento para acasalar uma cadela (Kustritz, 2017).

Tabela 4 – Relação entre as concentrações plasmáticas de progesterona e a evolução da fase folicular na cadela (proestro e estro) na cadela. (Adaptado de Kustritz, 2001).

P4 (ng/mL)	Significado
< 1.0	Anestro ou proestro
1.0 – 1.9	Dia anterior ao pico de LH
2.0 – 2.9	Pico de LH (2 dias antes da ovulação)
3.0 – 3.9	1 dia antes da ovulação
4.0 – 10.0	Ovulação
> 10.0	Após a ovulação

1.2.2.3 Ecografia abdominal

A utilidade da ecografia na reprodução de pequenos animais permite a realização de avaliações obstétricas, diagnósticos de patologias urogenitais e visualização de alterações ováricas e alterações uterinas relacionadas com o ciclo reprodutivo da cadela (Davidson & Baker, 2009; Barbosa *et al.*, 2013).

Com a progressão do ciclo éstrico, devido à presença de estrogénios, observa-se um aumento da espessura uterina entre o proestro precoce e o estro, não havendo alterações na espessura uterina nas restantes fases (England & Allen, 1989). De acordo com os resultados de um estudo realizado por Kim *et al.* (2009), após a ovulação que é seguida pela diminuição da concentração de estrogénios, o útero começa a responder ao aumento gradual da progesterona, não demonstrando diferenças nas características uterinas durante o período pós-ovulatório (O'Brien & Barr, 2009).

Durante o anestro, o corpo uterino é liso, sem presença de fluido no lúmen e sem alterações no endométrio. Durante o proestro e estro, o útero sofre espessamento devido à influência dos estrogénios, com presença de fluido no seu lúmen. No diestro, o útero é

espesso com desenvolvimento endometrial glandular devido à influência da progesterona (Davidson A., 2009).

Segundo Levy & Fontbonne (2007), pode ser observada presença de líquido ao redor dos ovários que, segundo os autores, foi atribuída como acumulação de fluido folicular na bolsa ovárica após rutura folicular e ovulação. O espessamento das paredes das estruturas ováricas ocorre devido à luteinização pré-ovulatória de folículos e à formação inicial do corpo lúteo, distinguidas ecograficamente pela sua dimensão, onde estruturas com paredes com espessura de 1 milímetro (mm) são consideradas folículos pré-ovulatórios e aqueles maiores que 1 mm são considerados corpos lúteos (Levy & Fontbonne, 2007; England *et al.*, 2009).

Devido à presença de fluido no interior dos corpos lúteos, sobretudo durante os estádios iniciais de desenvolvimento, poderá ser difícil distinguir ecograficamente essas estruturas, de folículos pré-ovulatórios ou de um corpo hemorrágico, sendo necessário perceber em que fase do ciclo a cadela se encontra, uma vez os corpos lúteos só estão presentes no diestro (Groppetti *et al.*, 2015; Hollindhead & Hanlon, 2019).

A aparência dos ovários varia dependendo da fase do ciclo éstrico. Durante o anestro, os ovários aparentam ser pequenos, desde uma forma oval a forma de feijão, com ecogenicidade homogênea, semelhante ao córtex renal. O córtex e a medula não são usualmente diferenciados na cadela e na gata. Múltiplas estruturas quísticas anecóicas ou hipoecóicas podem ser visualizadas no parênquima, durante a foliculogênese; estruturas de tipo quístico com paredes mais espessadas estão presentes na fase lútea (Davidson A., 2009).

Durante o proestro, várias estruturas foliculares quísticas anecóicas podem ser identificadas, podendo ter até 1 centímetro (cm) de diâmetro. A superfície do ovário pode tornar-se irregular. Na altura da ovulação, os folículos preenchidos com fluido anecóico tornam-se isoecóicos a hiperecóicos por se tornarem corpos hemorrágicos, progredindo, após vários dias, para corpos lúteos hipoecóicos. Durante o diestro, os ovários ficam com uma aparência lobular, com corpos lúteos que aparecem como estruturas hipoecóicas de vários tamanhos (Davidson A., 2009).

2. Material e métodos

2.1 Objetivos

Tendo em consideração os estudos de seroprevalência de HVC-1 em cadelas realizados em Portugal (Dias, 2018; Costa *et al.*, 2014), o conhecimento de que a fase do ciclo éstrico poderá ter influência na excreção viral e a escassez de estudos que correlacionem a infeção por este agente com a fase do ciclo éstrico, o presente trabalho teve como objetivo principal a deteção por PCR em tempo real, de HVC-1 em cadelas e a correlação da presença do agente com as várias fases do ciclo éstrico. Foi, ainda, um objetivo secundário, a caracterização epidemiológica, das condições de manejo e de saúde dos animais, no sentido de tentar identificar situações que possam favorecer a transmissão e disseminação do vírus.

2.2 Descrição da amostra em estudo

Neste estudo foram incluídas 60 cadelas adultas, todas em idade reprodutiva, atendidas no Centro de Reprodução Veterinário Anicura Atlântico, no período compreendido entre Setembro de 2021 e Abril de 2022.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona.

Foram incluídas neste estudo cadelas inteiras, após terem o primeiro cio, que se apresentaram à consulta de reprodução no CRVA. Foram excluídas cadelas cuja história reprodutiva era desconhecida.

Os tutores de cada animal incluído no estudo, preencheram um questionário reprodutivo, baseado no de Dahlbom e colaboradores (2009), onde constavam perguntas sobre a data de nascimento do animal, o motivo da consulta, a condição corporal, o número de partos precedentes e respetivas datas, a presença de episódios de distócia, o número de partos naturais e cesarianas eletivas ou de urgência, a realização de vacinação contra o herpesvírus, o tipo de inseminação, a presença de histórico de infertilidade (que incluiu como motivos o aborto, fêmeas “vazias” após cruzamento, ocorrência de nados-mortos, ocorrência de reabsorções e ocorrência de mortalidade neonatal), presença de patologia genital, histórico de patologias gerais, tratamentos farmacológicos realizados nos últimos 3 meses, realização de tratamento anticoncepcional por pílula e intervalo inter-éstrico. Foi, ainda, questionado se o tutor era criador inscrito no Instituto da Conservação

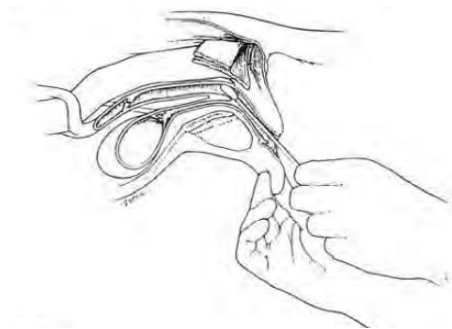
da Natureza e das Florestas (ICNF) e, em caso afirmativo, foi perguntado se realizava regularmente o rastreio de agentes infecciosos à cadela em estudo e ao macho com quem a tinha cruzado, pedindo para especificar quais os agentes testados. Este questionário encontra-se em detalhe no Anexo A.

2.3 Recolha de amostras

A cada cadela foram realizadas três zaragatoas vaginais, duas para posterior pesquisa de DNA de HVC-1 e uma para avaliação citológica. Em alguns animais foi também feita a recolha de sangue total para um tubo com heparina de lítio, para quantificação da progesterona e para um tubo seco, para obtenção de soro e, posterior deteção serológica de anticorpos anti-herpevírus canino. Contudo, devido a um problema técnico, não foi possível obter as amostras de soro e realizar a análise serológica.

Na recolha de material para posterior pesquisa de DNA, foram utilizadas duas zaragatoas estéreis e dois microtubos, também previamente esterilizados, tendo sido utilizado o procedimento a seguir descrito e demonstrado na Figura 1:

- ✓ Separaram-se cuidadosamente os lábios vulvares e com uma zaragatoa vaginal com ponta de algodão estéril e humedecida com soro estéril (lactato de ringuer), introduziu-se na região dorsal da vulva num ângulo de aproximadamente 45°;
- ✓ Evitou-se a fossa clitoriana e avançou-se com a zaragatoa no sentido crânio-dorsal em direção à coluna vertebral;
- ✓ Rodou-se cuidadosamente a zaragatoa e retirou-se;
- ✓ Inseriu-se a zaragatoa num microtubo estéril, cortou-se a haste de forma a que a zaragatoa permanecesse dentro do microtubo e que permitisse o seu encerramento;
- ✓ Repetiu-se o mesmo procedimento para a segunda zaragatoa;
- ✓ Os microtubos foram identificados com as letras “A” e “B” acompanhadas do número de identificação do animal;



- ✓ As amostras foram congeladas, num período máximo de 24 horas após a colheita, a uma temperatura de -80 °.

Figura 1 - Imagem representativa da técnica de colheita de material para realização de citologia vaginal (Adaptado de Johnston, Kustritz & Olson, 2001).

2.4 Avaliação citológica

Todos os procedimentos associados à avaliação citológica da fase do ciclo éstrico foram realizados no Centro de Reprodução Veterinário Anicura Atlântico.

Para avaliação citológica da fase do ciclo éstrico o processo de colheita da zaragatoa foi igual ao acima descrito. Contudo, após a colheita rodou-se a zaragatoa em duas laminas de vidro e deixou-se o conteúdo secar à temperatura ambiente.

As duas lâminas preparadas a partir da zaragatoa vaginal foram submetidas a duas técnicas de coloração: a primeira lâmina foi corada com *Diff-quick* e a segunda com corante *Harris Shorr*, de modo a confirmar o resultado.

O procedimento para a coloração *Diff-Quick* (Panótico Rápido kit[®]), encontra-se descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Protocolo de coloração *Diff-Quick* (Panótico Rápido kit®).

Ordenação de passagens	Solução	Duração
1	Metanol	5 passagens
2	Solução 1: Eosina Y	5 passagens
3	Solução 2: Coloração de tiazina	5 passagens

Para a realização da coloração *Harris Shorr* (kit Diag-Oestro®), foi realizado o protocolo descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Protocolo de coloração *Harris Shorr* (kit Diag-oestro®).

Solução	Duração
<i>Solução de lavagem A</i>	5 passagens
<i>Água destilada</i>	5 passagens
<i>Solução estabilizada de hematoxilina</i>	5 passagens
<i>Água destilada</i>	5 passagens
<i>Diferenciador</i>	5 passagens
<i>Água destilada</i>	5 passagens
<i>Solução de lavagem B</i>	5 passagens
<i>Solução de Shorr</i>	10 passagens
<i>Solução de lavagem C</i>	5 passagens

Após coradas e secas, as lâminas foram montadas com uma lamela e Entellan®. A avaliação microscópica das citologias, foi realizada com o auxílio do Dr. Paulo Borges, Médico Veterinário responsável pelo CRVA. A observação realizou-se num microscópio (Leica DM500), com ampliação de 100× e 400×.

No questionário de anamnese foi também incluída uma secção para o Médico Veterinário/ Estagiário de Medicina Veterinária preencher, no momento da colheita para a citologia, onde foi registado o aspeto macroscópico da vulva (normal, edemaciada ou hiperémica) e a presença e aspeto do corrimento vaginal (amarelado, esbranquiçado ou avermelhado). Este questionário encontra-se detalhado no Apêndice A.

2.5 Quantificação da progesterona

Em alguns casos foi possível realizar a quantificação da progesterona, através da utilização de um imuno-analisador multiparamétrico (MINIVIDAS® Biomérieux) e do kit VIDAS® Progesterone (PRG). Esta técnica é um imunoensaio fluorescente ligado a uma enzima (ELFA, do inglês “enzyme-linked fluorescence assay”), sendo uma técnica quantitativa e automatizada para determinação da concentração de progesterona no soro ou plasma humano, que atualmente é utilizado também em Medicina Veterinária. Foi realizado o procedimento a seguir descrito:

- 1 – Colheram-se 2 ml de sangue para um tubo de heparina de lítio e procedeu-se à sua centrifugação;
- 2 – Retirou-se do frigorífico a barra de reagente e o receptáculo de fase sólida (SPR, do inglês “solid phase receptacle”) da progesterona e deixou-se à temperatura ambiente durante 10-15 minutos;
- 3 – Introduziu-se o SPR na posição correspondente ao canal onde foi introduzida a barra de reagente;
- 4 – Introduziu-se a barra de reagente numa das secções e num dos canais (canal 1-6). Podem ser colocadas seis barras de reagente em cada uma das secções.
- 5 – Com uma pipeta, colocaram-se 200 microlitros (µl) de soro dentro do primeiro poço da barra de reagente. Encaixou-se a barra e fechou-se a tampa. Introduziu-se o nome do animal na secção e canal correspondente;
- 6 – Registaram-se os resultados.

Através da quantificação da progesterona, citologia vaginal, anamnese e exame físico direccionado ao sistema reprodutivo, foi possível determinar com precisão a fase do ciclo éstrico de cada um dos animais em estudo.

2.6 Deteção molecular de herpesvírus canino

No período compreendido entre Abril e Julho de 2022, procedeu-se à realização da componente laboratorial deste trabalho, que teve lugar no LACH, do Hospital Escolar da FMV-ULusófona.

O procedimento experimental compreendeu a extração de DNA de uma das zaragatoas de cada animal, a avaliação da qualidade do DNA e ausência de inibidores, através da amplificação por PCR de um fragmento do gene beta-actina (β -actina), e a detecção de HVC-1 por PCR em tempo real.

2.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA das zaragatoas vaginais foi realizada com recurso ao kit “Invisorb Spin Universal kit” (Invitex Molecular GmbH), de acordo com as instruções do fabricante:

- ✓ Descongelaram-se os microtubos com as zaragatoas à temperatura ambiente;
- ✓ Adicionaram-se 200 μ l de solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês “phosphate buffered saline”) estéril e agitou-se no vórtex durante 3 minutos;
- ✓ Incubou-se à temperatura ambiente, durante 5 minutos;
- ✓ Fez-se um *short spin*;
- ✓ Adicionaram-se ao microtubo 200 μ l de “Tampão de lise HLT”, 20 μ l de “Carrier RNA” e 20 μ l “Proteinase K”;
- ✓ Misturou-se no vórtex, durante 10 segundos;
- ✓ Incubaram-se os microtubos, em banho de água, a uma temperatura de 65°C, durante 10 minutos, agitando no vórtex a cada 2 minutos;
- ✓ De seguida, incubaram-se os microtubos, em banho de água, a uma temperatura de 95°C, durante 10 minutos, agitando no vórtex a cada 2 minutos;
- ✓ Realizou-se um *short spin*;
- ✓ Com uma pinça desinfetada com lixívia a 10% retirou-se cuidadosamente a zaragatoa do microtubo encostando com pressão a parte de algodão contra a parede do tubo, de modo a retirar o máximo de conteúdo; descartou-se a zaragatoa. Repetiu-se o processo para todas as amostras desinfetando a pinça com lixívia a 10% entre cada um dos tubos;
- ✓ Adicionaram-se 260 μ l de “Binding solution” ao lisado de cada amostra e misturou-se no vórtex, durante 10 segundos;
- ✓ Incubou-se a amostra à temperatura ambiente, durante 5 minutos, e realizou-se um *short spin*;

- ✓ Transferiu-se a amostra para um conjunto coluna de filtração/tubo coletor. Fechou-se a tampa e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 *g*;
- ✓ Descartou-se o tubo coletor com o filtrado e colocou-se a coluna de filtração num novo tubo coletor;
- ✓ Adicionaram-se 600 µl de “Washing buffer HLT” na coluna de filtração e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 *g*;
- ✓ Descartou-se o tubo recetor com o filtrado e colocou-se a coluna de filtração num novo tubo coletor;
- ✓ Adicionaram-se 700 µl de “Washing buffer” na coluna de filtração e centrifugou-se a uma velocidade de 11.000 *g*, durante 1 minuto. Descartou-se o filtrado e colocou-se a coluna de filtração no mesmo tubo coletor;
- ✓ Repetiu-se o passo anterior mais uma vez;
- ✓ Removeu-se o etanol residual através de uma última centrifugação, a velocidade de 11.000 *g*, durante 5 minutos. Descartou-se o tubo coletor com o filtrado;
- ✓ Colocou-se a coluna de filtração num microtubo de 1,5 ml estéril e identificado com o número da amostra e adicionaram-se 100 µl de água, previamente aquecida a 65° C, diretamente na superfície da coluna de filtração;
- ✓ Incubou-se durante 1 minuto, à temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 *g*;
- ✓ Descartou-se a coluna de filtração e fecharam-se os tubos finais. Armazenaram-se os tubos com DNA a -20°C.

2.6.2 Quantificação do DNA isolado

O DNA isolado foi quantificado com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific), que permite uma análise precisa de volumes de amostras entre 0,5 e 2 µl. As amostras que apresentavam absorvância superior a 1 foram diluídas.

2.6.3 Avaliação da qualidade do DNA extraído

A ausência de inibidores nas amostras de DNA foi avaliada por PCR convencional, através da amplificação de um fragmento com 855 pares de bases (pb) do gene da β -actina canino (Maia *et al.*, 2010).

Por cada amostra em teste foi preparada uma mistura reacional com um volume final de 25 μ l, contendo 1 $\times$ “MyTaq Reaction Buffer” (Bioline[®]), que contém 5 mM da mistura de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP’s, do inglês “deoxyribonucleoside triphosphate”) e 15 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 1 unidade (U) de “MyTaq DNA Polimerase” (Bioline[®]); 10 picomoles (pmol) de cada *primer*, 100 ng de DNA genômico e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Em cada reação de PCR realizada, foram preparados e incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. A sequência de *primers* utilizados na amplificação de um fragmento do gene da β -actina encontra-se descrita na Tabela 7.

A reação de PCR foi efetuada num termociclador Rotor Gene-Q series (QIAGEN[®]).

Tabela 7 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação de um fragmento do gene da β -actina (Maia *et al.*, 2010)

Primers	Sequência (5' → 3')
β -ACT – Fw	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA
β -ACT – Rev	CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG

A amplificação do DNA foi realizada através da desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos constituídos por: desnaturação a 94°C durante 20 segundos, ligação dos *primers/annealing* a 60°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos; no fim, foi realizada uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

A visualização dos produtos de amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% massa/volume (m/v). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Borato (90 mM) – EDTA (2mM), pH 8,3 (TBE 1 $\times$), num sistema de eletroforese horizontal Compact multi-Wide (Biometra), de acordo com o procedimento a seguir descrito:

- 1- Num erlenmeyer, pesou-se a quantidade necessária de agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza);
- 2- No mesmo erlenmeyer adicionou-se o tampão TBE 1×;
- 3- Preparou-se o suporte de eletroforese, colocando os pentes que servem de molde aos poços de gel;
- 4- Aqueceu-se a mistura num microondas, a 600 Watt, agitando o erlenmeyer sempre que necessário, até que esta tivesse um aspeto uniforme e translúcido, indicativo do processo de fusão da agarose estar completo;
- 5- Arrefeceu-se a mistura, passando água corrente no exterior do erlenmeyer, agitando-o continuamente. Posteriormente, adicionou-se o “GelRed Nucleic Acid Stain” (Biotium®), numa proporção de 0,42 µl para cada 100 ml de gel;
- 6- De seguida, colocou-se o gel no suporte e aguardou-se a sua polimerização;
- 7- Transferiu-se o gel já solidificado para a tina de eletroforese e adicionou-se tampão TBE 1× até que o gel estivesse completamente submerso pelo mesmo;
- 8- Numa microplaca de poços, prepararam-se as amostras que iam ser aplicadas no gel, misturando 2 µl de “Loading buffer” [glicerol 30% (m/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)] com 10 µl de produto de PCR de cada amostra;
- 9- Após homogeneização, aplicaram-se as amostras nos poços do gel (incluído os controlos positivo e negativo), assim como o marcador de pesos moleculares “Hyperladder 1Kb” (Bioline®);
- 10- Deu-se início à eletroforese ligando a fonte de alimentação Biometra PS 300TP a uma voltagem de 90 Volts, durante aproximadamente 70 minutos;

Por fim, observaram-se os resultados num transiluminador ultravioleta Alfa Gene, por emissão de fluorescência do GelRed.

2.6.4 Detecção de HVC-1 por PCR em Tempo Real

A detecção de HVC-1 nas amostras em estudo foi realizada por PCR em Tempo Real com emissão de fluorescência pelo agente intercalante SYBR® Green. Esta amplificação teve como alvo um fragmento de 136 pb do gene da glicoproteína B do invólucro viral (Decaro *et al.*, 2010)

De modo a minimizar contaminações cruzadas, todo o material utilizado nesta amplificação, foi previamente limpo com lixívia a 10%, sendo, posteriormente, exposto

a luz ultravioleta, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster[®]), durante um período de aproximadamente 30 minutos.

Todo o processo de preparação da mistura reacional foi realizado num laboratório distinto daquele onde foi realizada a extração de DNA, tendo sido utilizadas pipetas de uso exclusivo para PCR e pontas com filtro. Em todas as reações foram incluídos um controlo positivo e três negativos. O controlo positivo foi preparado com DNA de um recombinante plasmídico com o fragmento amplificado clonado, gentilmente cedido pela Professora Doutora Ana Duarte do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). Nos controlos negativos foi usada água desionizada estéril em substituição do DNA.

Cada amostra foi realizada em duplicado e foi considerada positiva se apresentava um limiar de deteção (C_T , do inglês “cycle threshold”) inferior a 37.

Os ensaios apenas foram validados quando se obteve amplificação do controlo positivo e quando não se observou amplificação nos controlos negativos, o que indica a ausência de contaminação com DNA exógeno.

A amplificação foi realizada num volume final de 30 μ l, contendo 15 μ l de 2 $\times$ *PerfeCTa SYBR Green SuperMix* (QuantaBio[®]), 300 nM de cada *Primer* (Tabela 8), cerca de 60 ng de DNA e água desionizada estéril para perfazer o volume final.

Tabela 8 – *Primers* utilizados na amplificação do DNA de HVC-1 por PCR em tempo real (Decaro *et al.*, 2010).

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Tamanho do Fragmento
CHV-Rev	CTG GTG TAT TAA ACT TTG AAG GCT TTA	136 pb
CHV-Fw	ACA GAG TTG ATT GAT AGA AGA GGT ATG	

A reação foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q (QIAGEN[®]), de acordo com as seguintes condições: 95°C, 10 minutos para desnaturação do DNA, e ativação da DNA polimerase, seguida de 40 ciclos a 90°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Logo após a amplificação por de PCR, foi realizada uma curva de *melting*, para confirmar a especificidade da amplificação com SYBR[®] Green. Para tal, fez-se variar a

temperatura entre 55°C e 94°C, com incrementos de 1°C em cada ciclo. Os resultados foram analisados com recurso ao software Rotor-Gene Q – Pure Detection V 2.1.0.

2.6.5 Purificação dos Produtos de PCR e Sequenciação

Após a reação de PCR em tempo real, todas as amostras positivas foram purificadas e, posteriormente, enviadas para o laboratório STABvida, para serem submetidas a sequenciação pelo método de Sanger.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com recurso ao JetQuick PCR purification spin kit[®] (Genomed), de acordo com o protocolo abaixo descrito:

- 1- Adicionaram-se 4 volumes de “Binding Buffer” para 1 volume de amostra PCR. Homogeneizou-se.
- 2- Colocou-se uma coluna num microtubo recetor de 2 ml. Pipetou-se toda a mistura anterior para a coluna e centrifugou-se a 12.000 *g*, durante 1 minuto.
- 3- Desprezou-se o filtrado do tubo de recolha, reinseriu-se a coluna no microtubo recetor vazio e adicionaram-se 500 µl de “Wash Buffer”. Centrifugou-se a coluna a 12.000 *g*, durante 1 minuto.
- 4- Descartou-se o filtrado e colocou-se a coluna no mesmo microtubo coletor. Voltou-se a centrifugar a 12.000 *g*, durante 1 minuto.
- 5- Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5 ml estéril. Adicionaram-se à coluna 50 µl de água desionizada e centrifugou-se a 12.000 *g*, durante 2 minutos.
- 6- Armazenou-se o microtubo com o produto de PCR purificado a -4° C até ao envio para sequenciação.

Os resultados da sequenciação foram visualizados com o software FinchTV (Geospiza[®]) e as sequências obtidas submetidas a análise de similaridade com o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST[®], de modo a confirmar a identidade do DNA das amostras amplificadas.

3. Resultados

3.1 Caracterização da amostra estudada

3.1.1 Caracterização por idade

Os animais que participaram neste estudo encontravam-se em idade fértil, isto é, após o primeiro cio. O animal mais velho tinha 7 anos e 7 meses e o mais novo 8 meses. A distribuição das cadelas pelos grupos etários foi a seguinte: 31,6% (n=19) na classe < 2 anos, 40% (n=24) na classe dos 2 aos 5 anos e 28,3% (n=17) na classe > 5 anos (Gráfico 3).

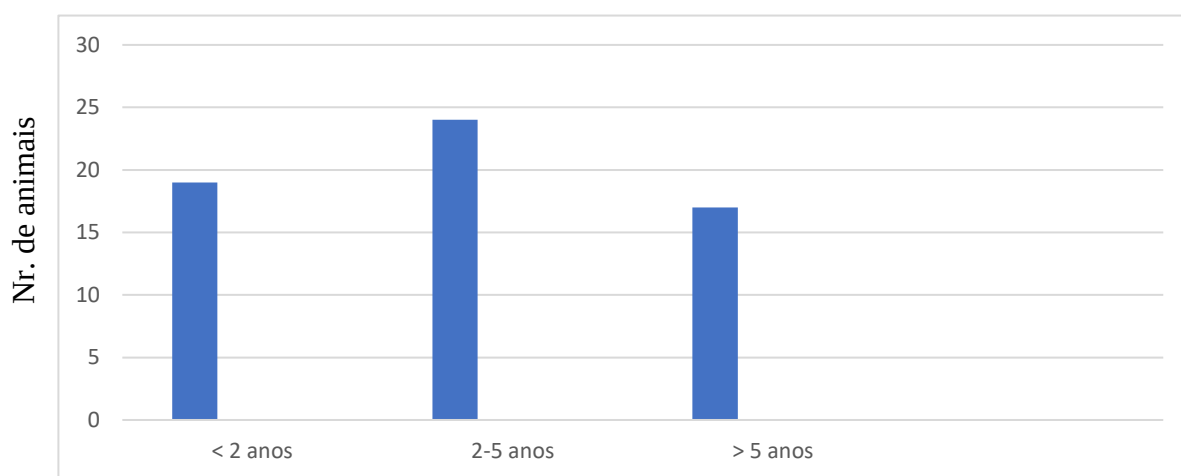


Gráfico 3: Distribuição relativa da amostra estudada em função da idade.

3.1.2 Caracterização por raça

Os animais envolvidos no presente estudo pertenciam a diversas raças: Cane corso, Pastor alemão, Beagle, Weimaraner, Dobermann, Labrador, Labrador flat coated, Bull terrier, Fox terrier, Pointer inglês, Bulldog francês, Pastor belga, Malinois, Yorkshire terrier, Jack russel terrier, American bully, Golden retriever, Dogue alemão e animais sem raça definida. A distribuição da amostra encontra-se detalhada na Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição da amostra estudada em função da raça.

Raça	Número de animais
<i>Cane corso</i>	8
<i>Golden retriever</i>	3
<i>Pastor Alemão</i>	8
<i>Dobermann</i>	3
<i>Labrador</i>	2
<i>Weimaraner</i>	1
<i>Beagle</i>	2
<i>Bull terrier</i>	6
<i>Fox terrier</i>	1
<i>Bulldog francês</i>	10
<i>Pointer inglês</i>	1
<i>Pastor belga</i>	1
<i>Flat coated retriever</i>	1
<i>Mallinois</i>	1
<i>Jack russel terrier</i>	1
<i>Yorkshire terrier</i>	1
<i>American bully</i>	2
<i>Dogue Alemão</i>	1
<i>Indeterminada</i>	7

3.1.3 Caracterização por proveniência dos animais

No que diz respeito a animais de sistemas de criação, 68,3% pertenciam a coletividades de criação inscritas no ICNF, enquanto 31,7% eram animais solitários que não faziam parte de nenhuma coletividade de criação. Todas as coletividades se encontram localizadas na zona Oeste de Portugal. Das 30 coletividades que participaram no estudo, 5 tiveram mais de um animal da sua coletividade a ser testado.

3.1.4 Caracterização por número de gestações

Relativamente ao número de gestações, 30% (n=18) apresentavam uma distribuição na classe de 1 gestação, 10% (n=6) na classe de 2 gestações, 5% (n=3) na classe de 3 gestações e 1,6% (n=1) na classe de 4 ou mais gestações. Um total de 32 animais (53,3%) nunca havia estado gestante (Gráfico 4).

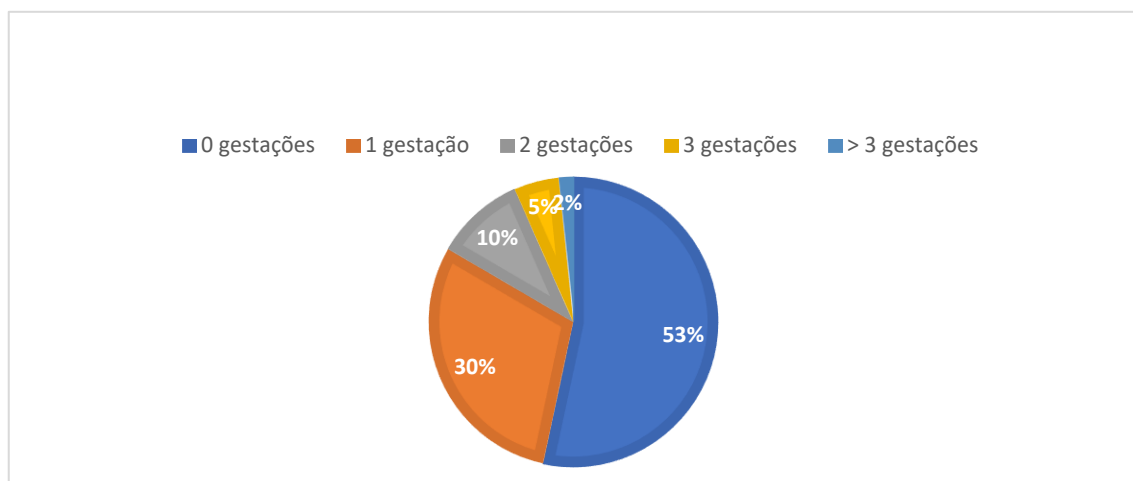


Gráfico 4: Distribuição relativa da amostra de acordo com o número de gestações.

3.1.5 Caracterização por presença de atual patologia urogenital

A nível de sinais clínicos genitais foram descritos prolapso vaginal com uma distribuição de 1,6% (n=1), cistite com 1,6% (n=1), corrimento pós-cesariana com 1,6% (n=1), hidrocolpos com 1,6% (n=1), hiperplasia vaginal com 5% (n=3), septo vaginal com 1,6% (n=1), vulvite com 1,6% (n=1) e pseudocirose com 1,6% (n=1). Foram, também, incluídas patologias da glândula mamária, nomeadamente mastites com uma distribuição de 5% (n=3) e displasia da glândula mamária com 5% (n=3) (Gráfico 5).

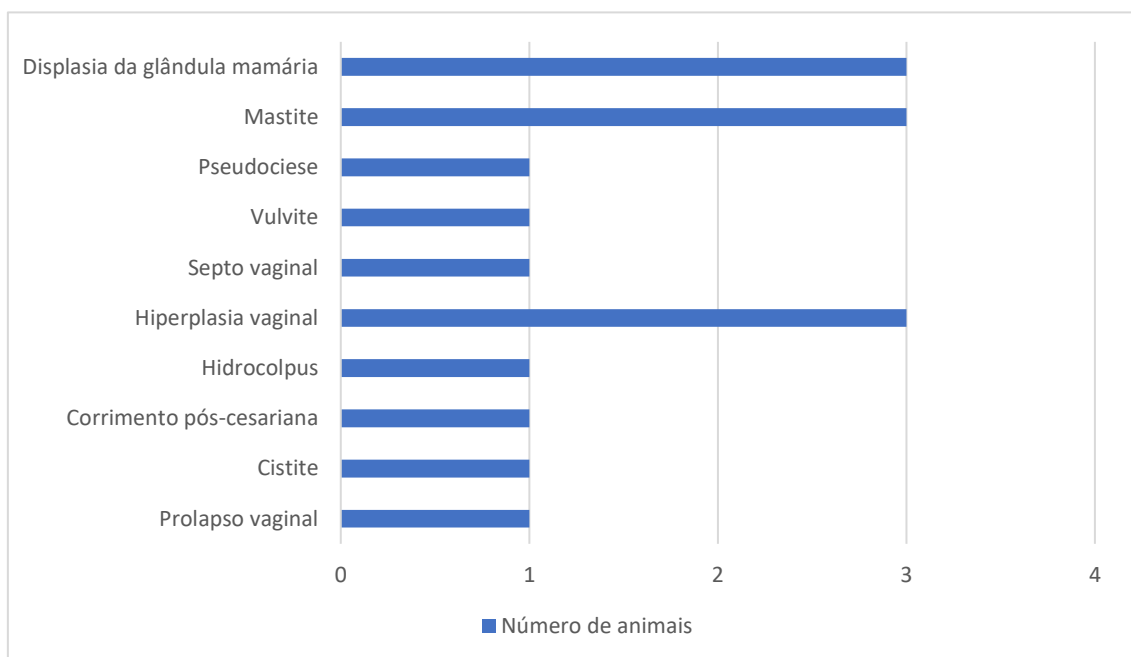


Gráfico 5: Distribuição absoluta da amostra por presença de atual patologia urogenital.

3.1.6 Caracterização por presença de histórico de infertilidade

Foram definidos como problemas de infertilidade a ocorrência de abortos, fêmeas vazias após cruzamento, reabsorções, nados-mortos e mortalidade neonatal (mortalidade até aos 21 dias de vida dos cachorros).

Dos 60 animais que participaram no estudo, 25% (n=15) apresentava histórico de infertilidade. De entre estes, 3,3% (n=2) diziam respeito a abortos, 1,6% (n=1) a fêmeas vazias após cruzamento, 1,6% (n=1) a reabsorções, 8,3% (n=5) a nados-mortos e 1,6% (n=1) a mortalidade neonatal. Houve animais que demonstraram mais do que um tipo de patologia reprodutiva, nomeadamente 1,6% (n=1) que ficaram vazias e tiveram episódios de reabsorções, 1,6% (n=1) com episódios de abortos e reabsorções e 5% (n=3) de fêmeas que ficaram vazias e tiveram nados mortos (Gráfico 6).

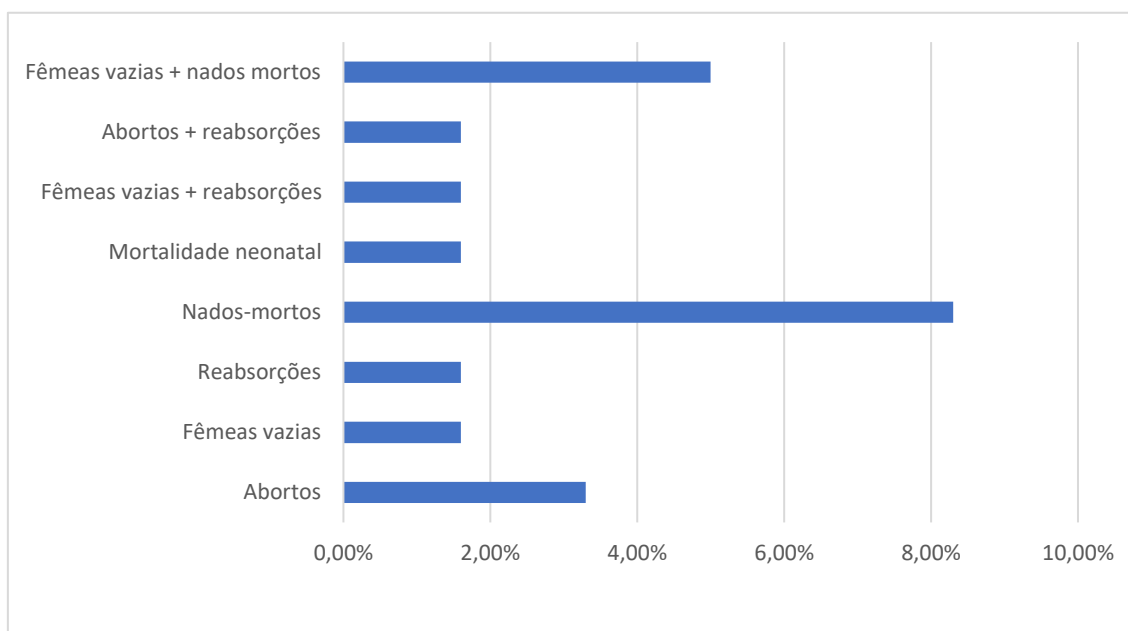


Gráfico 6: Distribuição relativa da amostra por tipo de patologia reprodutiva.

3.1.7 Caracterização por métodos profiláticos

Nenhum dos animais, neste estudo, foi vacinado para herpesvírus canino no ano 2021/2022, uma vez que a vacina *Eurican Herpes 205®* (Merial, França) não foi comercializada em Portugal durante este período.

Apenas 8,3% (n=5) dos animais realizam regularmente rastreios a agentes infecciosos, nomeadamente culturas bacteriológicas de zaragatoa vaginal para pesquisa de agentes aeróbios.

3.1.8 Caracterização por fase do ciclo éstrico

Das 60 amostras presentes neste estudo, 35% (n=21) encontravam-se em fase de proestro, 23,3% (n=14) em fase de estro, 23,3% (n=14) em diestro e 18,3% (n=11) em anestro (Gráfico 7).

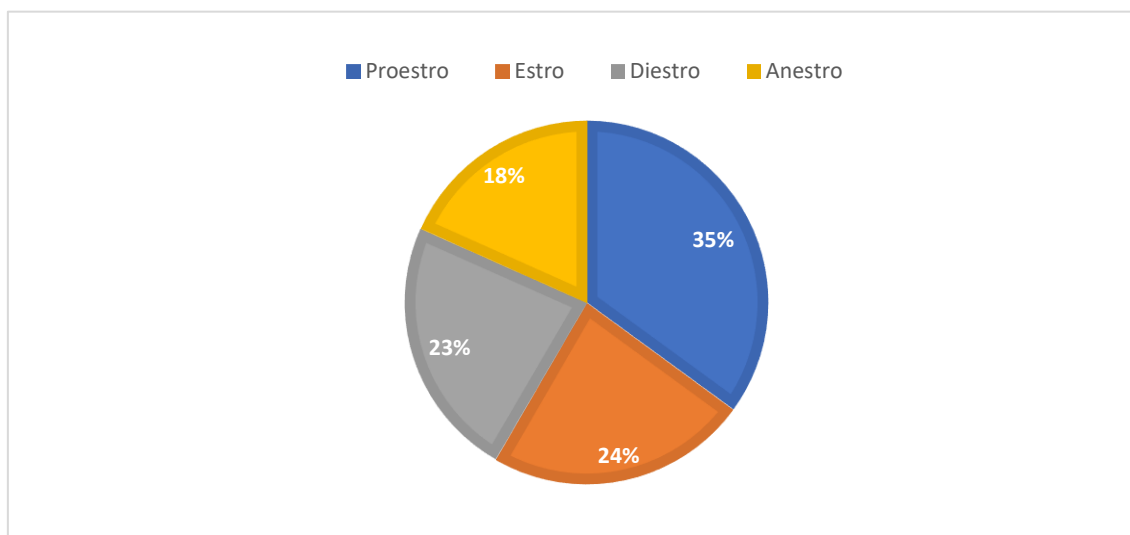


Gráfico 7: Distribuição relativa da amostra por fase do ciclo éstrico.

No momento da colheita, em cio, isto é, na fase folicular, que corresponde ao período de proestro e estro, observou-se uma distribuição de 58,3% (n=35), enquanto que em fase lútea, ou seja, diestro apresentavam-se 23,3% (n=14) e em anestro 18,3% (n=11) (Gráfico 8).

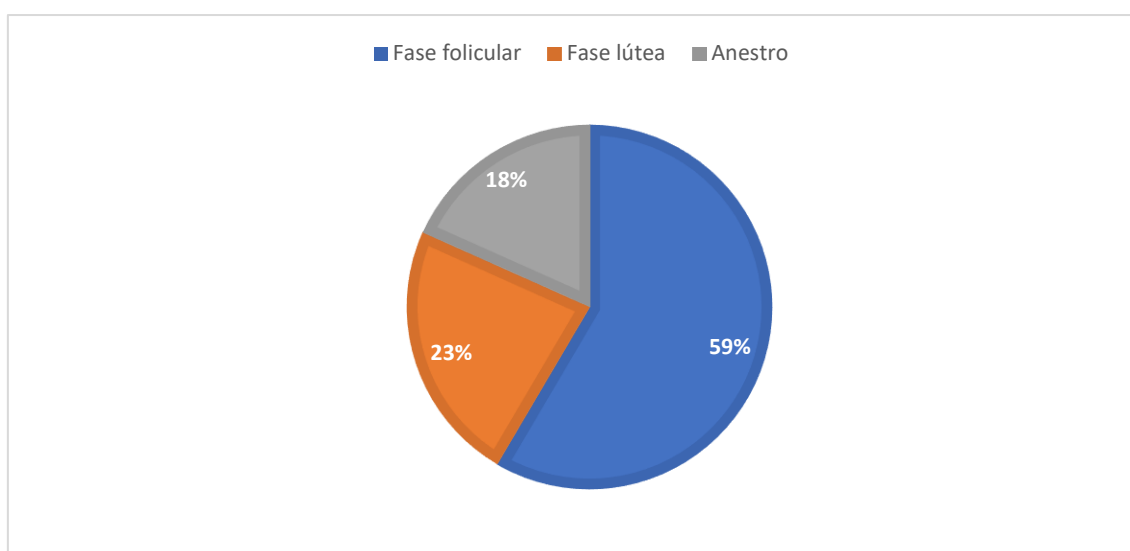


Gráfico 8: Distribuição relativa da amostra por fase folicular, fase lútea ou anestro.

3.2 Análise molecular

3.2.1 Amplificação de um fragmento do gene β -actina

Um fragmento com 855 pb do gene β -actina canino foi amplificado com sucesso em todas as amostras (Figura 2), o que é indicativo da integridade do DNA e ausência de inibidores de reação PCR que, pode assim, ser submetido a PCR para detecção de herpesvírus canino.

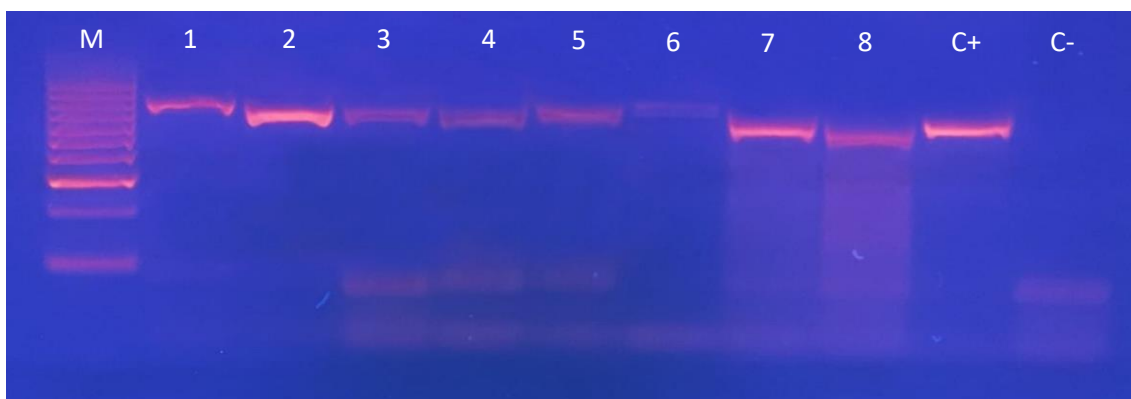


Figura 2 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento do gene β -actina. M: marcador de peso moleculares (Hyperladder 1Kb, Bioline®); 1-8: amostras em estudo; C+: controlo positivo; C-: controlo negativo.

3.2.2. Detecção de DNA de HVC-1 por PCR em tempo real

Através da PCR em tempo real identificou-se a presença de HVC-1 em 2 dos 60 animais em estudo (3,3%). Para estas amostras obteve-se um valor médio de C_T de 35,01 e 35,09.

Para avaliar a especificidade da amplificação, recorreu-se à realização de uma curva de *melting*. A análise da curva permitiu identificar, em ambas as amostras amplificadas e no controlo positivo, um pico bastante pronunciado. A temperatura de dissociação observada para o controlo positivo e para as duas amostras positivas situou-se entre 76,5°C e 77,0°C (Figura 3). O pico que se observa a montante do pico principal pode ser consequência da presença de dímeros de *primers* e/ou produtos de amplificação inespecífica.

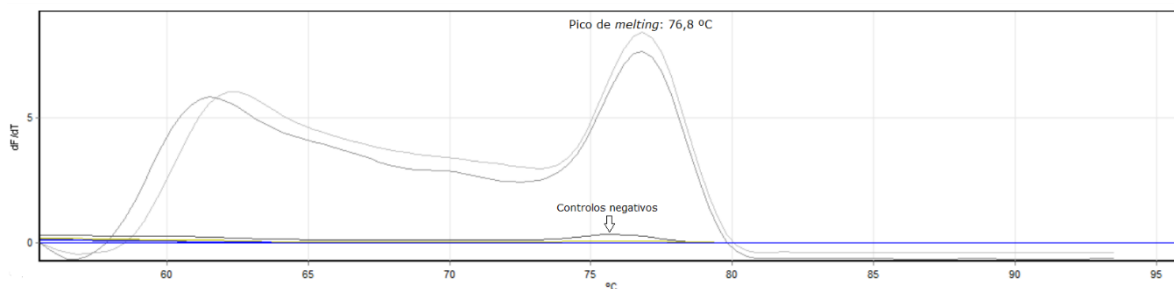


Figura 3 – Curva de *melting* de uma das amostras positivas.

3.2.3 Sequenciação de DNA

A pesquisa de similaridade das sequências das amostras positivas (Figura 4), realizada através do algoritmo BLAST, revelou uma percentagem de identidade de 98,99% com várias estirpes e isolados de HVC-1.

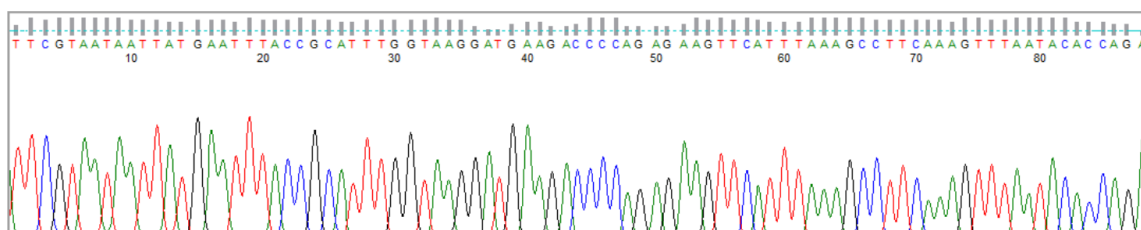


Figura 4 – Resultado da sequenciação de Sanger de uma das amostras positivas.

3.2.4 Caracterização dos animais positivos para HVC-1

No presente estudo, ambas as cadelas positivas para o HVC-1 pertenciam a coletividades, tinham o plano vacinal obrigatório em dia e apresentavam uma condição corporal de 5/9.

A nível de higiene da coletividade, ambas as explorações cumpriam o protocolo de higiene recomendado pelo Médico Veterinário e seguiam as indicações recomendadas pelos fabricantes dos produtos de limpeza e desinfecção.

Uma das duas cadelas positivas, que pertencia a uma coletividade com mais 7 animais, não apresentava histórico de problemas reprodutivos e o método de cruzamento utilizado foi a monta natural. Este animal nunca foi testado para agentes infecciosos. A outra cadela positiva para HVC-1 havia sido submetida a inseminação artificial e pertencia a uma coletividade com mais 8 animais. Este animal tinha realizado uma análise

bacteriológica vaginal (no mesmo dia da colheita da amostra para diagnóstico molecular de HVC-1), devido a queixas reprodutivas; o resultado da análise evidenciou a presença do agente *Enterococcus spp.*

Ambas as cadelas tinham história de uma gestação prévia sem episódios de distócia e ambas se encontravam na fase de estro. Não foram observadas quaisquer lesões genitais em nenhuma das cadelas no momento da colheita. No entanto uma delas apresentava infertilidade, que se traduziu em reabsorções e tentativas de cruzamento em que ficou “vazia”. Este mesmo animal, ao nível da patologia sistémica, apresentava dermatite atópica; no entanto, no momento da colheita não se encontrava a realizar nenhuma medicação.

No presente estudo, nenhuma das cadelas positivas tinha sido isolada dos restantes animais antes do parto, embora em ambos os canis os cachorros fossem isolados a partir do nascimento. Ambas as cadelas ficaram gestantes após serem testadas e nenhum dos cachorros apresentou sinais de estar infetado pelo vírus.

4. Discussão

As infecções genitourinárias recorrentes em cadelas constituem um problema frequente em Medicina Veterinária (Kustritz, 2008; Pretzer, 2008). Em Portugal, a criação de cães com fins comerciais é uma atividade que tem vindo a registar crescimento. Todavia, a saúde genital da cadela, fator intimamente relacionado com o sucesso reprodutivo, nem sempre tem sido alvo da devida atenção. O herpesvírus canino é um agente comum na Europa; contudo, apesar da distribuição ubíqua, as consequências da infeção permanecem, ainda, pouco claras (Evermann *et al.*, 2011). Dada a escassez de informação sobre a infeção do trato genitourinário por HVC-1, bem como a sua relação com as diferentes fases do ciclo éstrico, o presente estudo pretendeu avaliar a presença do vírus em cadelas em diferentes fases do ciclo éstrico.

De acordo com a pesquisa bibliográfica efetuada, o último estudo realizado em Portugal sobre a prevalência de HVC-1 em cadelas, data de 2018, tendo sido descrita uma seroprevalência de 75,5% e a ausência de deteção do vírus por PCR em tempo real (Dias, 2018). Neste contexto, o resultado encontrado no presente estudo, onde foi observada uma baixa frequência de infeção por diagnóstico molecular, vai ao encontro do já descrito em 2018.

No presente estudo teria sido importante a realização de uma análise serológica de modo a poder avaliar a exposição dos animais ao vírus e comparar estes resultados com o diagnóstico molecular. Apesar das limitações de ambas as técnicas, como abordado anteriormente, seria interessante perceber se os resultados positivos no teste molecular seriam positivos, também, no teste serológico, uma vez que, apesar de haver excreção viral, poderia já existir imunidade adquirida por memória imunológica. A complementaridade entre os dois testes diagnósticos teria sido uma mais-valia para avaliar o estado sanitário da população estudada. Para além disso, alguns autores verificaram a ocorrência de seroconversão durante o estro (Feyen *et al.*, 2004), sendo interessante verificar se o mesmo aconteceria neste estudo. Para isso, o ideal seria realizar testes moleculares e serológicos seriados e em todas as fases do ciclo éstrico do mesmo animal.

Segundo Rootwelt *et al.* (2011), o vírus tem a capacidade de entrar em estado latente, localizando-se, durante esse período, principalmente no tecido ganglionar e linfóide e não em zonas de contágio, como é o caso da mucosa genital, oral e respiratória. Portanto, não havendo excreção viral, a infeção torna-se de difícil deteção, mesmo por

técnicas com elevada sensibilidade, como a PCR em tempo real. No presente estudo teria sido interessante avaliar a presença de HVC-1, também em zaragatoas das mucosas respiratória e oral.

Na literatura, observa-se uma grande discrepância entre valores de seroprevalência para HVC-1 e de detecção molecular, pelo que é necessária alguma prudência na interpretação de resultados de serologia. A análise deve ter em consideração, não só a seroprevalência, mas também a presença de excreção deste agente nas respetivas mucosas genital, respiratória e oral; seria, também, interessante uma eventual pesquisa ganglionar, embora esta seja de mais difícil acesso. Os testes serológicos são meramente indicativos de um contacto prévio com o vírus, não estabelecendo uma relação direta com a infeção ativa, nem com a excreção viral. Apesar de não haver informação serológica no presente estudo, esta também não seria indicativa de infeção ativa. Assim, são descritas, frequentemente, prevalências elevadas sem, no entanto, serem indicativas de presença de doença (Franco *et al.*, 2012). Os testes moleculares permitem obter resultados positivos quando há excreção viral; no entanto, poderão observar-se alguns resultados falso negativos, dependendo do local onde se verifica excreção viral e do local de colheita da amostra. Neste contexto, podemos dizer que o teste serológico e o diagnóstico molecular se complementam, não devendo nenhum deles ser considerado de forma isolada. Idealmente, seria recomendável realizar ambos os testes, de forma a permitir uma melhor avaliação sobre a presença de infeção, seja ela prévia ou ativa.

Os dois resultados positivos do presente estudo pertencem a duas cadelas, ambas na fase de estro. Durante a fase folicular, pela influência dos estrogénios, o útero desenvolve uma resposta inflamatória de forma a combater os microrganismos que poderão ascender ao útero pelo facto de o cérvix se encontrar aberto (Watts *et al.*, 1996). Contrariamente, na fase lútea, pela ação da progesterona, ocorre imunossupressão e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de infeções (Rocca & FitzGerald, 2002). Um estudo recente sobre a reativação de HVC-1 em bezerros concluiu que a progesterona provoca a reativação do vírus de forma intermitente em tecidos onde o recetor da P4 se encontra expresso abundantemente (El-Mayet *et al.*, 2022). O referido estudo confirma a presença de imunossupressão causada pela progesterona, hormona predominante na fase lútea e gestação. Para além disso, vários estudos em vitelos relacionam a reativação do herpesvírus do tipo 1 bovino com níveis de *stress* (Rock *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 2006). Para simular uma situação de *stress* de forma experimental, os vitelos foram também

submetidos a administração de dexametasona, mimetizando o efeito de *stress* através do aumento da produção de glucocorticóides (Rock *et al.*, 1992). El-Mayet e colaboradores (2022) usaram no seu estudo a administração tanto de progesterona como de dexametasona a vitelos, o que provocou a reativação do vírus, comprovando que tanto o *stress* como a progesterona poderão influenciar a reativação viral. No presente estudo, o mesmo não se verificou, uma vez que ambas as cadelas positivas ao HVC-1 se encontravam em fase de estro, fase que é marcada por valores de progesterona mais baixos comparativamente aos da fase de diestro. Isto poderá ser explicado pelo facto de não haver conhecimento no presente estudo, da presença de contacto das cadelas que se encontravam em diestro com outros animais seropositivos e ainda pelo facto da duração do diestro na cadela ser independente do estatuto gestacional, sendo que o mesmo não se verifica na vaca.

Durante o estro, as cadelas encontram-se sujeitas a um elevado nível de *stress*, quer pelas variações hormonais quer pela pressão reprodutiva exercida, sugerindo a ocorrência de casos de reativação durante o estro (Greene, 2012). No entanto, os resultados do presente estudo não foram estatisticamente significativos, pelo que não foi possível inferir sobre uma possível associação entre estes dois fatores. No futuro, será importante delinear estudos que permitam clarificar o envolvimento das hormonas sexuais no caso específico da reativação do HVC-1 canino. Seria, também, importante, a realização de medições do cortisol sérico para avaliar o envolvimento de fatores de *stress* na reativação do HVC-1.

O objetivo secundário do presente estudo consistiu na caracterização epidemiológica, das condições de manejo e estado de saúde dos animais, no sentido de identificar alguns fatores que possam ser facilitadores da transmissão do vírus. Segundo Ronsse *et al.* (2004), uma maior densidade de animais por canil, aumenta o risco de infeção por herpesvírus canino. Segundo Greene (2012), o maior índice de seroprevalência é encontrado na Europa, especialmente em canis de criação. Este facto pode ser explicado por uma maior disseminação do vírus devido a um aumento de concentração de animais nas coletividades caninas, nos sistemas de criação. Vários autores descreveram uma seropositividade superior ao HVC-1 em animais pertencentes a coletividades (Engels *et al.*, 1980; Seo *et al.*, 1994; Reading & Field, 1998). Babaei *et al.* (2010) e Ronsse *et al.* (2004) demonstraram que os cães de coletividades tiveram uma maior seroprevalência (22,9%) em comparação com cães de propriedade privada

(19,1%); no entanto, segundo estes autores, estes valores não se traduzem numa diferença significativa. Por outro lado, Dalhbom e colaboradores (2009) demonstraram que cães em canis de grandes dimensões apresentavam títulos de anticorpos mais elevados do que cães de unidades menores. No presente estudo, ambos os animais positivos pertenciam a canis de criação. Um dos canis tinha um total de 9 animais e o outro um total de 8 animais. Ambas as coletividades foram visitadas e, tendo em conta as suas dimensões, a densidade de animais foi considerada moderada a alta. Dadas as características observadas, foi recomendada a realização de uma quarentena apropriada e precaução na introdução de novos animais.

No presente estudo, ambos os animais apresentavam idade adulta (4 e 7 anos). Apesar de existirem estudos que correlacionam positivamente a idade adulta com a seropositividade (Ronsse *et al.*, 2005), não existem estudos que comprovem a relação entre os resultados PCR positivos e a idade dos animais.

Os neonatos e as cadelas (especialmente as que não foram previamente expostas ao vírus) deverão ser isolados em qualquer gestação (principalmente durante as últimas três semanas) e até, pelo menos, três semanas depois do parto, limitando o contato com outros cães, para evitar a exposição durante este período (Sykes & Davidson, 2014). Neste estudo, nenhuma das cadelas positivas tinha sido isolada dos restantes animais antes do parto, embora em ambos os canis os cachorros fossem isolados a partir do nascimento. A separação dos cachorros à nascença dos restantes animais, não só evita a exposição a vários agentes, incluído o HVC-1, como limita a transmissão oronasal deste e de outros agentes. No entanto, o facto de a mãe não ser isolada, algumas semanas antes do parto, poderá constituir um fator de risco, uma vez que, consiste num período com maior nível de *stress* e com maior suscetibilidade para contrair infeções. Para além disto, recomenda-se o seu isolamento, também, devido à introdução de novos animais que, segundo Fontbonne e colaboradores (2004), poderá ser responsável pela reativação do vírus, visto ser um elemento desencadeador de *stress*.

De acordo com Rootwelt *et al.* (2011), é importante que os animais do canil se encontrem em boas condições de saúde e que cumpram o plano profilático vacinal em vigor, uma vez que qualquer infeção poderá levar à reativação do vírus, caso este se encontre no seu estado latente. Ambas as cadelas positivas no presente estudo tinham o plano vacinal obrigatório em dia e apresentavam uma condição corporal de 5/9, o que sugere que as necessidades nutricionais estavam a ser cumpridas (German *et al.*, 2010).

Uma das cadelas positivas apresentava dermatite atópica; no entanto, no momento da colheita não se encontrava a realizar nenhuma medicação. Esta doença, por ser autoimune, poderá despoletar a reativação do vírus em momentos de agravamento da mesma. No entanto, o facto de existir reativação não implica a existência de excreção viral, uma vez que o animal já poderá ter imunidade adquirida ao vírus.

Segundo vários autores, o melhor método profilático para o HVC-1 em neonatos é a transferência de imunidade passiva com o colostro, após imunização ativa das fêmeas (Greene, 2012). No ano da realização deste trabalho (2021/2022), a vacina contra o herpesvírus não foi comercializada em Portugal. Este foi, provavelmente, um dos mais importantes fatores de risco para a infeção por HVC-1. O facto de os dois animais positivos não terem sido vacinados contra o HVC-1 durante a gestação, não só consiste num risco de infeção para a mãe durante este período e posterior contaminação dos cachorros através da via transplacentária, como impede que a mãe desenvolva anticorpos vacinais que possam ser, posteriormente, transmitidos aos cachorros através do colostro. Este será, segundo o que se pensa, um dos métodos profiláticos mais eficazes para evitar a contaminação por este vírus (Greene, 2012; Krogenaes *et al.*, 2012; Rootwelt *et al.*, 2011).

A higiene consiste noutro ponto essencial nos canis. O HVC-1, devido ao facto de apresentar uma camada ou envelope lipídico, é facilmente inativado através da limpeza regular e da utilização de desinfetantes e solventes lipídicos, tais como o éter e o clorofórmio, ou quando exposto a valores de pH inferiores a 5 ou superiores a 8 (Parzefall, 2011). Segundo Ligier (2012), a manutenção das instalações dos canis de criação deverá ser realizada através de duas etapas - limpeza e desinfecção. A limpeza consiste na ação mecânica e/ou química de remoção da matéria orgânica, limpando as superfícies com água e detergente. A desinfecção consiste na ação química ou física que impede a replicação viral ou elimina microrganismos das superfícies inertes. Ambas as explorações cumpriam este protocolo e seguiam as indicações recomendadas pelos fabricantes dos produtos de limpeza e desinfecção.

Acredita-se que o recurso à inseminação artificial como medida preventiva possa reduzir o risco de contaminação por HVC-1 (Green, 2012). No entanto, apesar de ser conhecida a transmissão deste vírus por via venérea, a transmissão através do sémen ainda não foi alvo de muitos estudos (Torres *et al.*, 2015). Neste estudo, um dos animais positivos foi reproduzido através de inseminação artificial, ao passo que o outro foi

através de monta natural. Não é, assim, possível estabelecer nenhuma relação entre o método de cruzamento e a transmissão do vírus.

Relativamente à presença de patologia reprodutiva, apenas uma das cadelas apresentou infertilidade, que se traduziu em reabsorções e tentativas de cruzamento em que ficou vazia. De acordo com a bibliografia consultada, quando uma cadela gestante é infetada, o vírus propaga-se até ao feto podendo causar morte fetal, mumificação, abortos, nascimentos prematuros e nados-mortos (Johnston, Kustritz & Olson, 2001). Caso a infeção ou reativação ocorra nos primeiros 30 a 40 dias de gestação, esta poderá provocar reabsorções ou morte fetal (Hashimoto *et al.*, 1983). Fontbonne (2006), relata que, por vezes, os criadores não detetam a gestação queixando-se de problemas de fertilidade. Dahlbom *et al.* (2009) descreve que cães de coletividades com títulos de anticorpos anti-HVC-1 elevados apresentavam mais patologias reprodutivas comparativamente a cães com títulos inferiores. No nosso estudo, necessitaríamos de maior casuística para poder estabelecer uma correlação entre a patologia reprodutiva e a presença do HVC-1.

Numa das cadelas, no dia da colheita da amostra para deteção molecular do HVC-1, foi também realizada, uma análise bacteriológica da porção cranial da vagina. Esta análise revelou a presença de *Enterococcus spp.* em quantidades elevadas. Existe a possibilidade de a infeção por um dos agentes poder ter ocorrido secundariamente ao outro. No caso de ter existido uma reativação do HVC-1, este poderá ser responsável por um desequilíbrio da flora vaginal e aparecimento de *Enterococcus spp.* em quantidades consideradas elevadas. No entanto, não existem dados precisos acerca da composição qualitativa e quantitativa da flora vaginal, apesar deste agente ser mais encontrado em cadelas com infeção do trato reprodutivo (Golińska *et al.*, 2021). O oposto é, também, uma possibilidade. O *stress* a que estes animais estiveram sujeitos na fase folicular poderá predispor a um desequilíbrio na flora vaginal podendo, consequentemente, levar à reativação do HVC-1.

A presença de bactérias, livres ou dentro de epitélio celular é frequentemente descrita em citologias vaginais de cadelas saudáveis (Groppetti *et al.*, 2012). Dependendo da fase do ciclo éstrico, 50 a 100% das cadelas saudáveis apresentam flora vaginal microbiana constituída por microorganismos aeróbios e anaeróbios e, frequentemente, alguns oportunistas. Foi demonstrado que, a microbiota vaginal normal, protege o trato urogenital contra bactérias patogénicas através da competição por nutrientes ou interferindo na adesão aos recetores epiteliais. Por outro lado, foi também demonstrado

que os agentes bacterianos isolados de cadelas com patologia reprodutiva não diferem significativamente dos encontrados em cadelas saudáveis (Golińska *et al.*, 2021). Kustritz (2007), sugeriu que infeções no trato reprodutivo são causadas por um sobrecrecimento da flora microbiana normal, sendo crucial que os resultados das bacteriologias sejam quantitativos, uma vez que um resultado é considerado patológico quando há presença de alguns agentes em grandes quantidades.

É importante ter em consideração que, tal como referido anteriormente, o HVC-1 pode ser uma causa para a infertilidade observada nesta cadela. No entanto, tendo em conta a presença concomitante de *Enterococcus spp.*, este agente poderá ser considerado, também, como possível responsável da infertilidade desta cadela, que apresentou episódios de reabsorção e duas tentativas falhadas de concepção. Para averiguar esta situação, poderia ter sido realizada uma lavagem uterina transcervical para averiguar a presença de bactérias no espaço intrauterino ou mesmo a realização de uma biópsia endometrial (Mir *et al.*, 2013).

Apesar de alterações na flora vaginal não estarem diretamente ligadas à presença de problemas reprodutivos, estes poderão predispor esta cadela ao desenvolvimento de um quadro de endometrite que, dependendo do seu grau de gravidade, poderá ter como consequência a redução da sua fertilidade (Schlafer & Foster, 2016).

Segundo Hashimoto *et al.* (1983), a nível genital, nas cadelas infetadas por HVC-1, podem ser observadas hemorragias submucosas ou petéquias, lesões papulovesiculares, hiperemia da mucosa e hiperplasia dos folículos linfóides. Holst *et al.* (2012), relatou que, durante o período de proestro, poderão ser observadas lesões vesiculares vulvares na cadela, que poderão sofrer involução durante o período de anestro.

Tendo em conta que ambas as cadelas se encontravam na fase de estro que, juntamente com a fase de proestro, corresponde à fase folicular, a probabilidade de encontrar lesões genitais seria mais elevada comparativamente à fase lútea. No entanto, não foram observadas quaisquer lesões ou queixas de patologia genital.

Ambas as cadelas ficaram gestantes após serem testadas e nenhum dos cachorros apresentou sinais clínicos compatíveis com infeção viral. O facto de terem conseguido ambas ficar gestantes e levado a gestação a termo, aliado ao facto de nenhum dos cachorros da ninhada ter apresentado manifestações clínicas de presença do vírus, indica que as alterações reprodutivas e a transmissibilidade não podem ser confirmadas neste estudo.

De entre as 30 coletividades que participaram no estudo, apenas 5 tiveram mais do que um animal a ser testado. O objetivo desta investigação baseava-se no pressuposto da importância da transmissão oronasal, caso algum destes animais tivesse sido positivo. Contudo, o número de animais que foi possível avaliar dentro da mesma coletividade foi insuficiente para retirar conclusões.

Segundo Greene (2012), a fase de estro e do parto são consideradas alturas de risco para reativação do vírus, não só pelo *stress*, como, também, pelas alterações hormonais que ocorrem neste período, recomendando-se testar os animais, se possível, na fase de diestro. Segundo Nothling *et al.* (2008), foram detetados diferentes padrões para os títulos de anticorpos, consoante a fase do ciclo em que a cadela se encontrava. A titulação tende a variar durante a vida do animal e, apesar de não haver correlação direta com a fase do ciclo, sabe-se que, durante o diestro, algumas fêmeas tendem a apresentar títulos de anticorpos mais baixos (Ronsse *et al.*, 2005).

Outra limitação do presente estudo consistiu no facto de não terem sido realizadas zaragatoas nasais, oculares e orofaríngeas. Este estudo debruçou-se na excreção genital de modo a poder relacioná-la com a fase do ciclo éstrico. No entanto, existe a possibilidade de os animais que não apresentaram excreção viral genital poderem estar infetados e terem excreção viral nasal ou ocular (Greene, 2012). Apesar de nenhum dos animais ter manifestado sinais clínicos oculares ou respiratórios, esta é uma hipótese que não pode ser afastada.

No presente estudo foram obtidas amostras em 30 coletividades, assim como animais solitários, de tutores. No entanto, todos os animais eram provenientes da zona Oeste de Portugal, o que é pouco representativo a nível nacional.

Todos os animais que entraram no estudo eram fêmeas; no entanto, tendo em conta a escassez de estudos relativos à presença de HVC-1 no sémen canino, seria interessante, para estudos futuros, a realização de serologias e deteção molecular deste agente em amostras de sémen de machos nas coletividades.

Em termos de protocolo de tratamento e gestão destes animais positivos, sugere-se a tomada de algumas medidas profiláticas. Primeiro, é fundamental instalar um protocolo profilático de modo a evitar a disseminação do vírus pelos restantes animais da coletividade. Nesse sentido, é importante a diminuição dos fatores de risco acima mencionados como a densidade de animais da coletividade, o isolamento das gestantes e dos cachorros, boas práticas de higiene e diminuição de exposição a eventos de potencial

stress. Como já referido anteriormente, a vacinação contra o HVC-1 das cadelas gestantes consiste numa das medidas mais importantes a nível profilático, não só pela proteção intrauterina, como pela passagem de imunidade passiva aos cachorros através do colostro (Rootwelt *et al.*, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Tendo em conta que ambas as cadelas ficaram gestantes após a testagem, sugerem-se, de seguida, algumas medidas para evitar a transmissão do vírus aos cachorros.

Segundo Fontbonne (2011), a realização de cesarianas eletivas como medida preventiva não se adequa, uma vez que apenas evitam a contaminação através do canal de parto, mas não impedem as restantes vias de transmissão, tais como a via oronasal e transplacentária. Em 2016, Sanjay Kapil patenteou uma manga vaginal que impede os cachorros de contrair HVC-1 por contato com a parede vaginal da mãe durante o nascimento (US20160051663 A1, 2016). Esta poderá ser uma alternativa à cesariana, evitando, assim, a transmissão pelo canal de parto.

Caso a mãe não tenha sido vacinada para HVC-1 durante a gestação, como foi o caso neste estudo, a imunização passiva através do colostro, apesar de importante para a imunidade dos cachorros, não confere proteção contra este vírus (Greene, 2012).

Vários estudos sugerem a administração intraperitoneal de 1-2 ml de soro hiperimune aos cachorros (Sykes & Davidson, 2014). Sugere-se, também, a criação de um banco de soro hiperimune a partir de cadelas seropositivas, de modo a poderem tratar-se cachorros “órfãos” com suspeita de infeção por herpesvírus ou suplementação de cachorros que não ingeriram o colostro de mães seropositivas em quantidade suficiente.

Um estudo realizado por Mila *et al.* (2014) sugere a suplementação oral de plasma hiperimune, numa dose de 1.5 ml/100g nas primeiras 4 horas de vida dos cachorros, seguida por uma segunda administração da mesma quantidade passadas outras 4 horas.

Caso se suspeite de infeção nos cachorros, é importante manter a temperatura a 38° C, uma vez que diminui significativamente a replicação viral. Para isto, segundo Green (2012), deverão manter-se as maternidades com temperaturas acima dos 30° C e com uma percentagem de humidade compreendida entre os 45 e 55%.

Segundo Green (2012), em neonatos em que a infeção sistémica ainda não esteja totalmente instalada, existem relatos de tratamentos bem-sucedidos com aciclovir (Greene, 2012).

Deverá ser colocada ao criador a hipótese de isolar as cadelas com resultados moleculares positivos para HVC-1. No entanto, considerando o facto de, que após a primeira ninhada infetada, as seguintes não são infetadas, pode não se justificar afastar estas cadelas da reprodução. De qualquer das formas, o recurso à inseminação artificial é recomendado.

Para as mães, a terapêutica passa por evitar quebras de imunidade, evitando eventos causadores de *stress*. Caso se trate de um animal ansioso, sugere-se a utilização de coleiras ou sprays com feromonas calmantes, como o Adaptil®, durante o período da fase folicular (Santos *et al.*, 2020). Caso apresentem infeções bacterianas oportunistas, a administração de um tratamento antimicrobiano adequado ao agente em causa é, frequentemente, recomendada (Reagan & Sykes, 2020). No entanto, é importante reforçar que deverá ser testado o agente em causa, de modo a escolher-se o antibiótico certo e diminuir o risco de resistência antimicrobiana, assegurando um tratamento eficaz da infeção. Caso as cadelas apresentem sinais clínicos genitais poderá realizar-se um duche vaginal com aciclovir, que não só diminui as manifestações genitais do vírus, como elimina a sua excreção e consequente transmissão (US20160051663 A1, 2016).

Segundo Krogenaes *et al.* (2014), a principal via de propagação do vírus consiste na via oronasal e não na via venérea, apesar de outros autores considerarem a segunda epidemiologicamente mais relevante (Babaei *et al.*, 2010). Assim, uma vez que a transmissão oronasal em coletividades apresenta um papel importante na manutenção da presença do agente entre os vários animais, para além das medidas já referidas, recomenda-se também a testagem da restante coletividade.

A realização deste trabalho foi impulsionada pela escassez de estudos sobre este agente. Na literatura, são poucos os estudos sobre a infertilidade na cadela e os agentes por ela responsáveis. Na realidade da prática clínica, quando existem queixas de problemas reprodutivos, o facto de existir, ainda, um desconhecimento sobre este tema, leva a que sejam administradas terapêuticas abrangentes, como é o caso da antibioterapia, mesmo quando se desconhece o agente responsável por estes problemas. Tendo em conta o conhecimento atual sobre os riscos das terapêuticas antimicrobianas, nomeadamente as resistências, torna-se urgente o estudo mais aprofundado destes agentes.

Poucos estudos se debruçaram sobre a associação entre a fase do ciclo éstrico e a infeção por HVC-1. Em 2018, num estudo realizado na região de Lisboa e Vale do Tejo e Distrito de Coimbra não foi encontrada qualquer associação entre estas duas variáveis.

No entanto, os autores só estudaram animais em duas fases do ciclo: estro e anestro (Dias, 2018, p.31). O presente trabalho tentou preencher essa lacuna.

Que seja do conhecimento da autora, o presente trabalho faz a primeira descrição da detecção de DNA de HVC-1, por PCR em tempo real, em Portugal. Estes resultados sugerem que, ou o agente se encontra subdiagnosticado, ou poderemos estar perante um aumento da sua prevalência nos últimos anos em Portugal, o que reveste de importância a realização de mais estudos sobre este tema.

5. Conclusão

Com o presente estudo pretendeu-se avaliar, por PCR em tempo real, a presença de herpesvírus canino tipo 1 em cadelas, em diferentes fases do ciclo éstrico. O DNA do vírus foi detetado em dois animais, correspondendo a uma frequência relativa de infeção de 3,3%. Ambas as cadelas positivas se encontravam na fase de estro (fase folicular). Este resultado, apesar de não ser estatisticamente significativo, sugere que esta fase possa ser um período de maior *stress* e suscetibilidade para os animais, conducente à reativação do HVC-1, o que vai de encontro ao descrito por alguns autores.

Nos animais positivos ao HVC-1, foram identificadas algumas características epidemiológicas e de manejo (idade, pertença a uma coletividade, densidade populacional do canil e ausência de vacinação contra o HVC-1) que podem favorecer a transmissão do vírus.

Os resultados aqui apresentados alertam para a necessidade de se realizarem mais estudos sobre este e outros agentes responsáveis por problemas de fertilidade, assim como a necessidade de se identificarem fatores predisponentes à infeção.

Sugere-se, para o futuro, alargar o estudo a uma amostra mais representativa da realidade portuguesa, incluindo animais de várias coletividades de Norte a Sul do País. Além disso, seria muito interessante realizar, em paralelo, a deteção do agente por PCR em tempo real e a serologia, para avaliar a exposição prévia dos animais ao HVC-1 e comparar os resultados obtidos pelas duas técnicas, nas várias fases do ciclo éstrico das cadelas. Sugere-se ainda, a realização, não só de zaragatoas vaginais, mas também de zaragatoas oculares, nasais e orofaríngeas e a testagem dos machos das coletividades, de modo a estudar não só a eficácia da transmissão oronasal como a transmissão venérea através do sémen.

6. Referências bibliográficas

- Acar A, Gur S, Dogan I, Akca Y (2009). A serologic investigation of canine herpesvirus type 1 infection in kangal dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 8: 1377-1380.
- Andre-Fontaine, G., Aviat, F., Marie, J. L., & Chatrenet, B. (2015). Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: Properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154–178). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 39, 1-8.
- Appel, M. (1987). Canine adenovirus type 1 (infectious canine hepatitis virus). *Virus infections of carnivores*, 29-43.
- Babaei, H., Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R., & Namjoo, A. (2010). Serological evidence of canine herpesvirus-1 in dogs of Kerman City, south-east of Iran. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(5), 348–351.
- Barbosa, C. C., Souza, M. B., Scalercio, S. R., Silva, T. F., Domingues, S. F., & Silva, L. D. (2013). Ovarian and uterine periovulatory Doppler ultrasonography in bitches. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 1144-1150.
- Barreto CS, Prestes CN. (2004), "Immunity and Canine Neonatal Nutrition", *Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*, 2, 57-60;
- Brumitt, J. W., Cohn, L. A., & Essman, S. C. (2005). What Is Your Diagnosis ? History An 8- week-old sexually intact male Miniature Schnauzer was referred for dyspnea and abdominal distention of 1 day duration. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(1), 47–48.
- Buonavoglia, C., & Martella, V. (2007). Canine respiratory viruses. *Veterinary research*, 38(2), 355-373.
- Burr, P. D., Campbell, M. E. M., Nicolson, L., & Onions, D. E. (1996). Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 53(3–4), 227–237.
- Capuzzi J. (2000), "Symposia for Breeders & Owners - Article 9", 30th Annual Canine Symposium, 11-17;
- Carmichael, L. E. (1999). Neonatal pup diseases. Current status of canine herpesvirus (CHV) and minute virus of canines (MVC, canine parvovirus-type 1, CPV-1). Recent advances in canine infectious diseases. *International Veterinary Information Service: Ithaka*.

Carmichael, L. E. (2004). Recent Advances in Canine Infectious Diseases. In L. E. Carmichael (Ed.), Neonatal Viral Infections of Pups: Canine Herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus-1). International Veterinary Information Service.

Chotimanukul, S., & Sirivaidyapong, S. (2011). Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. *Theriogenology*, 76(6), 1152-1161.

Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 200-210.

Costa, M., Mateus, L., Duarte, A., Tavares, L., & Fabrica, P. (2014). Estudo serológico de herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) em canis da região de Lisboa e Vale do Tejo. In VI Congresso de Ciências Veterinárias (p. 82). Oeiras: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias.

Dahlbom, M., Johnsson, M., Myllys, V., Taponen, J., & Andersson, M. (2009). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1), 128–131.

Davidson AP, Feldman EC. Alterações ovarianas e do ciclo estral [Ovarian and estrous cycle changes]. In: Ettinger S, Feldman E, editors. Tratado de Medicina Interna Veterinária V. [Veterinary Internal Medicine V]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004, vol. 02, pp. 1602–09.

Davidson, A.P., Baker, T.W., (2009). Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top. Comp. Anim. Med.* 24, 55–63

Decaro, N., Amorisco, F., Desario, C., Lorusso, E., Camero, M., Bellacicco, A. L., & Buonavoglia, C. (2010). Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 169(1), 176–180.

Decaro, N., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2008). Canine adenoviruses and herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 799-814.

Dias, M. A. (2018). *Análise Molecular e Serológica de Herpesvírus Canino, chv-1, em Canideos de Canis da Região de Lisboa e Vale do Tejo e do Distrito de Coimbra* (Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa (Portugal)).

Djønne, B. (2007). Infections and perinatal diseases—a comparative overview. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 1-6.

Dubovi, E. J. & J. N. Maclachlan (2010): Fenner's Veterinary Virology. 4 ed. Elsevier Inc, Boston, pp. 179 – 195.

El-Mayet, F. S., Toomer, G., Ostler, J. B., Harrison, K. S., Santos, V. C., Wijesekera, N., ... & Jones, C. (2022). Progesterone Sporadically Induces Reactivation from Latency in Female Calves but Proficiently Stimulates Bovine Herpesvirus 1 Productive Infection. *Journal of Virology*, 96(5), e02130-21.

Engels, M., Mayr-Bibrack, B., Ruckstuhl, B., Metzler, A., & Wyler, R. (1980). The sero-epizootiology of canine herpes virus infections in Switzerland and preliminary studies with a vaccine. *Zentralblatt fuer Veterinaermedizin. Reihe B (Germany, FR)*.

England, G. C. W., & Heimendahl, A. von. (2010). *Bsava Manual of Small Animal Reproduction & Neonatology*. (G. C. W. England & A. von Heimendahl, Eds.) (2nd ed.). Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association.

England, G. C., & Allen, W. E. (1989). Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 39, 91-100.

Erles, K., Dubovi, E. J., Brooks, H. W., & Brownlie, J. (2004). Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4524–4529.

Evans, H. M. (1931). An introduction to the study of the oestrus cycle in the dog. *Mem. Univ. Calif.*, 9, 65-103.

Evermann, J. F., Ledbetter, E. C., & Maes, R. K. (2011). Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 41(6), 1097-1120.

Evermann, J. F., McKeirnan, A. J., Ott, R. L., & Reed, L. A. (1982). Diarrheal condition in dogs associated with viruses antigenically related to feline herpesvirus. *The Cornell Veterinarian*, 72(3), 285–91.

Feldman, E.C. and Nelson, R.W., (2004a). Cystic endometrial hyperplasia/ pyometra complex. In: Kersey R, editor

Feyen, B., Van Soom, A., Nauwynck, H., Devriese, L. A., Decostere, A., Catry, B., & De Kruif, A. (2004). The vaginal microflora and canine herpesvirus 1 antibody titers throughout the estrous cycle of breeding bitches. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 73(4), 260–268.

Fontbonne, A. (2011). L'herpès-virose canine. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 164(4), 331-340.

Forsberg, C. L. (2010). Pregnancy diagnosis, normal pregnancy and parturition in the bitch. In *BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology* (pp. 89-97). BSAVA Library.

Franco, A.C.; Roehe, P.M.; Varela, A.P.M. (2012). Herpesviridae. In: FLORES, E.F. *Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas*. 2ed. Santa Maria. Editora UFSM, p. 503-570.

Gadsden, B. J., Maes, R. K., Wise, a. G., Kiupel, M., & Langohr, I. M. (2012). Fatal Canid herpesvirus 1 infection in an adult dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3), 604–607.

German, A. J., Holden, S. L., Morris, P. J., & Biourge, V. (2010). Comparison of a bioimpedance monitor with dual-energy x-ray absorptiometry for noninvasive estimation of percentage body fat in dogs. *American journal of veterinary research*, 71(4), 393-398.

Golińska, E., Sowińska, N., Tomusiak-Plebanek, A., Szydło, M., Witka, N., Lenarczyk, J., & Strus, M. (2021). The vaginal microflora changes in various stages of the estrous cycle of healthy female dogs and the ones with genital tract infections. *BMC veterinary research*, 17, 1-8.

Góngora A., V., Sandoval Ch., N., & Manchego S., A. (2007). Evidencia serológica de la presencia del virus herpes canino tipo 1 en la provincia de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, (July), 154–157.

Greco, D. S., & Davidson, A. P. (Eds.). (2017). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Small Animal Endocrinology and Reproduction*. John Wiley & Sons.

Greene C (2012). *Infectious diseases of the dog and cat* (4). Elsevier: 48-54.

Griffin, B. D., Verweij, M. C., & Wiertz, E. J. (2010). Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Veterinary microbiology*, 143(1), 89-100.

Groppetti D, Pecile A, Arrighi S, Di Giancamillo A, Cremonesi F (2010). Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: a useful tool for reproductive diagnosis in the bitch. *Therio*. 73: 927-941.

Grundy, S. A., Feldman, E., & Davidson, A. (2002). Evaluation of infertility in the bitch. *Clinical techniques in small animal practice*, 17(3), 108-115.

Hashimoto, A., Hirai, K., Fukushi, H., & Fujimoto, Y. (1983). The vaginal lesions of a bitch with a history of canine herpesvirus infection. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 45(1), 123–126.

- Hashimoto, A., Hirai, K., Yamaguchi, T., & Fujimoto, Y. (1982). Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 43(5), 844–50.
- Helliwell, R. J., Adams, L. F., & Mitchell, M. D. (2004). Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(2), 101-113.
- Hofmann-Sieber, H., Wild, J., Fiedler, N., Tischler, K., Von Einem, J., Osterrieder, N., ... & Wagner, R. (2010). Impact of ETIF deletion on safety and immunogenicity of equine herpesvirus type 1-vectored vaccines. *Journal of virology*, 84(22), 11602-11613.
- Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., & Olson, P. S. (2001). Canine and feline theriogenology. Saunders.
- Jones, C., Geiser, V., Henderson, G., Jiang, Y., Meyer, F., Perez, S., & Zhang, Y. (2006). Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Veterinary Microbiology*, 113(3-4), 199-210.
- Kawakami K, Ogawa H, Maeda K, Imai A, Ohashi E, Matsunaga S, Tohya Y, Ohsima T, Mochizuki M (2010). Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. *Journal of clinical microbiology*. 48: 1176 - 1181.
- Kim, J. H., Park, C. H., Mun, B. G., Kim, H. S., Kim, B. S., Lee, J. H., ... & Son, C. H. (2009). Serial ultrasonographic appearance of normal uterus during estrous cycle in miniature schnauzer dogs. *Journal of Embryo Transfer*, 24(2), 109-113.
- Krogenaes A, Rootwelt V, Larsen S, Sjøberg E, Akselsen B, Skård T, Myhre S, Renstrøm L, Klingeborn B, Lund A (2012). A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population. *Theriogenology*. 78: 153-158.
- Krogenæs, A., Rootwelt, V., Larsen, S., Renstrøm, L., Farstad, W., & Lund, A. (2014). A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 19.
- Kumar, S., Driskell, E. A., Cooley, A. J., Jia, K., Blackmon, S., Wan, X.-F., ... Hogan, R. J. (2014). Fatal Canid Herpesvirus 1 Respiratory Infections in 4 Clinically Healthy Adult Dogs. *Veterinary Pathology*, 52(4), 681–687.
- Kustritz, M. V. R. (2007). Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(11), 1665-1675.
- Lara, E. G. V., Solis, J. I. Á., Verde, C. C., Crespo, J. A. M., Marín, L. C., García, J. C. D. R., & Anda, G. V. (2016). Canine Herpesvirus Seroprevalence and Associated Factors in Dogs of Mexico. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6(10), 149–162.

- Larsen, R. W., Kiupel, M., Balzer, H.-J., & Agerholm, J. S. (2015). Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 1.
- Ledbetter E (2013). Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *New Zealand Veterinary Journal*. 61: 193-201.
- Ledbetter E, Kim S, Dubovi E, Bicalho R (2009). Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. 138: 98-105.
- Ledbetter, E. C., da Silva, E. C., Kim, S. G., Dubovi, E. J., & Schwark, W. S. (2012). Frequency of spontaneous canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding in latently infected dogs and canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding induced by topical administration of cyclosporine and systemic administration of. *American Journal of Veterinary Research*, 73(7), 1079–1084.
- Ledbetter, E. C., Kim, S. G., & Dubovi, E. J. (2009). Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. *Veterinary Ophthalmology*, 12(4), 242–247.
- Ledbetter, E. C., Riis, R. C., Kern, T. J., Haley, N. J., & Schatzberg, S. J. (2006). Corneal ulceration associated with naturally occurring canine herpesvirus-1 infection in two adult dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(3), 376–84.
- Lee, H., Hong, S., Lee, Y., Kim, D., Kwon, H., Lee, C., & Kim, O. (2014). Effects of cold stress as a pathogenic factor on fatal disease progression of canine herpesvirus, 15(3), 100– 106.
- Lévy, X., & Fontbonne, A. (2007). Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), 128-134.
- Levy, X., (2016). Videovaginoscopy of the canine vagina. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 31–36. <https://doi.org/10.1111/rda.12785>.
- Ligier, B. (2012). Contribution a l'élaboration d'un compte rendu type de visite d'élevage canin pour les vétérinaires en exercice. *École Nationale Vétérinaire d'Alfort*.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., & Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta tropica*, 116(3), 193-199.
- Malone, E. K., Ledbetter, E. C., Rassnick, K. M., Kim, S. G., & Russell, D. (2010). Disseminated canine herpesvirus-1 infection in an immunocompromised adult dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 965–968.

Mila, H., Feugier, A., Grellet, A., Anne, J., Gonnier, M., Martin, M., ... & Chastant-Maillard, S. (2014). Inadequate passive immune transfer in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Preventive veterinary medicine*, 116(1-2), 209-213.

Mila, H., Grellet, A., Delebarre, M., Mariani, C., Feugier, A., & Chastant-Maillard, S. (2017). Monitoring of the newborn dog and prediction of neonatal mortality. *Preventive Veterinary Medicine*, 143, 11-20.

Milman, G., Smith, K. C., & Erles, K. (2011). Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Veterinary microbiology*, 150(1-2), 15-20.

Mir, F., Fontaine, E., Albaric, O., Greer, M., Vannier, F., Schlafer, D. H., & Fontbonne, A. (2013). Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. *Theriogenology*, 79(2), 312-322.

Miranda, S., Carolino, N., Vilhena, H., Payan-Carreira, R., & Pereira, R. M. L. N. (2018). Early embryo development, number, quality, and location and the relationship with plasma progesterone in dogs. *Animal reproduction science*, 198, 238-245.

Miyoshi, M., Ishii, Y., Takiguchi, M., Takada, A., Yasuda, J., Hashimoto, A., & Kida, H. (1999). Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 61(4), 375-379.

Morresey P (2003). Infectious diseases of the reproductive tract of the bitch. In: Butterworth-Heinemann. *Small animal theriogenology* 195-200.

Morresey P (2004). Reproductive Effects of Canine Herpesvirus, pp. 804-811.

Moxon, R., Batty, H., Irons, G., England, G.C.W., 2012. Periovarian changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch. *Theriogenology* 78, 1907-1916. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.002>.

Nemoto, K., Horimoto, T., Xuan, X. N., Kusanagi, K., Takumi, A., Tohya, Y., & Mikami, T. (1990). Demonstration of canine herpesvirus-specific hemagglutination. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(2), 395-8. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161479>

Nicklin, A. M., McEntee, M. C., & Ledbetter, E. C. (2014). Effects of ocular surface strontium-90 beta radiotherapy in dogs latently infected with canine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, 174(3-4), 433-437.

Noakes DE, Dhaliwal GK, England GC (2001). Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 395-406.

Nothling J, Hussy D, Steckler D, Ackermann M (2008). Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the gauteng province of south africa. *Theriogenology*. 69: 276 - 282.

O'Brien, R., & Barr, F. (2009). *BSAVA manual of canine and feline abdominal imaging*, 1st ed.. Quedgeley, Gl: British Small Animal Veterinary Association

Okkens, A.C., Kooistra, H.S., 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 291–296.

Okuda, Y., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Mori, S., Tani, M., ... Carmichael, L. (1993). Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *The Cornell Veterinarian*, 83(4), 291–302. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306652>

Oliveira, E. C. S., Marques, A. P., & Neves, M. M. (2003). Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela-revisão. *Archives of Veterinary Science*, 8(1).

Oliveira, E. C., Sonne, L., Bezerra Júnior, P. S., Teixeira, E. M., Dezengrini, R., Pavarini, S. P., ... & Driemeier, D. (2009). Achados clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 637-642.

Parzefall, B. (2010). *PCR-based investigation of the presence of herpesvirus in the peripheral vestibular system in cats and dogs* (Doctoral dissertation, lmu).

Parzefall, B., Fischer, A., Blutke, A., Schmahl, W., & Matiassek, K. (2011). Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *The Veterinary Journal*, 189(1), 100-102.

Percy, D. H., Carmichael, L. E., Albert, D. M., King, J. M., & Jonas, A. M. (1971). Lesions in Puppies Surviving Infection with Canine Herpesvirus. *Veterinary Pathology Online*, 8(1), 37–53.

Pérez-Rivero, J. J., Martínez-Maya, J. J., Pérez-Martínez, M., Aguilar-Setién, Á., & Serrano, H. (2009). Effect of coumestrol on sperm production and smell exploratory behavior in dogs stimulated with vaginal mucus. *Veterinaria México*, 40(1), 9-16.

Po-yin, Chu, Wright, P.J., Lee, C.S., 2006. Apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Reprod. Fertil. Devel.* 14, 297–305.

Pratelli, A., Colao, V., & Losurdo, M. (2014). Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders. *Veterinary Journal*, 200(2), 257–260.

Reading, M. J., & Field, H. J. (1998). A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Archives of virology*, 143, 1477-1488.

- Reagan, K. L., & Sykes, J. E. (2020). Canine infectious respiratory disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 50(2), 405-418.
- Rocca, B., & FitzGerald, G. A. (2002). Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *International immunopharmacology*, 2(5), 603-630.
- Rock, D., Lokensgard, J., Lewis, T., & Kutish, G. (1992). Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *Journal of virology*, 66(4), 2484-2490.
- Ronsse V, Poulet H, Verstegen J, Thiry E (2003). L'herpésvirose canine. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 147: 65-76
- Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H (2004). Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*. 61: 619-636.
- Ronsse, V., Verstegen, J., Onclin, K., Guiot, A. L., Aeberlé, C., Nauwynck, H. J., & Poulet, H. (2002). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reproduction in domestic animals*, 37(5), 299-304.
- Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberlé C, Brunet S, Poulet H (2005). Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*. 64: 61-74.
- Rootwelt V, Lund A, Krogenaes A (2011). Herpes virus infection in the dog – a review. *European Journal of Companion Animal Practice*. 21: 31-36.
- Rota, P. A., & Maes, R. K. (1990). Homology between feline herpesvirus-1 and canine herpesvirus. *Archives of virology*, 115, 139-145.
- Santos, N. R., Beck, A., Blondel, T., Maenhoudt, C., & Fontbonne, A. (2020). Influence of dog-appeasing pheromone on canine maternal behaviour during the peripartum and neonatal periods. *Veterinary Record*, 186(14), 449-449.
- Schaefer-Okkens AC. (2005). Estrous cycle and breeding management of the healthy bitch. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat*. Ettinger SJ,
- Feldman EC (Eds). Saunders Philadelphia, 6th ed, 2005, pp. 1640-1649
- Schlafer, D. H., & Foster, R. A. (2016). Female genital system. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3*, 358.
- Seo, I. B., Seong, W. W., & Lim, C. H. (1994). Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, 34(3), 647-652.

Silva, E., Leitao, S., Ferreira-Dias, G., Lopes da Costa, L., & Mateus, L. (2009). Prostaglandin synthesis genes are differentially transcribed in normal and pyometra endometria of bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 200-203.

Sonne, L. (2009). Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus, (August).

Spertus, C. B., Mohammed, H. O., & Ledbetter, E. C. (2016). Effects of topical ocular application of 1% trifluridine ophthalmic solution in dogs with experimentally induced recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection. *American Journal of Veterinary Research*, 77(10), 1140–7.

Stoffel, M. H., Friess, A. E., & Hartmann, S. H. (2000). Ultrastructural evidence of transplacental transport of immunoglobulin G in bitches. *Reproduction*, 118(2), 315-326.

Ström Holst, B., Hagberg Gustavsson, M., Grapperon-Mathis, M., Lilliehöök, I., Johannisson, A., Isaksson, M., ... & Axné, E. (2012). Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 362-365.

Sykes, J. E. (2014). Pediatric feline upper respiratory disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 44(2), 331-342.

Tanaka, T., Nakatani, S., Xuan, X., Kumura, H., Igarashi, I., & Shimazaki, K. I. (2003). Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antiviral Research*, 60(3), 193–199.

Torres, L., Ortiz, T., & Tang, Q. (2015). Enhancement of herpes simplex virus (HSV) infection by seminal plasma and semen amyloids implicates a new target for the prevention of HSV infection. *Viruses*, 7(4), 2057-2073.

United States Patent Application Publication (2016). Sanjay Kapil. METHODS AND DEVICES FOR CANINE HERPESVIRUS 1 (CHV-1) DETECTION AND PREVENTION. (US20160051663 A1, 2016).

Van Gucht, S., Nauwynck, H., & Pensaert, M. (2001). Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 70(3), 204–211.

Watts, J. R., Wright, P. J., & Whithear, K. C. (1996). Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *Journal of small animal practice*, 37(2), 54-60.

Wiebe, V. J. (2015). *Drug therapy for infectious diseases of the dog and cat*. John Wiley & Sons.

Wilborn, R.R., Maxwell, H.S., (2012). Clinical approaches to infertility in the bitch. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 42, 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.016>.

Yesilbag K, Yalçın E, Tuncer P, Yılmaz Z (2012). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Research in Veterinary Science*. 92: 36 - 39.

Zubair, M., Rehman, U., & Sajid, S. M. (2014). Causes of infertility in bitch. *Adv Anim Vet Sci*, 2(10), 565-573.

7. Apêndices

Apêndice A – Ficha de registo individual preenchida pelos tutores

Ficha de registo individual

Data da consulta: _____

Nome do animal: _____ Número de identificação: _____

Data de nascimento: _____

Nome proprietário: _____

Motivo consulta:

Cio ____ Anestro ____ Controlo de Gestação ____ Pós-inseminação ____

Pseudogestação ____ Esterilizada ____ Pós-cesariana ____ Internamento ____

Condição corporal (1-9): _____

Número de partos precedentes: _____

Datas dos partos: _____; _____; _____; _____

Episódios de distócia? Sim ____ Não ____

Nº partos naturais: ____

Nº cesarianas: ____ Eletiva ____ Urgência ____

Tem a vacina do herpesvírus? Sim ____ Não ____

Nas gestações que teve, o tipo de inseminação foi:

Monta natural ____ Inseminação artificial ____

Tem história de infertilidade? Sim ____ Não ____

Se SIM qual o motivo?

Ficou vazia? Sim ____ Não ____

Teve abortos? Sim ____ Não ____

Teve nados-mortos? Sim ____ Não ____

Teve reabsorções? Sim ____ Não ____

Houve mortalidade neonatal (até 21d)? Sim ____ Não ____

Outro: _____

Já teve patologias genitais? (incluindo mastites e ITU) Sim ____ Não ____

Quais: _____

Tem alguma doença sistémica? Sim ____ Não ____

Quais: _____

Tratamentos anteriores (nos últimos 3m)

Alguma vez tomou a pilula anticoncepcional? Sim ____ Não ____

Frequência interéstrica < 5m ____ 5-7m ____ > 7m ____

É criador? Sim ____ Não ____

Caso seja criador:

Realiza regularmente despiste para agentes infecciosos na cadela?

Sim ____ Não ____

Se SIM, quais os agentes que testa? _____

O macho com quem cruzou realiza regularmente despiste para agentes infecciosos?

Sim ____ Não ____ Não sei ____

Se SIM, quais os agentes que testa? _____

Para o Médico Veterinário/estagiário preencher no momento da citologia vaginal:

Aspetto macroscópico da vulva:

Normal ____ Edemaciada ____ Hiperémica ____

Presença de corrimento? Sim ____ Não ____

Se SIM qual a cor?

Amarelado_____

Esbranquiçado_____

Avermelhado_____

Realizou-se medição da progesterona?

Sim ____

Não ____

Resultado: _____

Fase do ciclo em que se encontra (preencher após coloração da citologia)

Apêndice B – Póster apresentado no congresso do CIISA, nos dias 11 e 12 de Novembro de 2022.









MOLECULAR DETECTION OF CANINE HERPESVIRUS IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF THE BITCH IN DIFFERENT STAGES OF THE ESTROUS CYCLE

Francisca Figueiredo¹; Paulo Borges^{1,2}; Ana Sousa Lopes¹; Ana Amaral^{1,3,5}; Margarida Alves^{1,4}

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Lusófona University, Lisbon
² CRVA – Anicura Atlântico Veterinary Reproduction Centre – Anicura Atlântico Veterinary Hospital, Mafra
³ CIISA – Centre of Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon University, Lisbon
⁴ CBIOIS – Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lusófona University, Lisbon
⁵ AL4AnimalS – Associate Laboratory for Animal and Veterinary Sciences, Portugal

Introduction

- Canine herpesvirus type 1 (CHV-1) is widely spread among dogs, with a world distribution ranging from 6% and 100%, mainly found in breeding kennels [3,4].
- In adult animals, infection ranges from asymptomatic to mild illness with genital, respiratory and ocular clinical signs [2].
- CHV-1 infection is considered to be a major cause of infertility, reproductive disorders and neonatal mortality [2]. In a large part of the adult canine population, infection remains latent and can be reactivated during stressful events [1,2,3].
- The correlation between shedding of the virus and the estrous cycle phase is still unknown.

Aims of the study

- 1) Molecular detection of CHV-1, by real-time PCR, in the different phases of the estrous cycle;
- 2) Correlation of CHV-1 incidence with the reproductive history of bitches and risk factors;
- 3) Correlation of CHV-1 incidence with the follicular phase.

Material and Methods



SEPTEMBER 2021,
APRIL 2022

Collection of samples at the Anicura Atlântico Veterinary Reproduction Center

Samples were collected from 60 bitches, presented to the reproduction consultation at Anicura Atlântico Veterinary Reproduction Centre.

Procedures for each animal:

- ✓ Determination of the estrous cycle phase (by vaginal cytology, progesterone measurement and macroscopic evaluation of the vulva);
- ✓ Vaginal swab for real-time PCR;
- ✓ A form filled by the owners about the bitches' health and reproductive history.



APRIL 2022
JULY 2022

Real-time PCR at FMV-ULusófona laboratory



Results

- Real-time PCR for CHV-1 DNA was positive for 2 of the 60 samples (3,3%).
- Sequences obtained by Sanger sequencing: BLAST analysis revealed a 98,99% percentage of identity with various CHV-1 strains.
- Positive samples were both from adult animals in estrus, belonging to two different breeding kennels.
- One of the bitches had history of infertility.

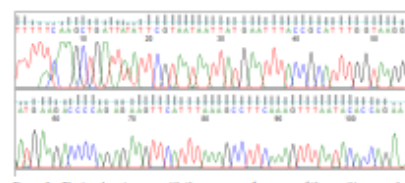
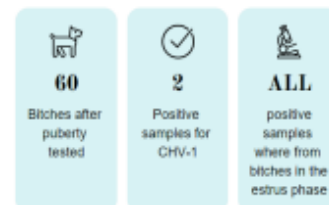


Figure 1 – Electropherogram with the sequence from one of the positive samples.

Discussion and Conclusion

- Besides the frequency of infection being low, the association of CHV-1 infection in animals with reproductive disorders should be assessed;
- Both positive results were from bitches in the estrous phase, corresponding with the follicular phase;
- The follicular phase seems to be associated with virus reactivation, which may impair ulterior fertility;
- Risk factors such as age, kennel dimensions and lack of vaccination against CHV-1 during pregnancy may be associated with a higher incidence of infection;
- Further studies are needed to understand CHV-1 re-activation throughout the estrous cycle.

This work was approved by the Ethics Committee of FMV-ULusófona.

Acknowledgements This work was supported by Lusófona University (Bolsas de Estágio FMV, 2021/2022)

References [1] Fontbonne, A. (2011). L'herpesvirus canin. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 164(4), 331-340. [2] Evermann, J. F., Ledbetter, E. C., & Moss, R. K. (2011). Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 41(6), 1087-1105. [3] Greene, C. E. (2012). Infectious disease of the dog and cat, 4th Ed. Athens. [4] Ledbetter, E. (2013). Canine herpesvirus-1 ocular disease of mature dogs. *New Zealand Veterinary Journal*, 61, 100-05.