



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SEROLÓGICO DE
HERPESVÍRUS CANINO EM CÃES DE CANIS DE
REPRODUÇÃO NA REGIÃO METROPOLITANA DE LISBOA
E VALE DO TEJO**

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professora Doutora Maria Margarida Ferreira Alves

Sofia Nunes dos Santos, n.º 21804139

2025

www.lusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E SEROLÓGICO DE
HERPESVÍRUS CANINO EM CÃES DE CANIS DE
REPRODUÇÃO NA REGIÃO METROPOLITANA DE LISBOA
E VALE DO TEJO**

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 02/04/2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 229/2025, de 6 de março, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor David Ramilo;

Arguente: Professora Doutora Mariana Raposo Batista (FMV-ULusófona);

Orientadora: Doutora Maria Margarida Ferreira Alves.

Sofia Nunes dos Santos, n.º 21804139

2025

www.ulusofona.pt

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Margarida Alves pela orientação durante a redação desta dissertação de mestrado e durante toda a parte experimental da mesma. Por todo o carinho e dedicação que demonstra por todos os seus alunos e por me ter acompanhado desde o primeiro dia neste curso até ao último. Obrigada pelos conhecimentos que me passou e por me lembrar o quanto eu gosto de trabalhar em laboratório e em investigação. Foi um prazer poder trabalhar consigo e acompanhar de perto o peso que tem na formação de futuros médicos veterinários.

Ao Professor Paulo Borges pela ajuda na recolha de informação durante a realização deste trabalho e acompanhamento no Congresso Internacional Veterinário Montenegro.

Ao Professor Doutor David Ramilo pelo acompanhamento na realização da parte estatística deste trabalho e pela companhia e boa disposição durante o meu estágio.

À Professora Doutora Mariana Batista por ter estado disponível para ajudar com as dúvidas que surgiram durante a parte experimental, sempre com a sua positividade.

À professora Doutora Adriana Belas que me permitiu acesso ao seu laboratório e a todos os professores que trabalham no CBIOS que me deixaram utilizar o seu espaço.

Deixo um obrigada a todos os professores que fizeram parte do meu percurso académico e que moldaram o meu futuro. Ao professores do Laboratório de Análises Clínicas e Histopatológicas da Faculdade de Medicina Veterinária um obrigada especial pelo acompanhamento e bom humor constante.

Quero ainda agradecer à Francisca Figueiredo pela recolha das amostras que possibilitaram a realização deste trabalho e pela ajuda e disponibilidade para responder a todas as questões. E aos criadores e os seus animais que permitiram a realização deste estudo.

Agradeço à minha família, aos meus pais por ter apoiado a minha decisão de mudar de curso e por terem tornado este sonho realidade, à minha irmã, que está a percorrer o mesmo percurso que eu, por me ter ouvido durante estes anos. Aos meus avós, por todo o incentivo e orgulho que me fazem sentir. A todos os meus primos pelas palavras de carinho e motivação.

Agradeço ainda aos amigos que este curso me deu. Aos “Smurfs” por todas as gargalhadas e por me incluírem no vosso grupo de amigos quando eu mais precisava. À Inês Barbosa, a minha “irmã” de curso, à Luana Pires a minha companheira de manhãs de saídas, à Cátia Sepol a nossa “mãe” da faculdade. Também à Carolina Oliveira por todos os resumos e

pela companhia no laboratório e à Márcia Penedo pelo seu humor característico e ombro amigo. À Madalena Bastos pelos dias de estudo, por todas as horas de companhia e de leitura da minha tese e pelo seu coração gigante. À Joana Carona, Juliana Amantéa e Guilherme Godinho, pela companhia e apoio, principalmente nesta última fase. E à Sara Nunes, a primeira pessoa a dizer-me que “este curso não se faz sozinho”.

Agradeço ainda à Carolina Guerra e Inês amaral, as minhas amigas de longa data, que me apoiaram e motivaram durante todos estes anos e que compreenderem a minha ausência durante todas as pausas pedagógicas. Obrigada por serem uma constante na minha vida e por estarem comigo nos momentos mais importantes.

Um agradecimento especial ao Afonso Grossinho, pelo apoio incondicional e por fazer este percurso comigo. Um obrigada não chega para agradecer todas as horas e noites de estudo que passou comigo, por todos os conselhos e por toda a motivação que me deu. Agradeço-lhe por nunca me ter deixado desistir deste sonho.

Por fim, agradeço aos meus cães, Baunilha e Nero que foram a razão por eu ter entrado neste curso, e ao Pantufa e à Nina, a minha motivação para continuar a estudar e ser a minha melhor versão na área de medicina veterinária.

Resumo

O HVC-1 é um vírus com distribuição mundial, conhecido por causar problemas de infertilidade, distúrbios reprodutivos e mortalidade neonatal em cães. Na Europa, vários estudos indicam uma alta prevalência de anticorpos anti-HVC-1 em cães domésticos, com uma incidência mais elevada em animais pertencentes a canis de reprodução. No entanto, sobre este assunto, poucos foram os estudos realizados em Portugal.

O presente trabalho teve como objetivos realizar o diagnóstico molecular de HVC-1 em cães de quatro canis de reprodução, na Região Metropolitana de Lisboa e Vale do Tejo, comparar a excreção do vírus a nível ocular, nasal e genital, e avaliar a seroprevalência de anticorpos IgG anti-HVC-1 nestas coletividades. Durante o mês de Agosto de 2022, realizou-se a recolha de zaragatoas oculares (n=40), nasais (n=39), vaginais (n=28) e prepuciais (n=12), em 40 cães (28 fêmeas, 12 machos), pertencentes a 4 canis de reprodução. A presença de infeção por HVC-1 foi avaliada através de PCR convencional, com *primers* específicos para amplificação do gene da glicoproteína B. A partir de amostras de soro, foi realizado um teste de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-HVC-1.

De entre os 40 animais testados, em 35 foi amplificado DNA de HVC-1 (77,50%), com resultados positivos em todas as localizações anatómicas analisadas, embora se tenha verificado uma maior frequência de positividade nas zaragatoas vaginais (64,29%) e prepuciais (41,67%). Foram encontradas frequências de infeção de 55,56%, 73,33%, 87,50% e 100% nos quatro canis em estudo. A população estudada apresentou uma seroprevalência de anticorpos IgG anti-HVC-1 de 100%, demonstrando que todos os animais, à exceção de um que se encontrava vacinado, tiveram contacto prévio com o vírus; 27,5% (11/40) dos animais apresentavam títulos de anticorpos considerados elevados.

Os resultados alcançados evidenciam a presença ubíqua de HVC-1 nas coletividades em estudo, destacando a importância do manejo adequado dos animais e a necessidade de implementar medidas de prevenção da transmissão do vírus nestes locais. O presente trabalho vem, assim, contribuir para uma compreensão mais aprofundada sobre a epidemiologia e dinâmica de transmissão do HVC-1 em Portugal.

Palavras-chave: Herpesvírus Canino tipo 1; diagnóstico molecular; PCR; diagnóstico serológico; canis de reprodução

Abstract

HVC-1 is a virus with a worldwide distribution, known to cause infertility problems, reproductive disorders, and neonatal mortality in dogs. In Europe, several studies indicate a high prevalence of anti-HVC-1 antibodies in domestic dogs, with a higher incidence in animals belonging to breeding kennels. Yet, in Portugal, only a few studies have been conducted on this subject.

This study aimed to perform the molecular diagnosis of HCV-1 in dogs from four breeding kennels in the Lisbon and Tagus Valley Metropolitan Region, to compare virus excretion at ocular, nasal and genital level, and to assess the seroprevalence of anti-HCV-1 IgG antibodies in these communities. During the month of August 2022, sample collection was made and ocular (n=40), nasal (n=39), vaginal (n=28) and preputial (n=12) swabs were collected from 40 dogs (28 females, 12 males) belonging to four breeding kennels. The presence of HCV-1 infection was assessed by conventional PCR with specific primers to amplify the glycoprotein B gene. An ELISA test was carried out on serum samples to detect HCV-1 IgG antibodies.

Of the 40 animals tested, 35 were positive for the HVC-1 PCR (77,50%), with positive results identified in all anatomical locations analyzed, although a higher frequency of positive results was observed in vaginal (64,29%) and preputial swabs (41,67%). Infection frequencies of 55,56%, 73,33%, 87,50%, and 100% were found in the four kennels studied. The studied population showed a seroprevalence of anti-HVC-1 IgG antibodies of 100%, indicating that all animals, except for one that was vaccinated, had prior contact with the virus; 27,5% (11/40) of the animals had high antibody titers.

The obtained results highlight the ubiquitous presence of HVC-1 in the studied populations, emphasizing the importance of proper animal management and the need to implement preventive measures to control the virus transmission in these locations. This study provides valuable insights to a better understanding of the epidemiology and transmission dynamics of HVC-1 in Portugal.

Keywords: Canine Herpesvirus Type 1; molecular diagnosis; PCR; serological diagnosis; breeding kennels

Abreviaturas, siglas e símbolos

% - Percentagem

> - Maior que

< - Menor que

± - Mais ou menos

≥ - Superior ou igual

® - Marca registada

Ac - Anticorpos

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

CIRD - Doença Respiratória Infeciosa Canina, do inglês "Canine Infectious Respiratory Disease"

cm - Centímetros

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

dNTPs - Desoxirribonucleósidos Trifosfato, do inglês "Deoxyribonucleoside Triphosphate"

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

EMA - Agência Europeia de Medicamentos, do inglês “European Medicines Agency”

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

FMV-ULusófona - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona

Fw - Primer Forward

g - Grama

g - Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

H - Horas

HRPO - Peroxidase de Raiz Forte, do inglês "Horseradish Peroxidase"

HVC-1 - Herpevírus canino tipo 1

HVF - Herpevírus felino

IBM - International Business Machines Corporation

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

m/v - Rácio massa:volume

MDCK - Células Madin Darby de rim canino, do inglês "Madin-darby canine kidney cells"

mg - Miligramas

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

ml - Mililitros

mm - Milímetros

MPM - marcador de peso moleculares

ng - Nanograma

nm - Nanometro

°C - Graus Celsius

p - Significância

P4 - Progesterona

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

pH - Potencial de Hidrogénio

pmol - picomole

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

Rev - Primer Reverse

RMLVT - Região Metropolitana de Lisboa e Vale do Tejo

qPCR - PCR Quantitativo em Tempo Real, do inglês " Quantitative PCR"

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

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

TBE - Tampão Tris-borato EDTA

U - unidade

ULusófona - Universidade Lusófona

μl - Microlitro

β-actina - Beta-actina

Índice

I. Casuística do Estágio	13
II. Diagnostico molecular e serológico de herpesvírus canino em cães de canis de reprodução na Região Metropolitana de Lisboa e Vale do Tejo.....	14
1. Introdução	14
1.1. Agente etiológico	14
1.2. Epidemiologia	15
1.3. Transmissão viral	15
1.4. Patogenia e apresentação clínica.....	16
1.4.1. Patogénese.....	16
1.4.1.1. Imunologia e latência viral	17
1.4.1.2. Fatores de risco	18
1.4.2. Apresentação clínica	19
1.4.2.1. Apresentação clínica em neonatos.....	19
1.4.2.2. Infecção reprodutiva.....	20
1.4.2.3. Infecção respiratória	21
1.4.2.4. Infecção ocular	22
1.5. Diagnóstico de HVC-1	23
1.5.1. Achados de necropsia e histopatológicos.....	24
1.5.2. Isolamento viral de HVC-1	24
1.5.3. Técnicas moleculares	25
1.5.4. Técnicas Serológicas	26
1.6. Tratamento	26
1.7. Profilaxia	27
1.7.1. Stress, condições ambientais e de higiene.....	28
1.7.2. Colostro	28
1.7.3. Vacinação	29
1.8. Prognóstico	29
1.9. Objetivos	31
2. Material e Métodos	32
2.1. Recolha e conservação das amostras	32
2.2. Análise molecular	33
2.2.1. Extração do DNA	33
2.2.2. Quantificação do DNA isolado	34
2.2.3. Avaliação da qualidade do DNA isolado.....	35

2.2.4. Electroforese em gel de agarose.....	36
2.2.5. Detecção de HCV-1 através de PCR Convencional.....	37
2.2.6. Purificação e Sequenciação dos produtos de PCR.....	38
2.3. Análise Serológica	39
2.3.1. Detecção de IgG anti-HVC-1 por ELISA indireta	39
2.4. Análise estatística.....	40
3. Resultados.....	42
3.1. Caracterização da população estudada.....	42
3.2. Análise Molecular	46
3.2.1. Quantificação do DNA isolado	46
3.2.2. Qualidade do DNA isolado	47
3.2.3. Amplificação de HVC-1 por PCR convencional	49
3.2.4. Sequenciação	51
3.3. Análise Serológica	52
3.4. Caracterização dos resultados positivos ao diagnóstico molecular	53
4. Discussão	54
5. Conclusão	61
6. Referências Bibliográficas.....	62
7. Apêndices	I
Apêndice A	I
Apêndice B.....	III

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Prognóstico após infecção por HVC-1 (Adaptado de Anvik, 1991).	30
Tabela 2 – Primers utilizados para amplificação do fragmento do gene da β -actina (Maia, Nunes, Cristóvão & Campino, 2010).	35
Tabela 3 – Sequência de primers utilizados no PCR convencional, para amplificação de DNA de HVC-1 (Decaro et al., 2010).	37
Tabela 4 – Distribuição da população por canil de criação estudado.	42

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura do HVC-1, com envelope e DNA dentro da nucleocápside icosaédrica (Adaptado de Greene, 2012).....	14
Figura 2 – Lesões papulovesiculares na zona vulvar de uma cadela do canil de criação D.....	46
Figura 3 – Visualização dos resultado da amplificação de um fragmento do gene da β -actina em eletroforese em gel de agarose.....	48
Figura 4 – Visualização dos resultado da amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B do invólucro viral de HVC-1 em eletroforese em gel de agarose.....	49
Figura 5 – Imagem parcial do resultado da sequenciação de uma amostra analisada.....	51

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Distribuição dos cães em estudo por idade.	43
Gráfico 2 – Distribuição dos cães em estudo por raça.	43
Gráfico 3 – Distribuição dos problemas reprodutivos das cadelas da população estudada.	44
Gráfico 5 – Distribuição dos problemas genitais da população estudada	46
Gráfico 6 – Média da concentração de DNA extraído nas diferentes zaragatoas.....	47
Gráfico 7 – Frequência relativa de amplificação de um fragmento do gene da β -actina em função do tipo de amostra de zaragatoa.....	48
Gráfico 8 – Frequência relativa de amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B do invólucro viral de HVC-1 em cada tipo de amostra de zaragatoa	49
Gráfico 9 – Frequência relativa de amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B do invólucro viral de HVC-1 em cada canil de criação.....	50
Gráfico 10 – Títulos de Ac anti-HVC-1 na população estudada	52

I. Casuística do Estágio

Entre o período de 4 de Março e 5 de Julho de 2024 foi realizado o estágio curricular de conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (LACH-FMV-ULusófona). Com a orientação da Professora Doutora Margarida Alves, a autora integrou a equipa do projeto "Estudo da prevalência de Herpesvirus Canino em canis de reprodução", com o objetivo de dar continuidade à investigação, iniciada em 2021.

Durante o período decorrido, de 4 meses, a autora aprofundou os seus conhecimentos sobre técnicas de diagnóstico molecular, nomeadamente técnicas de diagnóstico moleculares e serológicas. As técnicas realizadas foram a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”) de amostras de zaragatoas recolhidas em diferentes canis de criação, a quantificação do DNA isolado por espectrofotometria, a amplificação de DNA de herpes vírus canino pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “Polymerase chain reaction”) e a eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR. Em amostras de soro sanguíneo foi realizada a técnica serológica de ELISA indireta para deteção e quantificação de imunoglobulinas G (IgG) anti-HVC-1.

A investigação desenvolvida culminou na elaboração da presente dissertação.

II. Diagnóstico molecular e serológico de herpesvírus canino em cães de canis de reprodução na Região Metropolitana de Lisboa e Vale do Tejo

1. Introdução

1.1. Agente etiológico

O herpesvírus canino tipo 1 (HVC-1) é um vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*) em cadeia dupla com envelope (Greene, 2012) e pertence ao género *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e família *Herpesviridae* (Papageorgiou *et al.*, 2016). Apresenta um diâmetro compreendido entre 115 e 175 nm, possuindo uma nucleocápside icosaédrica, que envolve o seu DNA, um tegumento proteico e um invólucro composto por lípidos (Fontbonne, 2011) (Figura 1).

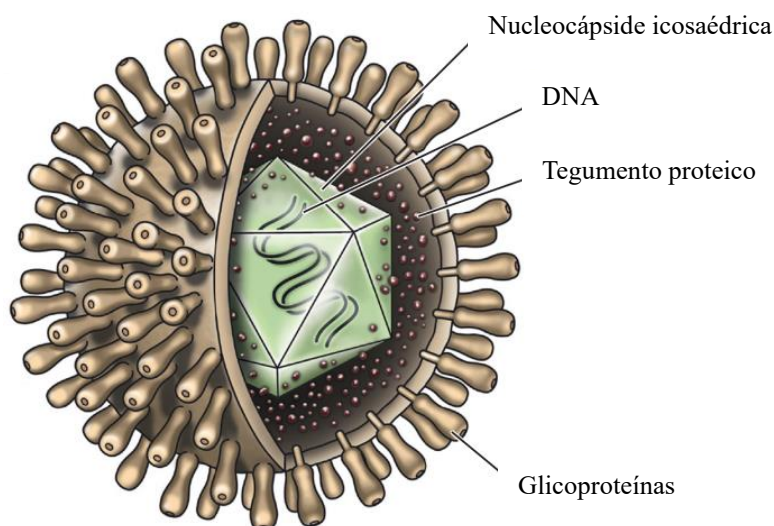


Figura 1 – Estrutura do HVC-1, com envelope e DNA dentro da nucleocápside icosaédrica
(Adaptado de Greene, 2012)

Embora possua uma estrutura genómica semelhante aos outros vírus pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae*, apresentando uma relação genética próxima ao herpesvírus felino tipo 1, herpesvírus equino tipo 1 e tipo 4 e ao herpesvírus de focídeos tipo 1 (Martina, Harder & Osterhaus, 2003; Poulet *et al.*, 2001; Rota & Maes, 1990; Willoughby, Bennett, McCracken & Gaskell, 1999), o HVC-1 apresenta apenas como hospedeiros os canídeos domésticos e silvestres (raposa vermelha, a raposa cinzenta e coiotes). Esta singularidade de hospedeiros deve-se aos recetores específicos para HVC-1 na superfície celular dos mesmos (Greene, 2012).

O HVC-1 foi descrito pela primeira vez em 1965 (Carmichael, Strandberg, & Barnes, 1965) como o agente responsável pela doença hemorrágica fatal em cachorros (Papageorgiou *et al.*, 2016).

1.2. Epidemiologia

O HVC-1 é um vírus enzoótico na população canina da Europa (Ronsse *et al.*, 2005), e ubíquo a nível mundial (Greene, 2012). Como tal, vários estudos relataram altas seroprevalências para HVC-1 na Europa. Encontram-se descritos títulos de anticorpos (Ac) de 88% em Inglaterra, de 8 a 87% na América Latina, de 80% na Noruega, 45,8% na Bélgica, de 39,3% nos Países Baixos e Turquia, de 20,7% no Irão e de 6% em Washington nos Estados unidos (Papageorgiou *et al.*, 2016; Reading & Field, 1999; Ronsse *et al.*, 2002; Rijsewijk, Luiten, Daus, Van Der Heijden, & Van Oirschot, 1999; Castro *et al.*, 2022).

Num estudo realizado em Itália foram descritas seroprevalências de 27,9% em cães de canil, enquanto apenas 3,1% dos animais domésticos estudados apresentaram Ac anti-HVC-1 (Sagazio *et al.*, 1998). Alguns estudos, relatam ainda, que cães de canil com problemas reprodutivos apresentam um título de Ac superior aos que não apresentam fertilidade reduzida (Greene, 2012). Noutro estudo foram, ainda, detetados Ac anti-HVC-1 em raposas vermelhas europeias na Austrália e na Alemanha (Decaro *et al.*, 2008).

Até à data, em Portugal, existem apenas dois estudos sobre HVC-1. Num desses estudos, realizado em 2018, em canis da região de Lisboa e Vale do Tejo e do Distrito de Coimbra, foi detetada uma seroprevalência de 75,5%, apesar de nenhuma das 49 cadelas estudadas ter apresentado excreção viral (Dias, 2018, p.50). Em 2023, noutro estudo, detetaram-se, pela primeira vez, resultados positivos para deteção molecular de HVC-1 em Portugal, com 3,3% das cadelas estudadas positivas para excreção vaginal; não foi avaliada a prevalência de Ac neste estudo (Figueiredo, 2023, p.77).

1.3. Transmissão viral

A reativação e transmissão viral parecem estar correlacionadas com os locais de latência, contribuindo para a retenção do vírus nas coletividades. Um estudo realizado por Burr, Campbell, Nicolson e Onions (1996) detetou uma maior prevalência de DNA de HVC-1 em tecidos como

os gânglios lombossagrados, glândulas salivares parótidas, tonsilas e fígado, evidenciado a importância da latência do vírus nestes locais. Estes autores sugerem que a latência do vírus a nível das glândulas salivares e amígdala contribui para a transmissão oronasal do vírus. Esta via de transmissão encontra-se descrita como a principal via de disseminação e retenção do vírus no ambiente em colónias de cães, através da infeção respiratória (Evermann, Ledbetter & Maes, 2011).

O vírus pode, ainda, ser transmitido por via oronasal ou intra-útero em cachorros ou aquando da passagem pelo canal de parto (Decaro, Martella, & Buonavoglia, 2008; Greene, 2012; Ronsse *et al.*, 2005; Ronsse, Verstegen, Onclin, Farnir, & Poulet, 2004). A latência do HVC-1 nos gânglios lombossagrados contribui não só para esta transmissão na altura do parto aos neonatos, bem como a infeção venérea do vírus (Burr *et al.*, 1996). Outras vias de transmissão menos comuns são através do contacto direto com urina e secreções infetadas (Hashimoto, Hirai, Yamaguchi & Fujimoto, 1982).

1.4. Patogenia e apresentação clínica

1.4.1. Patogénese

A replicação do HVC-1 dá-se entre os 35°C e os 37°C, temperaturas semelhantes às encontradas nas mucosas das vias respiratórias superiores e do aparelho reprodutor dos cães (Greene, 2012). Após entrar no organismo, o HVC-1 replica-se a nível celular, gerando corpúsculos de inclusão intranucleares (Rootwelt, Lund & Krogenæs, 2011).

Em neonatos com menos de 1 semana de vida, aquando da infeção oronasal por HVC-1, o vírus replica-se na mucosa nasal, amígdalas e faringe, dispersando-se pela corrente sanguínea, através de monócitos, até chegar aos pulmões, fígado, rins, sistema nervoso central e sistema linfático (Decaro *et al.*, 2008). O vírus apresenta um período de incubação de 6 a 10 dias e o período de mortalidade mais elevado tende a ocorrer entre a primeira e a quarta semana de vida das ninhadas, podendo chegar a frequências de mortalidade de 100% (Carmichael, 1970).

1.4.1.1. Imunologia e latência viral

O HVC-1 é um vírus pouco imunogénico, ou seja, os Ac neutralizantes formados após a infeção diminuem num período de meses (Ronsse *et al.*, 2005). Para além disso, tem ainda capacidade de latência e de reativação (Krogenæs *et al.*, 2012).

Após a infeção, acredita-se que o vírus se torna latente nos gânglios trigémeo, lombossagrado e outros tecidos (Poulet *et al.*, 2001), como acontece no caso de outros alfa herpesvirus (Ronsse *et al.*, 2005). O animal produz Ac anti-HVC-1 passíveis de deteção 2 a 3 semanas pós-infeção (Takumi *et al.*, 1990). A latência do HVC-1 pode ocorrer após períodos sintomáticos ou assintomáticos de infeção e a sua excreção após reativação pode dar-se durante meses a anos (Decaro *et al.*, 2008).

Fatores que alteram a imunidade, como a gestação, o stress, a utilização de medicamentos imunossuppressores, a idade e doenças concomitantes, são determinantes na capacidade patogénica do vírus (Bujko, Sulović, Zivanović, Lako, & Dotlić, 1988; Greene, 2012; Ronsse *et al.*, 2005) e no aumento do título de Ac do animal (Ronsse *et al.*, 2004). A idade dos animais, o número de animais que constituem a coletividade, o histórico de problemas de reprodução e as condições de higiene parecem, também, influenciar a seroprevalência (Ronsse *et al.*, 2004).

Em dois estudos foi descrito que cães com menos de 6 meses de idade apresentam títulos de Ac menores, enquanto que em cães a partir do primeiro e segundo ano de vida se verifica um aumento da sua concentração. Para além da idade, foi ainda relacionado o número de animais que constituíam as coletividades com a seroprevalência das mesmas. Canis de criação com mais de seis cães apresentaram concentrações de Ac superiores (Krogenæs *et al.*, 2012; Ronsse *et al.*, 2005; Ronsse *et al.*, 2004). Foi, ainda, observado que coletividades com historial de traqueobronquite infecciosa canina ou tosse do canil, más condições de higiene e um número elevado de cães apresentavam seroprevalências bastante mais elevadas, sendo este aumento menos significativo em machos (Ronsse *et al.*, 2004).

Noutro estudo foi demonstrado que animais com historial de desordens reprodutivas apresentavam títulos de Ac superiores aos que não tinham estes problemas (Dahlbom, Johnsson, Myllys, Taponen & Andersson, 2009). Apesar de ter sido demonstrada uma relação entre a infeção por outros alfa herpesvirus e o sexo dos animais infetados (Mertz, 1993), até à data não foi demonstrada uma diferença na exposição de machos e fêmeas a HVC-1 (Krogenæs *et al.*,

2012). Vários estudos relatam não existir uma correlação entre raça e prevalência de HVC-1 (Evermann *et al.*, 2011; Krogenæs *et al.*, 2012; Rezaei, Jajarmi, Kamani, Khalili, & Babaei, 2023; Ronsse *et al.*, 2004). No entanto, num estudo foram obtidas prevalências mais elevadas para raças como Golden Retrievers e Terriers, com resultados de 56,2% e 50%, respetivamente, ainda que estes não tenham sido estatisticamente significativos (Yeşilbağ, Yalçın, Tuncer & Yılmaz, 2012).

1.4.1.2. Fatores de risco

A idade do animal, reprodução por monta natural, dimensão do canil, higiene, biossegurança e doenças respiratórias, como a tosse do canil, são fatores de risco para o aparecimento de doença (Evermann *et al.*, 2011). Dos fatores referidos anteriormente, os mais importantes são a dimensão do canil, as condições de higiene e a presença de tosse do canil, porque permitem a disseminação e retenção do agente numa população de alto risco (Evermann *et al.*, 2011; Ronsse *et al.*, 2004).

Animais imunossuprimidos são mais suscetíveis a infeção, devendo ser implementadas estratégias que aumentem naturalmente a imunidade das progenitoras, colocando as cadelas em contacto com outros animais adultos, efetuando testes moleculares e serológicos antes do período reprodutivo e colocando as cadelas gestantes com estatutos de infeção desconhecidos para HVC-1 em quarentena (Evermann *et al.*, 2011; Ronsse *et al.*, 2005).

Em cadelas gestantes, o período imunológico de maior risco são as 2 a 3 semanas pré-parto. No entanto as 3 semanas pós-parto são as mais determinantes para os neonatos (Evermann *et al.*, 2011). Acredita-se que, devido à deficitária regulação da temperatura nos neonatos, estes animais sejam mais suscetíveis a infeções agudas (Decaro *et al.*, 2008), podendo ocorrer nos primeiros dias de vida a transmissão oronasal do vírus, através da progenitora ou dos outros cachorros da ninhada (Poulet *et al.*, 2001) e posterior desenvolvimento de doença fatal hemorrágica (Decaro *et al.*, 2008). Animais com hipotermia ou imunossuprimidos são mais prováveis de apresentarem sinais clínicos (Lust & Carmichael, 1971), enquanto cachorros com idade mais avançada e animais adultos apresentam um menor risco de serem sintomáticos, quando comparados com cachorros com menos 3 semanas de idade (Decaro *et al.*, 2008). Apesar do menor risco de desenvolvimento de sintomas, animais com mais de 3 semanas de idade podem desenvolver cegueira, surdez e outros sinais neurológicos centrais (Decaro *et al.*, 2008).

Um estudo desenvolvido em Inglaterra, em 2005, relatou que cães previamente infetados com coronavírus canino apresentaram uma maior seroconversão para HVC-1, demonstrando uma relação entre o stress desencadeado por doença e a reativação do HVC-1 (Erles & Brownlie, 2005).

1.4.2. Apresentação clínica

Os sinais clínicos apresentados por animais infetados com HVC-1 estão dependentes da idade do hospedeiro (Ronsse *et al.*, 2004). Por norma, em cães adultos a infeção localiza-se no trato respiratório superior e olhos ou é subclínica (Gracin *et al.*, 2023), podendo ainda provocar problemas reprodutivos (Krogenæs *et al.*, 2012). Em neonatos, este vírus pode provocar uma infeção hemorrágica sistémica fatal, bem como problemas reprodutivos (Krogenæs *et al.*, 2012). Por norma, esta é uma infeção latente que pode ser reativada periodicamente quando o animal se encontra imunossuprimido (Papageorgiou *et al.*, 2016).

1.4.2.1. Apresentação clínica em neonatos

Em neonatos a via de infeção mais comum é através do contacto oronasal com outros cachorros ou progenitora, podendo também ocorrer infeção durante o parto através do contacto com o trato reprodutivo da cadela, como referido anteriormente (Rootwelt *et al.*, 2011). O HVC-1 replica-se nas células epiteliais ou nas amígdalas após o contacto oronasal, prosseguindo através dos monócitos presentes na via sanguínea para o resto do organismo, ocorrendo virémia três a quatro dias após infeção (Greene, 2012).

Cachorros com 2 semanas são mais suscetíveis a desenvolver septicemia (Carmichael, 1970) e a idade com maior incidência de mortalidade para neonatos é entre a primeira e a quarta semana de vida (Carmichael, 1970). A doença nesta faixa etária persiste durante 1 a 3 dias e os animais apresentam anorexia, dispneia, vocalizações, incoordenação, dor abdominal e diarreia, podendo apresentar secreções nasais serosas ou hemorrágicas e petéquias nas mucosas (Decaro *et al.*, 2008). Como os neonatos têm uma menor capacidade de regulação da sua temperatura corporal (Carmichael, Barnes & Percy, 1969), mesmo após infeção, a temperatura retal não tem tendência a aumentar, podendo ocorrer casos de hipotermia (Decaro *et al.*, 2008).

Após infecção por HVC-1 os neonatos podem desenvolver patologias endoteliais concomitantes como vasculite necrosante, podendo desencadear necrose e hemorragia orgânica (Rootwelt *et al.*, 2011). Estes animais podem, ainda, apresentar trombocitopenia e meningoencefalite (Percy, Olander & Carmichael, 1968); no entanto devido à morte rápida do hospedeiro, não é comum serem observados sinais clínicos neurológicos (Rootwelt *et al.*, 2011).

Num estudo foi descrita a hipótese de que após a infecção por HVC-1 os cachorros podem, ainda, estar sujeitos a uma infecção bacteriana secundária, desenvolvendo pneumonia intersticial e nefrite intersticial subaguda (Larsen, Kiupel, Balzer, & Agerholm, 2015).

1.4.2.2. Infecção reprodutiva

Animais adultos podem apresentar lesões genitais linfofoliculares, no caso dos machos localizada na base do pênis e prepúcio. Em fêmeas, pode ainda ocorrer hiperemia vaginal, após infecção genital primária (Decaro *et al.*, 2008). Em cadelas encontram-se descritas lesões genitais papulovesiculares aquando da infecção genital por HVC-1 (Poulet *et al.*, 2001). A localização do vírus e a sua via de disseminação parece estar relacionada (Rootwelt *et al.*, 2011), sendo a reativação do vírus nos gânglios lombossagrados mais provável de provocar problemas reprodutivos do que quando o vírus deixa de estar em latência nas amígdalas (Burr, Campbell, Nicolson & Onions, 1996).

Em cadelas gestantes, a infecção genital por herpesvírus pode resultar no desenvolvimento de lesões degenerativas e necróticas da placenta (Rootwelt *et al.*, 2011) e desencadear problemas reprodutivos como abortos (Poulet *et al.*, 2001), nados mortos, mortalidade neonatal elevada (Decaro *et al.*, 2008) e reabsorção de embriões (Ronsse *et al.*, 2005). Num estudo foi demonstrada uma frequência de 8% de mortalidade perinatal, dos quais 4,3% eram nados mortos e 3,7% sobreviveram, apenas, até aos 8 dias de idade (Krogenæs *et al.*, 2014).

Se ocorrer infecção primária ou reativação viral durante a gestação pode ocorrer transmissão do HVC-1 aos fetos por via transplacentária (Rootwelt *et al.*, 2011). Quando a infecção por HVC-1 ocorre aos 30 dias de gestação podem acontecer mumificações fetais, abortos ou nascimento de nados mortos (Hashimoto *et al.*, 1982). Durante o segundo trimestre de gestação, a infecção aos 40 dias de gestação pode levar ao nascimento de nados mortos ou cachorros fracos que apenas sobrevivem alguns dias, enquanto que se a infecção acontecer entre

os 48 e os 53 dias de gestação os cachorros nascem fracos e sobrevivem até às 2 semanas (Hashimoto, Hirai, Suzuki & Fujimoto, 1983).

Cadelas infetadas naturalmente e que são reinfectadas pelo HVC-1 durante a gestação apresentam menos sinais clínicos do que durante a infecção primária (Greene, 2012). Por outro lado, fêmeas com historial de infecção prévia por HVC-1 têm ninhadas sem sintomatologia nas gestações seguintes, devido à passagem de imunidade aos neonatos nas primeiras semanas de vida (Decaro *et al.*, 2008).

1.4.2.3. Infecção respiratória

O HVC-1 começou por ser descrito como um agente patogénico respiratório (Evermann *et al.*, 2011). A replicação deste vírus ocorre a nível das tonsilas da nasofaringe e nos linfonodos retrofaríngeos e brônquicos (Evermann *et al.*, 2011). Num estudo foi detetado HVC-1 em 9,6% das amostras de lavagens broncoalveolares e 12,8% das amostras de lavagens transtraqueais obtidas em cães de abrigo necropsiados com doença respiratória endémica (Erles, Dubovi, Brooks & Brownlie, 2004).

O HVC-1 tem sido descrito como um dos agentes da doença respiratória infecciosa canina (CIRD, do inglês “Canine infectious respiratory disease”) ou tosse do canil (Erles & Brownlie, 2005). Num estudo foram descritos sinais clínicos leves de rinite e faringite ou traqueobronquite em infeções induzidas experimentalmente em cachorros com idades entre 5 e 12 semanas (Appel, Menegus, Parsonson & Carmichael, 1969).

Por norma, os sinais clínicos associados à infecção respiratória por HVC-1 em cães adultos são ligeiros e transitórios, podendo desenvolver sinais respiratórios superiores como espirros e corrimento oculonasal seroso que perdura, apenas, durante alguns dias (Greene, 2012).

Por outro lado, a infecção respiratória por HVC-1 em cachorros com menos de 1 mês de idade pode levar à sua morte (Evermann *et al.*, 2011). Quando a infecção ocorre às 12 semanas de idade os animais podem desenvolver rinite necrótica, necrose alveolar multifocar e pneumonia broncointersticial, enquanto que animais com 3 anos apresentam rinite e faringite (Evermann *et al.*, 2011; Thompson, Wright & Cornwell, 1972).

1.4.2.4. Infecção ocular

O estatuto imunitário e a idade do animal são determinantes no desenvolvimento da sintomatologia ocular, podendo ocorrer de forma primária ou através de infecções recorrentes (Evermann *et al.*, 2011; Ledbetter, 2013). Durante a infecção ocular primária, o vírus é transportado pelos nervos, permanecendo latente nos gânglios trigêmeos (Ledbetter *et al.*, 2009). Os gânglios trigêmeos são considerados a principal fonte de doença ocular clínica recorrente, onde ocorre replicação viral e transporte através dos nervos de volta ao local da infecção primária (Ledbetter *et al.*, 2009).

Aquando da infecção primária, os fetos ou neonatos podem adquirir doença sistêmica e lesões oculares (Evermann *et al.*, 2011) como cataratas e coriorretinite (Ledbetter, 2013). Animais com um sistema imunitário competente apresentam doença ocular ligeira ou subclínica mais frequentemente do que animais imunossuprimidos (Ledbetter, 2013), enquanto estes últimos podem apresentar lesões oculares mais complicadas e persistentes, que demoram mais tempo a desaparecer e que podem, muitas vezes, ser refratárias ao tratamento médico (Evermann *et al.*, 2011).

Quando ocorre infecção primária, as crias são infetadas intra-útero ou durante as 2 a 3 semanas de idade, ocorrendo disseminação do vírus por via hematogénica e infecção posterior intraocular (Greene, 2012). Os sinais clínicos podem ser bilaterais graves e podem ser observadas a partir dos 10 a 14 dias, altura do desenvolvimento dos neonatos em que estes apresentam abertura da fenda palpebral (Evermann *et al.*, 2011). Nestes animais, os sinais clínicos mais comuns são consequentes do desencadeamento de inflamação aguda, ocorrendo fibrose, atrofia e, principalmente, necrose dos tecidos, provocando lesões como cataratas, coriorretinite, edema da córnea, queratite e sinequias anteriores. A displasia da retina pode ser consequência da necrose e as sequelas mais comuns de infecção ocular por HVC-1 são displasias retinianas, atrofia do nervo óptico, cataratas e cegueira (Evermann *et al.*, 2011).

Em animais adultos, as lesões provocadas pela infecção ocular situam-se normalmente na superfície ocular, incluindo a córnea, a conjuntiva e, também, as pálpebras, causando maioritariamente desconforto para o animal (Decaro *et al.*, 2008) e sinais clínicos inespecíficos, incluindo secreção ocular mucopurulenta ou serossanguinolenta, dor ocular grave e blefarospasmo, mais graves após 7 a 10 dias de infecção, e a sua remissão ocorre passadas 2 semanas (Evermann *et al.*, 2011). As lesões oculares mais encontradas em casos de doença recorrente são conjuntivite e queratite ulcerativa dendrítica (Ledbetter *et al.*, 2009). Estas lesões

são, por norma, bilaterais, mas não necessariamente simétricas em termos de gravidade e tipo de lesão (Ledbetter, 2013).

Fatores de risco para a infecção ocular recorrente em cães adultos envolvem *diabetes mellitus*, linfoma e trombocitopenia imunomediada; no entanto, encontra-se mais frequentemente associada a animais imunocomprometidos (Evermann *et al.*, 2011) e pode ter apresentação unilateral ou bilateral (Ledbetter, 2013). O risco também aparenta ser mais elevado em animais tratados com corticosteroides tópicos e sistêmicos, ciclosporina ocular tópica e quimioterápicos (Evermann *et al.*, 2011).

1.5. Diagnóstico de HVC-1

O diagnóstico para HVC-1 é baseado em alterações de necropsia e na detecção molecular do vírus (Rootwelt *et al.*, 2011), utilizando amostras recolhidas da mucosa oral, da mucosa respiratória superior e da genitália externa (Greene, 2012) em animais vivos e, no *post mortem*, amostras de órgãos de animais abortados ou neonatos. Contudo, não existe nenhum teste de referência recomendado pela organização mundial de saúde animal para o diagnóstico de HVC-1 (Gracin *et al.*, 2023).

Em cachorros com menos de 2 semanas de idade, uma história clínica completa e a progressão da doença são indicativos de diagnóstico. O diagnóstico definitivo nestes animais passa por um exame de necrópsia completo e a utilização de amostras de órgãos para a detecção molecular de DNA viral (Rootwelt *et al.*, 2011). As análises laboratoriais, hematológicas e bioquímicas, são inespecíficas para HVC-1 e o animal pode apresentar alterações como aumento da alanina aminotransferase (ALT) sérica e trombocitopenia (Greene, 2012).

Bactérias como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e outras bactérias coliformes são os principais diagnósticos diferenciais para HVC-1 em neonatos (Rootwelt *et al.*, 2011).

Em animais adultos com sintomatologia respiratória podem ser testados os agentes que compõem o complexo da CIRDC, como o vírus da parainfluenza canino (CPiV), o adenovírus canino tipo-2 (CAV-2) e *Bordetella bronchiseptica* (Evermann *et al.*, 2011). No entanto, se o animal apenas apresentar sinais clínicos respiratórios ou oculares ligeiros, não se investiga o agente etiológico e procede-se, apenas, ao tratamento sintomático (Larsen *et al.*, 2015).

1.5.1. Achados de necropsia e histopatológicos

Como referido anteriormente, os achados de necropsia são importantes para o diagnóstico de neonatos com suspeita de HVC-1 (Rootwelt *et al.*, 2011). Animais infectados com HVC-1 apresentam mais frequentemente lesões no rim (Greene, 2012), no entanto estas também podem ser encontradas no fígado, pulmões, intestino e cérebro (Decaro *et al.*, 2008). Estas lesões consistem em áreas de necrose e hemorragias multifocais podendo estar presentes inclusões intracelulares de tipo Cowdry A (Decaro *et al.*, 2008).

Embora estas inclusões possam ser difíceis de encontrar (Greene, 2012), são um achado de necropsia importante (Rootwelt *et al.*, 2011). As inclusões intracelulares de Cowdry A são corpos de inclusão eosinofílicos, originados devido à rapidez de replicação e destruição celular do HVC-1 (Rootwelt *et al.*, 2011).

Outras alterações encontradas são meningoencefalite, linfadenomegália e esplenomegália (Decaro *et al.*, 2008), congestão e edema pulmonar (Rootwelt *et al.*, 2011). Observa-se degeneração e necrose dos neurónios e células da glia caso o HVC-1 migre através dos nervos trigêmeos ou olfativo (Rootwelt *et al.*, 2011). Em cadelas gestantes pode estar presente necrose macroscópica e histopatológica da placenta (Decaro *et al.*, 2008; Rootwelt *et al.*, 2011).

1.5.2. Isolamento viral de HVC-1

O isolamento viral é um dos possíveis meios de diagnóstico para HVC-1, sendo utilizadas culturas de células renais caninas Madin-Darby (MDCK, do inglês “Madin Darby canine kidney cells”), a uma temperatura compreendida entre os 35°C e os 37°C (Carmichael & Medic, 1978; Greene, 2012).

Em neonatos que morreram de infeção sistémica grave, podem ser recolhidas, para isolamento viral, amostras de órgãos parenquimatosos, como o pulmão, baço, fígado, rim e linfonodos e as adrenal (Greene, 2012). No caso dos animais adultos, devem ser recolhidas amostras por zaragatoa dos diferentes locais de excreção viral, como a mucosa oral, o trato respiratório ou a região genital externa (Greene, 2012).

Este método permite, ainda, a avaliação da virulência da estirpe de HVC-1, através da observação das placas de lise em sobreposição com culturas de células. As células infectadas

adotam uma forma arredondada após a infecção e o seu núcleo apresenta-se, também, aumentado, separando-se do tapete celular. São observadas placas de lise circunscritas por células necróticas (Carmichael & Medic, 1978).

As culturas celulares são realizadas em meios semi-sólidas, como a metilcelulose e o ágar (Carmichael & Medic, 1978), que podem, posteriormente, ser avaliadas através de técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês “Polymerase chain reaction”), a microscopia eletrônica e a imunofluorescência (Greene, 2012).

1.5.3. Técnicas moleculares

O meio de diagnóstico mais sensível para HVC-1 é a PCR (Evermann *et al.*, 2011). Esta permite a detecção viral em vários tipos de tecidos (Decaro *et al.*, 2010), mesmo quando este se encontra em latência nos gânglios e órgãos do hospedeiro (Burr *et al.*, 1996). Os órgãos onde têm vindo a ser detetada uma maior concentração de HVC-1 em neonatos são o pulmão, o fígado, o baço, as adrenais e os rins (Rootwelt *et al.*, 2011). Quando utilizadas zaragatoas para colheita de amostras, os resultados devem ser interpretados tendo em conta a capacidade de latência deste vírus e que a excreção viral apenas ocorre durante um período de alguns dias (Ronsse *et al.*, 2005).

Para a realização das análises moleculares, deve ter-se em atenção que a degeneração dos tecidos é prejudicial para a detecção viral. O local de recolha de amostras depende da apresentação clínica do animal, sendo preferencial a recolha de amostras de órgãos com lesões aparentes ou, no caso de amostragem por zaragatoa, a recolha de amostras de mucosa nasal e genital. É imperativo manter as amostras refrigeradas ou a uma temperatura de -20°C (Rootwelt *et al.*, 2011).

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR, do inglês “quantitative PCR”) é a que apresenta uma maior sensibilidade, permitindo também a quantificação viral (Decaro *et al.*, 2010). Outra técnica disponível é a PCR multiplex, que permite o diagnóstico dos vários agentes etiológicos da CIRDC em animais com sintomatologia respiratória, o que possibilita um tratamento direcionado e, principalmente, o estabelecimento de medidas preventivas adequadas (Piewbang, Rungpipat, Poovorawan, & Techangamsuwan, 2016).

1.5.4. Técnicas Serológicas

Como descrito anteriormente, na Europa, a seroprevalência para HVC-1 é elevada. Os variados estudos realizados utilizaram técnicas serológicas como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”), o teste de soroneutralização viral e a imunofluorescência (Chelaru, 2014; Cobzariu, Necula, Băraîtăreanu, Ștefan & Daneș, 2018; Lara *et al.*, 2016; Larsen *et al.*, 2015; Pratelli, Colao & Losurdo, 2014; Ström Holst *et al.*, 2012; Yesilbag, Yalcin, Tuncer & Yilmaz, 2012).

Em cães adultos e cachorros com idade superior a 6 a 8 semanas, após infecção por HVC-1, o organismo desencadeia a produção de Ac, sendo possível a sua detecção, no soro 2 a 3 semanas após infecção (Greene, 2012). Pode ser detetado um elevado título de Ac durante os meses seguintes à infecção ou reativação viral e títulos baixos durante vários anos, quando o vírus se encontra em latência (Rootwelt *et al.*, 2011). Um alto título de Ac é produzido rapidamente após a reativação viral, com um pico aos 14 dias, diminuindo após algumas semanas (Ledbetter *et al.*, 2009). Após a vacinação para HVC-1, os animais apresentam títulos de Ac semelhantes aos do período de latência. Por outro lado, em cachorros é raro serem detetados Ac devido ao facto de os animais apresentarem quadros clínicos de desenvolvimento agudo e a mortalidade ser muito elevada (Rootwelt *et al.*, 2011).

As técnicas serológicas podem ser usadas durante surtos nas coletividades, com um intervalo de 2 a 3 semanas entre duas colheitas do mesmo animal, para avaliação da evolução do título de Ac ou em estudos epidemiológicos para determinação de seroprevalências (Rootwelt *et al.*, 2011). No entanto, as técnicas serológicas, apresentam a desvantagem de não permitirem diferenciar os Ac formados devido à vacinação dos formados através da infecção do animal pelo vírus (Reagan & Sykes, 2020).

1.6. Tratamento

Como a infecção tende a ser assintomática e autolimitante, por norma, não é necessário tratar estes animais (Rootwelt *et al.*, 2011). No entanto, pode ser aplicado um tratamento de suporte, caso o animal apresente sintomatologia respiratória (Greene, 2012).

No caso de cães com sintomatologia ocular, existem opções de tratamento como o idoxuridine tópico, o cidofovir e o trifluridine (Greene, 2012). No entanto, a utilização de cidofovir não é recomendada porque, apesar de estar comprovada uma diminuição da excreção

viral com uma posologia de 0,5%, 2 vezes por dia, durante 14 dias, encontra-se descrito que este medicamento piora os sinais clínicos oculares (Ledbetter *et al.*, 2015). Por outro lado, o tratamento com trifluridina demonstrou resultados positivos na redução da excreção viral do vírus, melhorando, ainda, a sintomatologia ocular do animal (Spertus, Mohammed & Ledbetter, 2016).

Em gatos e cavalos, tem sido utilizado o aciclovir como tratamento, medicamento que impede a síntese de DNA de herpesvírus nas células do hospedeiro, desencadeando poucas alterações nas células não infectadas (Rootwelt *et al.*, 2011). No entanto, para além da dose terapêutica deste medicamento não estar definida em Medicina Veterinária, no caso do cão este medicamento apresenta baixa biodisponibilidade (Greene, 2012), pelo que o tratamento antiviral pode ser prejudicial para o sistema nervoso central e para o miocárdio. A utilização do aciclovir em doses elevadas pode, por vezes, levar a nefropatia obstrutiva causada por acumulação de cristais no rim (Rootwelt *et al.*, 2011), alterações gastrointestinais ou anorexia (Richardson, 2000).

Encontra-se descrito o tratamento com lactoferrina, uma proteína globular multifuncional proveniente de leite de bovino que tem um efeito imunomodulador. Este tratamento consiste na administração, por via oral, desta proteína e poderá vir a ser utilizado em cachorros saudáveis que tenham tido contacto com animais positivos (Greene, 2012; Tanaka *et al.*, 2003). No entanto, a utilização de lactoferrina *in vivo* não apresenta os mesmos resultados que *in vitro*, o que pode limitar a viabilidade da sua utilização como antivírico contra o HVC-1 (Evermann *et al.*, 2011).

1.7. Profilaxia

Sem os cuidados preventivos adequados e com a ausência de tratamento, principalmente em neonatos, a infeção por HVC-1 pode levar à morte do animal e ser responsável por grandes perdas económicas para os criadores (Poulet *et al.*, 2001).

1.7.1. Stress, condições ambientais e de higiene

Durante a gestação e antes da reprodução deve evitar-se a participação dos animais em competições ou eventos e o seu transporte (Rootwelt *et al.*, 2011).

Como supramencionado, a reativação viral pode ocorrer devido a outras doenças ou infeções que o cão possa contrair. Cães negativos para HVC-1 devem ser mantidos em ambientes separados de animais positivos e uma boa higiene da coletividade é fundamental para evitar que estes contraíam o vírus (Rootwelt *et al.*, 2011). Durante a gestação e nas 6 semanas após o parto, deve, ainda, isolar-se progenitoras que não apresentem Ac anti-HVC-1 (Greene, 2012).

Cachorros separados das progenitoras ou que se encontrem doentes, devem ser mantidos a uma temperatura ambiental entre 29 e 32°C (Greer, 2014) devido à sua capacidade reduzida de regulação da temperatura corporal (Rootwelt *et al.*, 2011).

O HVC-1 é rapidamente inativado no ambiente, principalmente a temperaturas superiores a 40°C (Decaro *et al.*, 2008). Quanto maior a temperatura, mais rápida a inativação viral. A destruição viral é possível a pH inferior 5 ou superior a 8, ou através da utilização de desinfetantes (Rootwelt *et al.*, 2011).

1.7.2. Colostro

O colostro é fundamental para a imunidade dos neonatos, permitindo a transmissão de Ac da progenitora para as crias (Rootwelt *et al.*, 2011). A permeabilidade da mucosa intestinal do cachorro para as imunoglobulinas de maior peso vai diminuindo após o nascimento, como tal é fundamental a ingestão do colostro por parte do mesmo até às oito horas de vida (Rootwelt *et al.*, 2011).

Caso não seja possível a ingestão do colostro, outra medida profilática que pode ser utilizada consiste na administração de 1 a 2 ml de soro hiperimune de cão com títulos de Ac anti-HVC-1 elevados; no entanto, esta medida apenas é eficiente se a administração for realizada previamente à infeção, sendo eficaz na redução da mortalidade das ninhadas (Carmichael, 2004).

1.7.3. Vacinação

A vacina contra o HVC-1 encontra-se registada na União Europeia (*Eurican® Herpes 205*, Merial, França), sendo uma vacina inativada e constituída pela glicoproteína gB, uma glicoproteína presente na superfície do HVC-1, e um adjuvante oleoso (European Medicines Agency [EMA], 2008). A vacinação para o HVC-1 não é obrigatória, sendo apenas recomendada como prevenção de patologias e mortalidade neonatal em cadelas de reprodução que apresentem risco de contrair o vírus (Rootwelt *et al.*, 2011).

A vacinação das progenitoras é a única forma de prevenção ativa da doença em neonatos, conferindo-lhes imunidade passiva através do colostro (Poulet *et al.*, 2001) e diminuindo a sua mortalidade (Decaro *et al.*, 2008). Esta deve ser administrada à progenitora durante ou alguns dias depois da reprodução e 2 semanas antes da data prevista de nascimento dos cachorros, sendo sempre repetidas as duas administrações na revacinação (Rootwelt *et al.*, 2011). A vacina proporciona um aumento do título de Ac quer em animais seronegativos, quer em animais já seropositivos (European Medicines Agency [EMA], 2002).

Poulet e colaboradores, 2001, demonstraram que progenitoras vacinadas geram ninhadas mais saudáveis do que as não vacinadas. Os Ac presentes no soro e colostro da progenitora têm um papel fundamental na proteção da ninhada, reduzindo o risco de nascimento de nados mortos, de cachorros fracos e até mesmo de aborto (Rootwelt *et al.*, 2011).

Noutro estudo foi ainda comprovado que a vacinação das progenitoras com uma vacina liofilizada inativada para HVC-1, com uma toma após a reprodução e um reforço após 6 semanas, melhora a resposta humoral de curta duração. Os cachorros nascidos destas progenitoras, após exposição ao vírus, aos três dias de vida, apresentaram-se assintomáticos e negativos para HVC-1, passadas 3 semanas da exposição (Poulet *et al.*, 2001).

As estratégias de prevenção para HVC-1 devem, também, passar pela vacinação contra a tosse do canil, redução do stress antes do período de reprodução e gestação de forma a evitar a reativação do vírus (Ronsse *et al.*, 2004).

1.8. Prognóstico

O prognóstico para HVC-1 está dependente da idade do animal infetado e da via de infeção (Tabela 1). Infeções através da mucosa respiratória ou vaginal originam, por norma,

quadros clínicos leves, com excreção e posterior latência viral. A infecção de neonatos e cadelas sem Ac anti-HVC-1 pode levar a complicações mais graves para as crias, como doença sistêmica fatal, morte fetal, abortos, entre outros, e como tal apresentam um prognóstico mais reservado (Anvik, 1991).

Pouco foi descrito, até à data, quanto a sequelas oculares; no entanto, este tipo de doenças apenas recentemente foi correlacionada com a infecção por HVC-1 (Ledbetter, 2013). A infecção ocular tanto pode desencadear conjuntivites leves como doença ocular grave (Anvik, 1991).

Tabela 1 – Prognóstico após infecção por HVC-1 (Adaptado de Anvik, 1991).

Infecção	Grupo de risco	Prognóstico
Mucosa respiratória/vaginal	• Cachorros > 3 semanas, • Adultos	Sintomatologia leve Excreção viral Vírus entra em latência
Infecção ocular	• Cachorros > 3 semanas, • Adultos	Conjuntivite leve ou doença ocular Excreção viral
Virémia neonatal aguda	• Neonatos até às 3 semanas	Doença sistêmica fatal Excreção viral Risco de morte
Infecção sistêmica em cadelas sem Ac anti-HVC-1	• Cadelas em reprodução	Morte fetal Abortos Mumificações Potencial fonte de infecção para neonatos
Latência	• Cachorros > 3 semanas, • Adultos	Infecção durante toda a vida do animal Reativação em períodos de stress ou gestação

1.9. Objetivos

Dada a escassez de estudos realizados em Portugal para avaliar a seroprevalência e frequência da infeção por HCV-1 em cães, bem como para investigar a infeção no trato genital de cadelas, foram definidos para o presente trabalho os seguintes objetivos gerais:

- Avaliar a seroprevalência e a frequência de infeção por HCV-1 em cães provenientes de canis de reprodução na Região Metropolitana de Lisboa e Vale do Tejo (RMLVT),
- Comparar a presença de excreção do vírus a nível ocular, nasal, vaginal e prepucial.

Para responder aos objetivos gerais, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Realizar o diagnóstico molecular de HCV-1, através de PCR convencional, em zaragatoas oculares, nasais, vaginais e prepuciais em cães de canis de reprodução da RMLVT,
- Detetar anticorpos anti-HVC-1 em amostras de soro sanguíneo através de um kit comercial de ELISA.
- Avaliar a correlação entre os resultados da deteção molecular do vírus e o local de excreção viral,
- Determinar eventuais fatores de risco associados à infeção por HCV-1, como o sexo, a idade, a raça, o número de gestações, os problemas reprodutivos e os problemas urogenitais,
- Avaliar a correlação entre a infeção por HCV-1 e a saúde reprodutiva dos animais em estudo.

2. Material e Métodos

2.1. Recolha e conservação das amostras

Com o presente estudo pretendeu-se realizar o diagnóstico molecular e serológico de herpesvírus canino tipo I em 40 cães provenientes de 4 canis de reprodução localizados na região Metropolitana de Lisboa e Vale do Tejo (concelhos de Mafra, Torres Vedras e Palmela). Para tal, foram analisadas amostras de soro sanguíneo e zaragatoas oculares, nasais, vaginais e prepuciais.

As amostras estudadas foram colhidas em Agosto de 2022, em todos os cães em idade fértil existentes em cada um dos canis visitados, e conservadas no LACH-FMV-ULusófona até ao início do presente estudo.

A recolha das amostras oculares, nasais, vaginais e prepuciais foi feita com o auxílio de zaragatoas estéreis para pesquisa de DNA de HVC-1 através de PCR convencional. Foram obtidas amostras nasais, oculares, vaginais e prepuciais de todos os animais amostrados, num total de 119 zaragatoas, com exceção de um animal no qual não foi possível a recolha de amostra nasal devido ao seu temperamento.

Em todos os animais, foi, também, feita a colheita de sangue total para tubo seco, para obtenção de soro e posterior pesquisa de anticorpos anti-HVC-1, através de um ensaio de ELISA indireto.

Todas as amostras foram conservadas a uma temperatura de -80 °C, no período máximo 24 horas após a colheita, e descongeladas para a realização do presente trabalho, que decorreu no período compreendido entre Fevereiro de 2024 e Junho de 2024.

Foram recolhidos dados epidemiológicos e clínicos, através do preenchimento de um questionário (apêndice A), por parte de todos os responsáveis dos canis de criação em estudo.

Todo o trabalho laboratorial foi realizado no LACH-FMV-ULusófona. Este estudo teve aprovação por parte da Comissão de Ética e Bem Estar Animal da FVM-ULusófona.

2.2. Análise molecular

2.2.1. Extração do DNA

Para a realização da extração de DNA das zaragatoas vaginais, prepuciais, nasais e oculares foi utilizado o Invisorb Spin Universal kit (Invitek Molecular GmbH) e seguiu-se o seguinte protocolo:

- Os microtubos com as zaragatoas foram descongelados à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$);
- Foram adicionados 200 μl de solução estéril de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês “phosphate buffered saline”) e misturou-se, durante 3 minutos, com o auxílio do vórtex;
- Incubaram-se os microtubos, durante 5 minutos, à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$) e, de seguida, realizou-se um *short spin*;
- Foram adicionados a cada microtubo 200 μl de Tampão de lise HLT, 20 μl de Carrier ácido ribonucleico (RNA, do inglês “Ribonucleic acid”) e 20 μl Proteinase K;
- Utilizou-se o vórtex para agitar os microtubos durante 10 segundos;
- Os microtubos foram a incubar, em banho de água, durante 10 minutos, a uma temperatura de 65°C , agitando-se no vórtex a cada 2 minutos;
- Posteriormente, foram incubados durante 10 minutos em banho de água a uma temperatura de 95°C
- Após a incubação, realizou-se um *short spin*;
- Com o auxílio de uma pinça, previamente desinfetada com lixívia a 10%, removeram-se as zaragatoas dos microtubos, tendo o cuidado de pressionar as mesmas contra a parede do tubo de forma a preservar o máximo de amostra possível. As zaragatoas foram descartadas e entre cada amostra a pinça foi desinfetada novamente com lixívia a 10%;
- Realizou-se um *short spin* e adicionaram-se 260 μl de *binding solution* aos microtubos;
- Agitou-se no vórtex durante 10 segundos e os microtubos foram incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$);
- Realizou-se um *short spin*;
- A amostra foi transferida para um conjunto coluna de filtração/tubo coletor e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de $11.000 \times g$;
- O tubo coletor foi descartado juntamente com o filtrado e a coluna de filtração foi colocada num novo tubo coletor;

- Foram adicionados, à coluna de filtração, 600 µl de *washing buffer* HLT e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g;
- O tubo coletor foi descartado com o filtrado e a coluna de filtração foi colocada num novo tubo coletor;
- Foram adicionados 700 µl de *washing buffer* à coluna de filtração e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g. O tubo coletor foi descartado com o filtrado e a coluna de filtração foi colocada num novo tubo coletor;
- Foram, novamente, adicionados 700 µl de *washing buffer* à coluna de filtração e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g.;
- O filtrado foi descartado, secou-se tubo coletor, tendo o mesmo sido colocado sob a coluna de filtração;
- Foi realizada outra centrifugação a uma velocidade de 11.000 ×g, durante 5 minutos, de forma a remover o etanol residual. O tubo coletor foi descartado juntamente com o filtrado;
- A coluna de filtração foi colocada num microtubo de 1,5 ml estéril, devidamente identificado com a identificação da amostra;
- Adicionaram-se à coluna de filtração 60 µl de água ultrapura estéril, pré-aquecida a 60°C. Fez-se uma incubação de 1 minuto, à temperatura ambiente e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g.
- Foram adicionados à coluna de filtração mais 40 µl água ultrapura estéril, pré-aquecida a 60°C. Fez-se uma incubação de 1 minuto, à temperatura ambiente e repetiu-se a centrifugação, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g;
- Por fim, a coluna de filtração foi descartada e os microtubos, com DNA, fechados e armazenados a uma temperatura de -20°C.

2.2.2. Quantificação do DNA isolado

Em todas as amostras, para quantificação da concentração de DNA obtido na extração foi utilizado um espectrofotómetro Spex NanoSNAP™.

Todas as amostras com uma concentração de DNA superior 100 ng/µl foram diluídas para uma concentração final de 60 ng/µl.

2.2.3. Avaliação da qualidade do DNA isolado

De forma a avaliar a qualidade do DNA isolado, no que respeita à ausência de inibidores da DNA polimerase, foi realizada uma PCR convencional para amplificação de um fragmento de 855 pares de base (pb) do gene da β -actina canino. A sequência de *primers* utilizados encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 – Primers utilizados para amplificação do fragmento do gene da β -actina (Maia, Nunes, Cristóvão & Campino, 2010).

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Tamanho do Fragmento
β -ACT – Fw	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA	855 pb
β -ACT – Rev	CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG	

Preparou-se uma amostra reacional com um volume final de 25 μ l. Em cada microtubo foram adicionados:

- 12,5 μ l de 1 $\times$ Green Master Mix Supreme (NZYTaq II®);
- 10 picomoles (pmol) de cada *primer*;
- 2,5 μ l de DNA genómico;
- Água ultrapura estéril até perfazer o volume final.

A Green Master Mix Supreme (NZYTaq II®) é uma mistura reacional pré-preparada, pronta a usar, que já contém na sua composição desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's, do inglês *deoxyribonucleoside triphosphate*), e cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão de reação e DNA polimerase;

Em cada reação de PCR, incluiu-se um controlo positivo e um controlo negativo. Para o controlo positivo utilizou-se DNA genómico de cão com amplificação anterior bem sucedida. Para o controlo negativo utilizou-se água desionizada estéril no mesmo volume que seria adicionado de DNA genómico.

Foi utilizado um termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad®), para a realização da reação de PCR convencional, seguindo-se o seguinte protocolo:

- Desnaturação inicial a 94°C, durante 2 minutos;
- 30 ciclos constituídos por: 20 segundos de desnaturação a 94°C, 20 segundos de ligação dos *primers* a 66°C e 30 segundos de extensão a 72°C;
- Extensão final, durante 5 minutos, a 72°C.

2.2.4. Electroforese em gel de agarose

A visualização dos produtos de PCR foi feita por electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), num sistema Compact multi-Wide (Biometra), em tampão Tris (90 mM)-Borato (90 mM) – EDTA (2mM), pH 8,3 (TBE 1×), seguindo o seguinte protocolo:

- Pesou-se a agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza) num erlenmeyer e adicionou-se o tampão TBE 1×;
- Aqueceu-se num micro-ondas a 600 Watt, agitando-se o erlenmeyer, até ter ocorrido fusão completa da agarose, apresentando-se de aspeto uniforme e translúcido;
- Aplicou-se água corrente no exterior do erlenmeyer para arrefecer a mistura, tendo o cuidado de agitar continuamente;
- Foram adicionados 0,42 µl de GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium®) para cada 100 ml de gel;
- Colocaram-se os pentes no suporte de eletroforese para que, aquando da adição do gel, fossem formados poços;
- Colocou-se o gel no suporte e aguardou-se a sua polimerização;
- O gel foi transferido para a tina de eletroforese e foi adicionado tampão TBE 1× até submergir o gel;
- Homogeneizaram-se os produtos de PCR e fez-se um *short spin*;
- Aplicaram-se 10 µl dos produtos de PCR e 8 µl do marcador de pesos moleculares Hyperladder 1Kb (Bioline®) nos poços do gel;
- Realizou-se a eletroforese com uma voltagem de 100 Volts, durante 70 minutos.

Observou-se o DNA, através da emissão de fluorescência do GelRed num sistema GelDoc Go Gel Imaging System (BioRad).

2.2.5. Detecção de HCV-1 através de PCR Convencional

Como técnica para a detecção de DNA de HVC-1 em amostras de zaragatoas vaginais, prepuciais, oculares e nasais recorreu-se à PCR convencional. Para tal, foi amplificado um fragmento com 136 pb do gene que codifica a glicoproteína B do invólucro viral; a sequência de *primers* encontra-se apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Sequência de primers utilizados no PCR convencional, para amplificação de DNA de HVC-1 (Decaro *et al.*, 2010).

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

A mistura reacional foi preparada com um volume final de 25 µl, composta por:

- 12,5 µl de NZYTaq II 2× Green Master Mix;
- 10 pmol de cada *primer*;
- 10 µl de DNA genómico;
- Água ultrapura estéril até perfazer o volume final.

Em cada reação, foram incluídos dois a três controlos negativos e um controlo positivo. Para o controlo positivo utilizou-se DNA de um recombinante plasmídico com o fragmento amplificado clonado. O DNA utilizado para o controlo positivo foi cedido pela Professora Doutora Ana Duarte do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). Para os controlos negativos foi utilizada água desionizada estéril no mesmo volume que seria adicionado de DNA genómico.

A reação de PCR foi realizada num termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad®), de acordo com as seguintes condições:

- Desnaturação a 95°C, durante 5 minutos;
- 35 ciclos constituídos por: 1 minuto de desnaturação a 95°C, 45 segundos de ligação dos *primers* a 61°C e 45 segundos de extensão a 72°C;
- Extensão final de 5 minutos a 72°C.

A visualização dos produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), conforme descrito em 2.3.4.

2.2.6. Purificação e Sequenciação dos produtos de PCR

Para confirmação do resultado da amplificação do DNA de HVC-1, foram aleatoriamente selecionadas 3 amostras para sequenciação pelo método de Sanger. Os produtos de PCR a sequenciar foram, previamente, purificados através do kit NZYGelpure (NZYTech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

- Transferiu-se todo o volume do produto de PCR para um microtubo de 1,5 ml, centrifugou-se e adicionaram-se 4 volumes de *Binding Buffer* por cada volume de produto de PCR. Misturou-se e realizou-se um *short spin*;
- Transferiu-se tudo para um conjunto coluna de filtração/tubo coletor e centrifugou-se, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g. Descartou-se o filtrado;
- Adicionaram-se 600 µl de *Washing buffer* ao conjunto coluna de filtração/tubo coletor e centrifugou-se, durante um minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g. Descartou-se o filtrado e colocou-se, novamente, o tubo coletor sob a coluna de filtração;
- Repetiu-se a centrifugação, removendo o etanol residual;
- Colocou-se a coluna de filtração num microtubo de 1,5 ml e adicionaram-se 50 µl de *Elution Buffer* à coluna de filtração. Incubou-se à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$) durante 1 minuto;
- Centrifugou-se durante 1 minuto a uma velocidade de 11.000 ×g e descartou-se a coluna de filtração;

Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciação na empresa STABVida.

Os resultados da sequenciação, sob a forma de electroforetogramas, foram visualizados através do software FinchTV (Geospiza[®]), seguindo-se uma análise de similaridade através do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST[®]).

2.3. Análise Serológica

2.3.1. Detecção de IgG anti-HVC-1 por ELISA indireta

A técnica de ELISA indireta permitiu a deteção de anticorpos IgG anti- HVC-1 nas amostras de soro. Para o efeito, foi utilizado o kit Canine Herpes Virus Ab (DRG[®]), tendo sido seguidas as instruções do fabricante, conforme a seguir descrito:

- Descongelaram-se as amostras e controlos à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$)
- Colocaram-se os reagentes à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$), no escuro, durante 15 minutos;
- Agitaram-se os reagentes e realizou-se um *short spin* às amostras de soro;
- Realizou-se o protocolo de lavagem:
 - Esvaziaram-se os poços, virando a placa de microtitulação ao contrário e realizando um movimento vertical firme para baixo;
 - Colocaram-se 250 μl de solução de lavagem em todos os poços;
 - Repetiram-se os passos anteriores 5 vezes;
 - Virou-se a placa ao contrário e esvaziaram-se os poços com um movimento vertical firme;
 - Removeu-se a solução de lavagem residual, batendo firmemente a placa sobre um papel absorvente;
- Com a solução tampão do kit, realizaram-se diluições de 1:100 para o controlo positivo, 1:150 para o controlo negativo e de 1:150 para cada amostra;
- Colocaram-se 100 μl de solução tampão de ELISA em dois poços, como controlos do substrato;
- Adicionaram-se 100 μl de cada diluição dos controlos positivo, negativo e amostras aos poços da placa;
- Selou-se a placa e incubou-se durante 60 minutos a uma temperatura de 37°C ;

- Realizou-se o protocolo de lavagem, adicionando, por 5 vezes, 250 µl de solução de lavagem. Após a última lavagem, o excesso de solução foi removido batendo vigorosamente com a placa em papel absorvente;
- Adicionaram-se 100 µl de anticorpo conjugado HRPO a cada poço;
- Selou-se a placa e incubou-se durante 60 minutos a uma temperatura de 37°C;
- Realizou-se o protocolo de lavagem, conforme acima descrito;
- Colocaram-se 100 µl de substrato em cada poço;
- Incubou-se, no escuro, durante 10 a 15 minutos, à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$);
- Adicionaram-se 50 µl de solução *stop* a cada poço;
- Num espectrofotômetro Multiskan™ FC Microplate (Thermo Scientific™), mediu-se a absorvância dos poços a um comprimento de onda de 450 nm, utilizando 620 nm como referência e os controles de substrato como branco.

Conforme as instruções do fabricante, foi considerado como *cut-off* a diluição 1:100; valores de títulos de Ac superiores a 900 foram classificados como elevados.

2.4. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente com o programa Excel® 2016 (Microsoft®) e com o programa IBM® SPSS® Statistics™ 2023. Para a realização da análise estatística, foram considerados como negativos os resultados duvidosos obtidos pela técnica de PCR convencional.

Utilizou-se o teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher para avaliar as seguintes variáveis:

- Presença de infecção e canil de criação;
- Título de Ac anti-HVC-1 e canil de criação;
- Raça e título de Ac;
- Raça e presença de infecção;
- Sexo e título de Ac;
- Sexo e presença de infecção;
- Idade e título de Ac;

- Idade e presença de infecção;
- Histórico de problemas reprodutivos e título de Ac;
- Histórico de problemas reprodutivos e presença de infecção;
- Histórico de infecção urinária e presença de infecção vaginal;
- Número de gestações e título de Ac;

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para uma significância (p) inferior a 0,05 e foram determinados os intervalo de confiança de 95%. Nas tabelas de qui-quadrado, de 2 por 2, o valor de p considerado teve em conta a correção de Yates.

O teste estatístico de McNemar foi utilizado para avaliar a presença de infecção e título de Ac.

Relativamente à quantidade de DNA extraído por tipo de amostra, foi realizado o teste não paramétrico H de Kruskal-Wallis.

O teste de Q de Cochran foi utilizado para avaliar a proporção de resultados positivos e negativos entre os diferentes tipos de zaragatoas recolhidas no mesmo animal.

3. Resultados

3.1. Caracterização da população estudada

No presente estudo foram estudados 40 cães provenientes de quatro canis de criação, dos quais 70% (28/40) eram fêmeas e 30% (12/40) machos. O canil de criação A representou 22,5% (9/40) da amostra, o canil B 20% (8/40), o C 37,5% (15/40) e o D 20% (8/40). A distribuição dos animais por canil de criação e por sexo encontra-se representada na Tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição da população por canil de criação estudado.

Canil de Criação	Nº de animais		Total
	Fêmeas	Machos	
A	6	3	9
B	6	2	8
C	10	5	15
D	6	2	8
Total	28	12	40

À data da recolha das amostras, os animais estudados tinham idades compreendidas entre 10 meses e 10 anos, apresentando 27,50% dos animais menos de 2 anos (11/40), 47,50% idades entre os 2 e 6 anos (19/40) e 25% mais de 6 anos (10/40). A idade mais frequente foi 3 anos (9/40), com 22,50% dos cães a pertencer a essa faixa etária. A distribuição dos animais por idade encontra-se representada no gráfico 1.

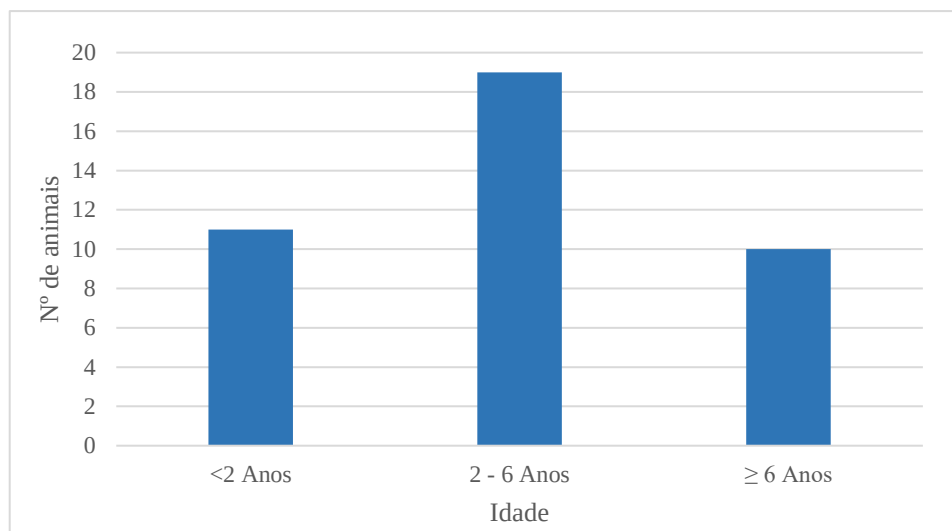


Gráfico 1- Distribuição dos cães em estudo por idade.

Este estudo foi composto por cães de 3 raças distintas: Pastor Alemão, Bull Terrier e Pug. A raça mais frequente neste estudo foi o Pastor Alemão 40% (16/40). No gráfico 2 encontra-se detalhada a distribuição destas raças na população estudada.

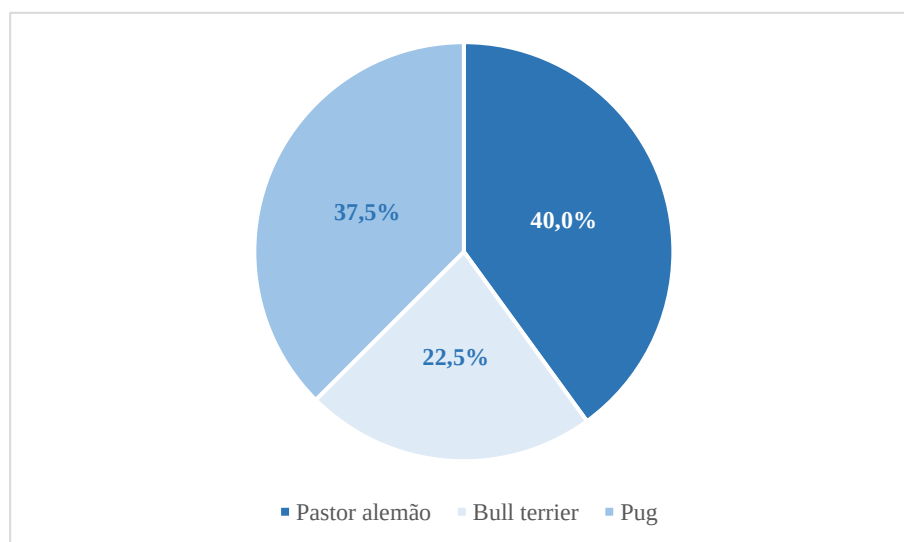


Gráfico 2 – Distribuição dos cães em estudo por raça.

Nos anos de 2021 e 2022, devido à pandemia por SARS-CoV-2, existiu uma escassez da vacina *Eurican Herpes 205®* (Merial, França) em Portugal. Por esta razão, no momento da recolha das amostras, apenas um dos animais em estudo se encontrava vacinado para HVC-1. O animal vacinado encontrava-se gestante, sendo este o motivo da sua vacinação.

Das cadelas estudadas, 42,86% (12/28) apresentaram problemas reprodutivos. Foram relatados problemas como: cadelas vazias após inseminação ou cruzamento, reabsorções fetais, mortalidade neonatal, necessidade de cesariana de urgência e cadelas que apenas tiveram um cachorro por ninhada. Reabsorção fetal foi o problema mais prevalente na população estudada, com 33,33% (4/28) da mesma afetada. No gráfico 3 encontra-se representada a distribuição dos problemas reprodutivos referidos.

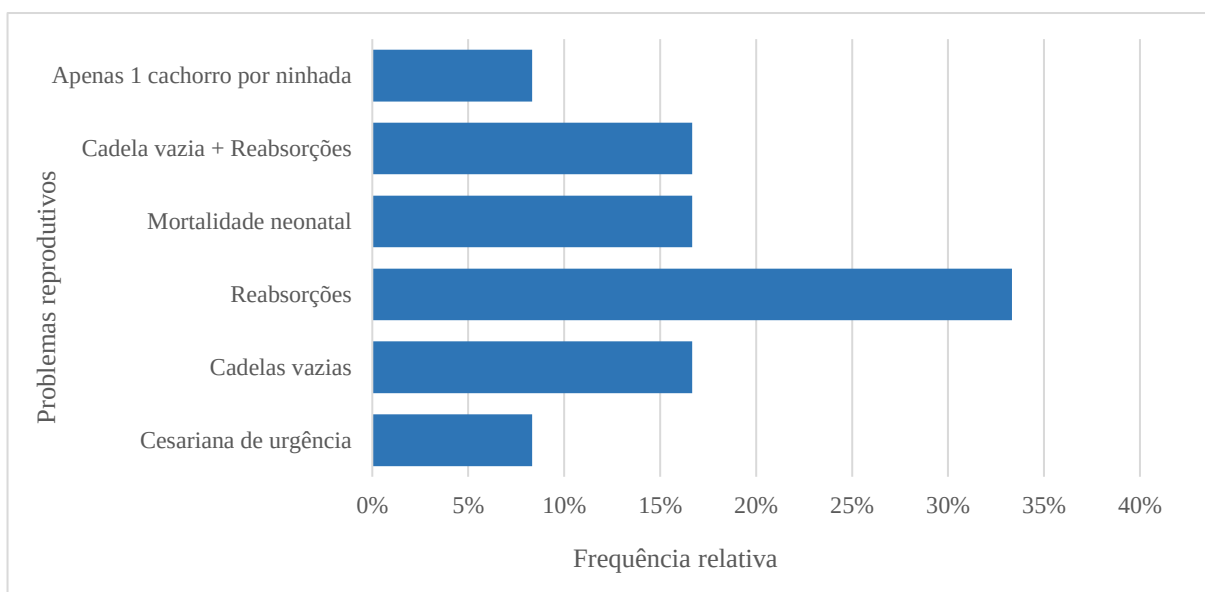


Gráfico 3 – Distribuição dos problemas reprodutivos das cadelas da população estudada.

Na população estudada, 53,57% (15/28) das fêmeas já tinha estado gestantes pelo menos uma vez e 25% (7/28) nunca haviam sido cruzadas. No que respeita ao número de gestações, 29% (8/28) das fêmeas tinham tido, apenas, 1 gestação, 18% (5/28) 2 gestações e 7% (2/28) 3 gestações. Não foi possível a recolha destes dados de 6 animais. Esta distribuição encontra-se representada no gráfico 4.

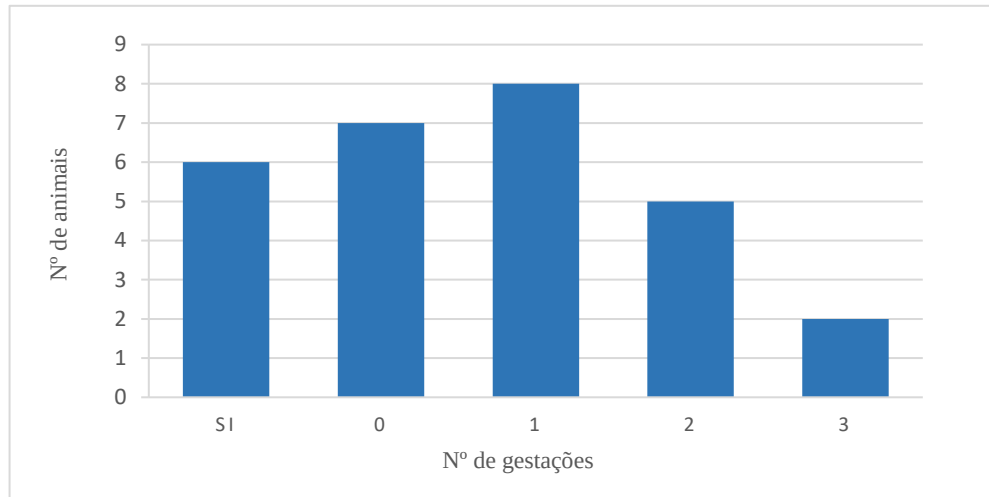


Gráfico 4 – Distribuição do número de gestações das cadelas da população estudada. SI – sem informação.

Foram descritos problemas genitais em 30% (12/40) da população estudada e apenas em fêmeas. As condições relatadas pelos criadores foram: infecções urinárias, hiperplasia uterina, piómetra e lesões papulovesiculares vaginais. O problema mais descrito pelos criadores foi a infecção urinária, com uma frequência de 58,33% (7/40). O gráfico 5 representa a distribuição dos problemas genitais supracitados. Uma das lesões foi observada durante a colheita das amostras, quando a cadela apresentava lesões vesiculares na vulva, cuja documentação fotográfica se encontra na Figura 2. No mesmo canil, outra cadela apresentava histórico das mesmas lesões, no entanto não foi possível apurar a data do aparecimento das mesmas.

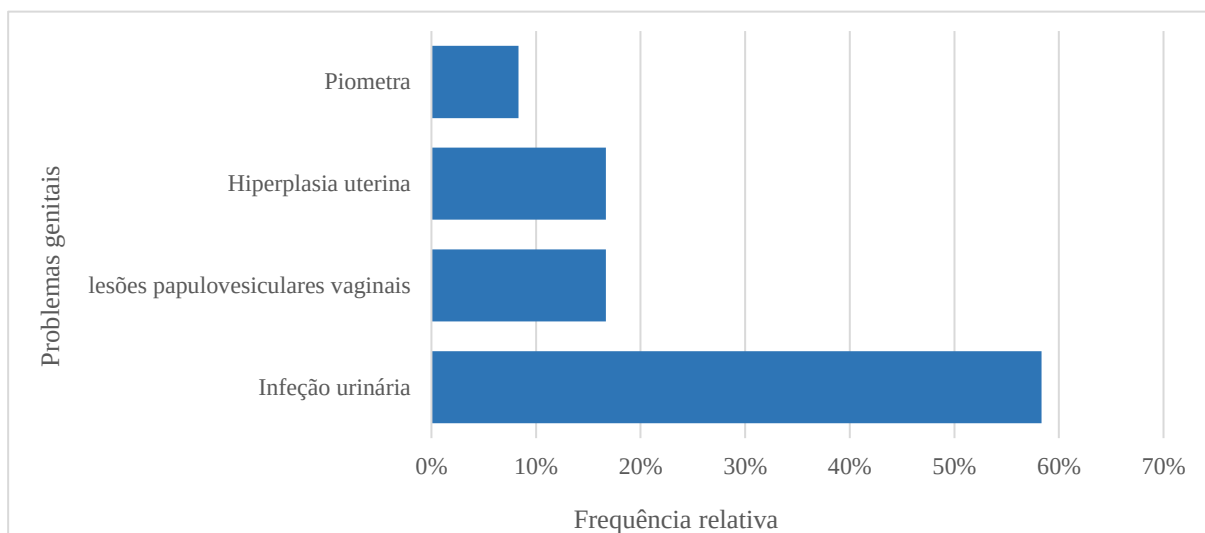


Gráfico 5 – Distribuição dos problemas genitais da população estudada.



Figura 2 – Lesões papulovesiculares na zona vulvar de uma cadela do canil de criação D.

3.2. Análise Molecular

3.2.1. Quantificação do DNA isolado

A maior concentração de DNA extraído foi de 1418,97 ng/μl, obtida a partir de uma zaragatoa vaginal e a menor concentração foi de 3,15 ng/μl, obtida a partir de uma zaragatoa nasal. Os valores médios de concentração de DNA obtidos nas diferentes zaragatoas foram os seguintes: $59,67 \pm 16,22$ ng/μl nas zaragatoas vaginais, $59,33 \pm 10,37$ ng/μl nas prepuciais, $30,77 \pm 21,01$ ng/μl nas oculares e $16,93 \pm 13,49$ ng/μl nas nasais (gráfico 6).

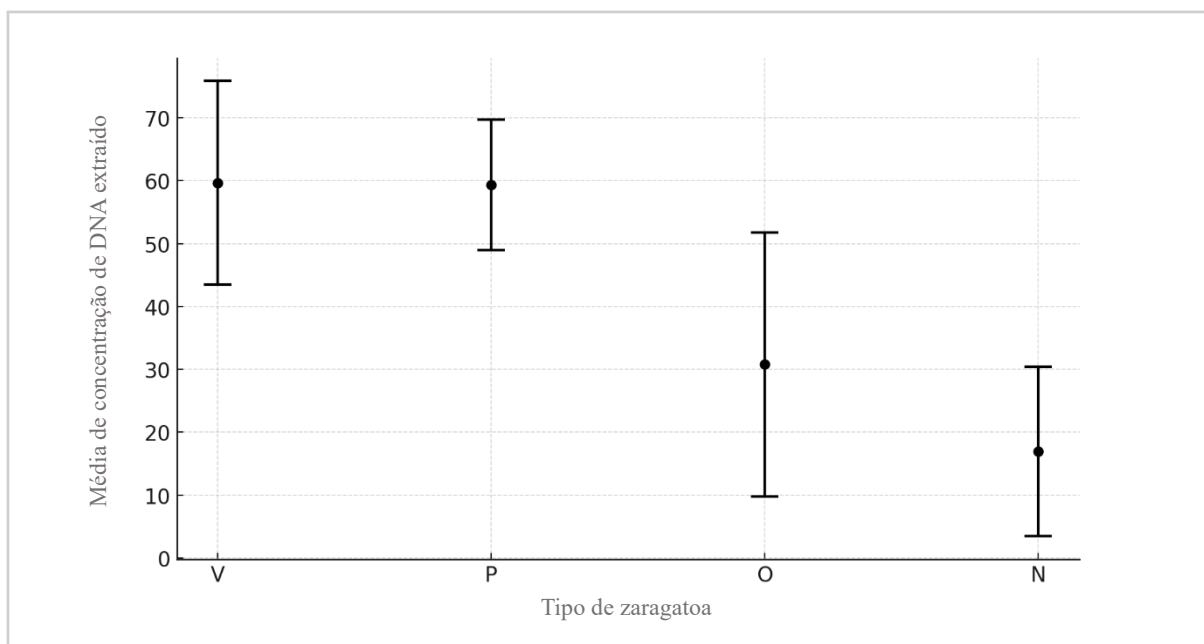


Gráfico 6 – Média da concentração de DNA extraído nas diferentes zaragatoas. V: zaragatoas oculares; P: zaragatoas nasais; O: zaragatoas vaginais; N: zaragatoas prepuciais.

Na comparação da mediana de concentração de DNA isolado por tipo de zaragatoa, através do teste não paramétrico H de Kruskal-Wallis, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as medianas das zaragatoas nasais e as restantes (ocular, $p=0,029$; vaginal e prepucial, $p < 0,001$) e entre a ocular e a vaginal ($p < 0,001$) e a prepucial ($p=0,006$), verificando-se concentrações de DNA inferiores para as zaragatoas nasais, quando comparadas com as restantes zaragatoas, e concentrações de DNA inferiores para as zaragatoas oculares, quando comparadas com as zaragatoas vaginais e prepuciais.

3.2.2. Qualidade do DNA isolado

A amplificação do fragmento do gene da *β -actina* canino foi bem sucedida em 79,83% (95/119) das amostras (Figura 3) e negativa em 4,20% (5/119). Em 15,97% (19/119) das amostras a amplificação foi considerada duvidosa devido ao facto de a banda do produto de PCR no gel de agarose se apresentar muito ténue e a repetição da reação de PCR com um maior volume de DNA não ter resultado num aumento da intensidade da mesma.

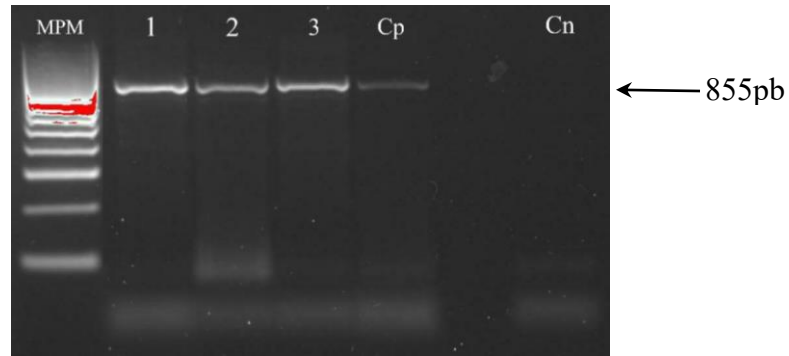


Figura 3– Visualização dos resultado da amplificação de um fragmento do gene da β -actina em eletroforese em gel de agarose. MPM: marcador de peso moleculares (Hyperladder 1Kb, Bioline[®]); 1 a 3: amostras com amplificação positiva; Cp: controle positivo; Cn: controle negativo.

As zaragatoas com maior frequência relativa de amplificação foram as prepuciais, com 100% (12/12) e as oculares, com 97,5% (39/40). As zaragatoas vaginais e nasais apresentaram frequências de amplificação de 89,27% (25/28) e 48,72% (19/39), respetivamente. As zaragatoas nasais apresentaram a maior frequência de resultados duvidosos, 38,46% (15/39) e de resultados negativos, 12,82% (5/39). No gráfico 7 encontram-se representados os resultados da amplificação em função do tipo de zaragatoa.

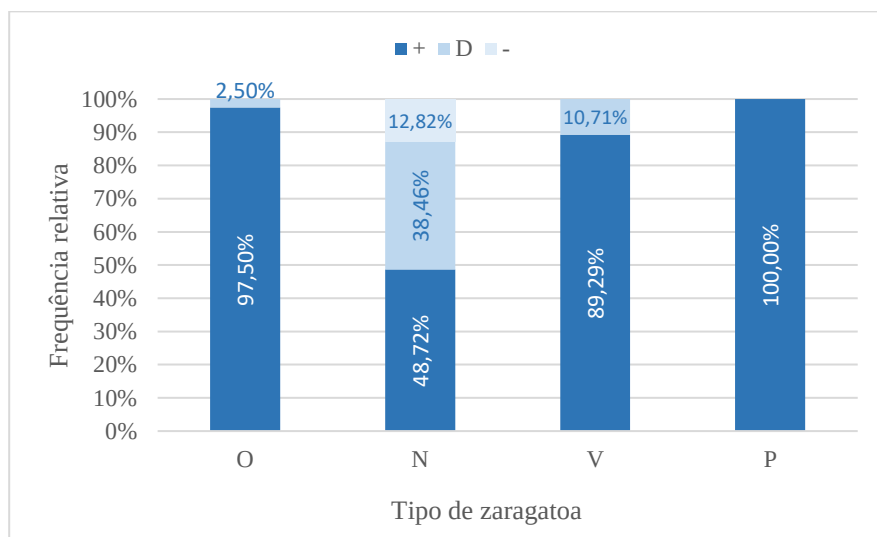


Gráfico 7 – Frequência relativa de amplificação de um fragmento do gene da β -actina em função do tipo de amostra de zaragatoa. +: positivo; -: negativo; D: duvidoso; O: zaragatoas oculares; N: zaragatoas nasais; V: zaragatoas vaginais; P: zaragatoas prepuciais.

3.2.3. Amplificação de HVC-1 por PCR convencional

Dos 40 animais analisados, por PCR convencional, para a presença de DNA de HVC-1, foi detectada a presença do vírus em 31 animais (77,50%). Em 4 animais (10%) o resultado da amplificação foi considerado duvidoso e em 5 negativo (12,50%). A figura 4 representa a visualização dos resultados obtidos.

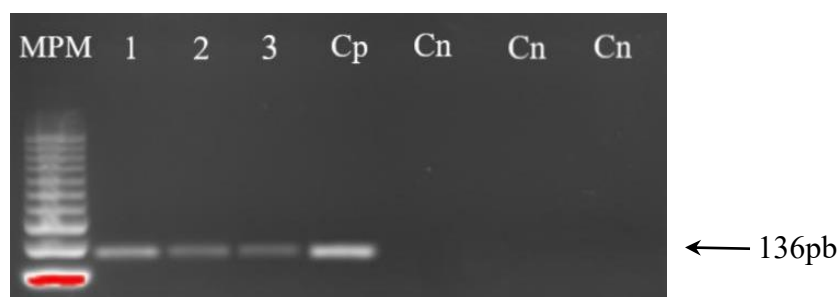


Figura 4 – Visualização dos resultado da amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B do invólucro viral de HVC-1 em eletroforese em gel de agarose. MPM: marcador de peso moleculares (Hyperladder 1Kb, Bioline®); 1 a 3: amostras com amplificação positiva; Cn: controlo negativo; Cp: controlo positivo.

As amostras de zaragatoas vaginais apresentaram a maior frequência de amplificação positiva com 64,29% (18/28) e as nasais de amplificação negativa com 82,05% (32/39). As frequências de amplificação encontram-se representadas no gráfico 8.

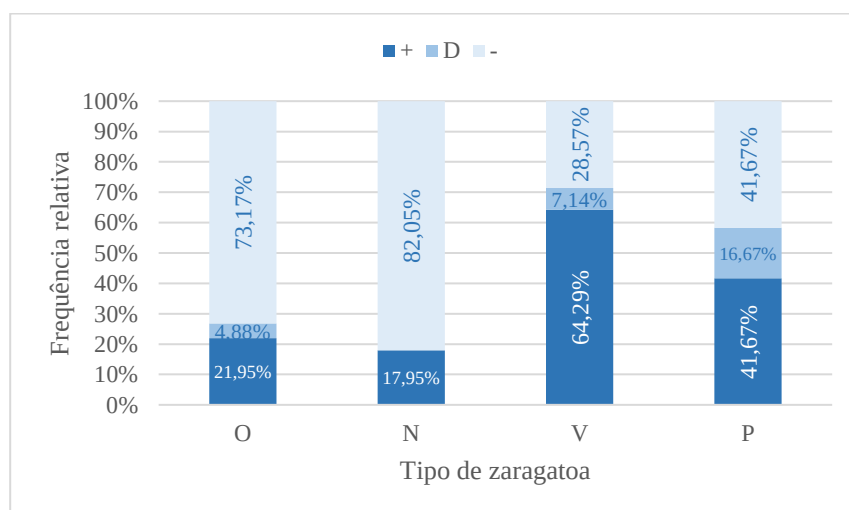


Gráfico 8 – Frequência relativa de amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B do invólucro viral de HVC-1 em cada tipo de amostra de zaragatoa. +: positivo; -: negativo; D: duvidoso; O: zaragatoas oculares; N: zaragatoas nasais; V: zaragatoas vaginais; P: zaragatoas prepuaciais.

O teste de Q de Cochran mostrou existir uma diferença estatisticamente significativa na proporção de resultados positivos para HVC-1 no mesmo animal entre as amostras vaginais e nasais ($p=0,008$) e oculares ($p=00,19$). A proporção de resultados positivos foi superior para as zaragatoas vaginais, quando comparadas com as zaragatoas nasais e oculares.

Em todos os canis de criação estudados foram encontrados casos positivos para HVC-1 (gráfico 9). Todos os animais do canil de criação B foram positivos para a presença do vírus (8/8). No casos dos canis A, C e D, foram encontradas frequências de infecção de 55,56% (5/9), 73,33% (11/15) e 87,50% (7/8), respetivamente.

Em 25,93% (21/81) das amostras com amplificação negativa ou duvidosa para HVC-1, também não foi possível a amplificação do fragmento do gene da β -actina, ou esta amplificação foi igualmente duvidosa.

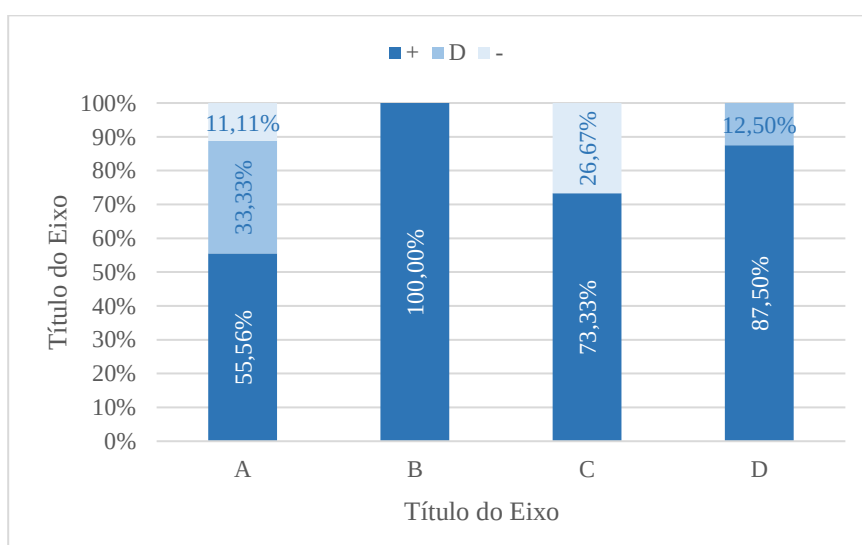


Gráfico 9 – Frequência relativa de amplificação de um fragmento do gene da glicoproteína B do invólucro viral de HVC-1 em cada canil de criação. +: positivo; -: negativo; D: duvidoso; A,B,C,D: Canis de criação.

A faixa etária onde se observou um maior número de animais positivos foi dos 2 aos 6 anos de idade, representando 33,33% (13/39) dos animais positivos deste estudo.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção e as variáveis: idade; raça; canil de criação; histórico de problemas reprodutivos e historial de problemas urogenitais.

3.2.4. Sequenciação

Através do algoritmo BLAST, a análise de similaridade das sequências obtidas (Figura 5), indicou identidades entre 98,84% e 99,27% com várias estirpes de HVC-1.

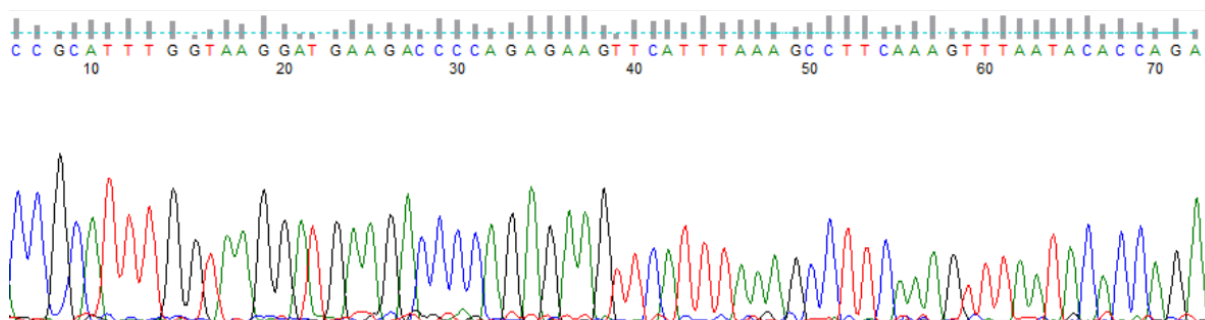


Figura 5 – Imagem parcial do resultado da sequenciação de uma amostra analisada.

3.3. Análise Serológica

Todos os animais deste estudo (40/40) foram positivos para a presença de anticorpos (Ac) IgG anti-HVC-1. Na totalidade dos quatro canis de criação, foram identificados animais com títulos de Ac compreendidos entre 3236 e 237; 27,5% dos animais apresentaram títulos considerados elevados (>900). O animal vacinado apresentou um título de Ac de 552 (gráfico 10, animal 6). Os resultados dos títulos de Ac obtidos para todos os animais estudados encontram-se representados no gráfico 10.

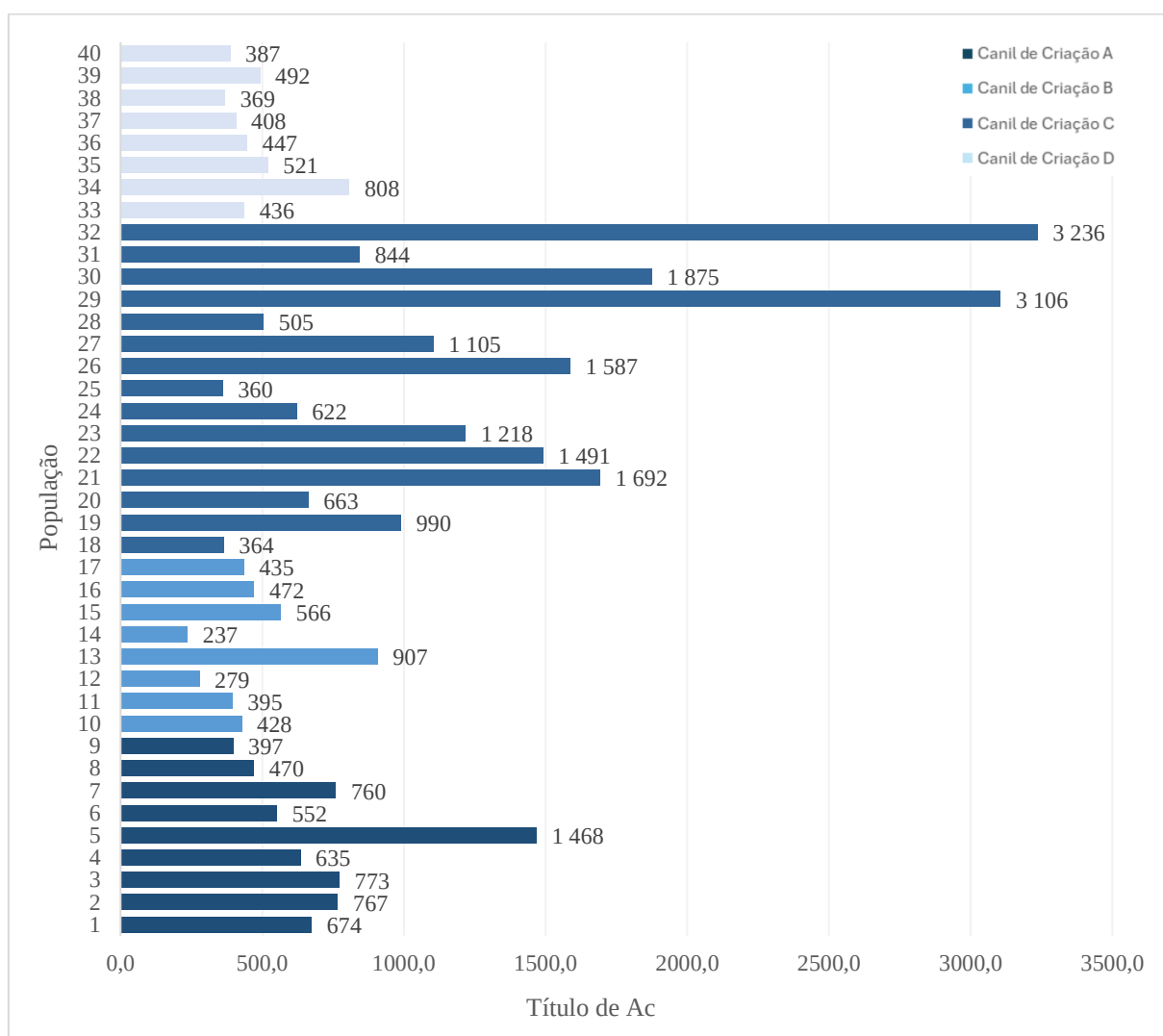


Gráfico 10 – Títulos de Ac anti-HVC-1 na população estudada.

Verificou-se uma relação estatisticamente significativa, através do teste de qui-quadrado, entre títulos de Ac < 900 e a raça Pastor Alemão e entre títulos de Ac ≥ 900 e a raça Bull Terrier ($p=0,002$), com uma associação moderada.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o título de Ac e as variáveis: idade; sexo; canil de criação; histórico de problemas reprodutivos; historial de problemas urogenitais; número de gestações e presença de infeção.

3.4. Caracterização dos resultados positivos ao diagnóstico molecular

No presente estudo, 77,5% (31/40) dos animais tiveram um resultado de PCR positivo para HVC-1 em pelo menos uma das zaragatoas recolhidas. Desses, 74% (23/31) eram fêmeas e 26% (8/31) machos. Nenhum dos animais positivos estava vacinado contra o HVC-1.

Quanto à distribuição por raça, 48% (15/31) dos cães positivos eram da raça Pastor Alemão, 35% (11/31) da raça Pug e 16% (5/31) da raça Bull Terrier.

Excluindo um animal em que não foi possível a recolha de zaragatoa nasal, verificou-se que 62% (24/39) apresentaram, apenas, uma zaragatoa positiva para HVC-1, 10% (4/39) tinham duas zaragatoas positivas e em 5% (2/39) dos casos, todas as zaragatoas foram positivas.

Duas das cadelas incluídas neste estudo tinham sido testadas para HVC-1 em Abril de 2022, através de zaragatoas vaginais, onde foi amplificado DNA do vírus. Na análise feita para o presente trabalho, as cadelas apresentaram um resultado positivo e um resultado duvidoso para a zaragatoa ocular. Ambas obtiveram resultados negativos para as zaragatoas nasais e vaginais.

Dos 11 animais com títulos de Ac considerados elevados (>900), 81,82% (9/11) apresentaram resultados positivos para HVC-1, para pelo menos uma zaragatoa. Uma das cadelas, com título de Ac de 1692 e positiva na PCR para todas as zaragatoas, é progenitora de um cão da sua segunda ninhada, que apresentou um título de Ac de 1105 e que foi negativo na PCR para deteção de HVC-1.

Entre os animais com histórico de infeções urinárias, 71,43% (5/7) apresentaram um resultado de PCR positivo apenas na zaragatoa vaginal.

Adicionalmente, a cadela com lesões papulovesiculares vulvares no momento da recolha das amostras, apresentou um resultado positivo para HVC-1 apenas na zaragatoa vaginal. Por outro lado, a cadela com registo anterior destas lesões, apresentou um resultado de PCR positivo apenas na zaragatoa ocular. Estes animais apresentaram títulos de Ac anti-HVC-1 de 436 e 408, respetivamente, tinham menos de 1 ano de idade e nunca haviam estado gestantes, até ao momento da recolha das amostras.

4. Discussão

O HVC-1 apresenta uma alta seroprevalência na Europa e é responsável por problemas reprodutivos e mortalidade neonatal em cães (Gracin et al., 2023). Em canis de reprodução, a seroprevalência para HVC-1 é mais elevada (Krogenæs et al., 2012) e animais com problemas de fertilidade apresentam títulos de Ac anti-HVC-1 superiores (Greene, 2012). Como tal, e tendo em consideração o reduzido número de trabalhos realizados em Portugal sobre este assunto, a compreensão detalhada da epidemiologia, patogenia e métodos de diagnóstico do HVC-1 é crucial para implementar estratégias de controlo e prevenção, reduzindo significativamente as perdas económicas e melhorando a saúde e bem-estar destes animais.

No presente trabalho, foram estudados 40 cães de canis de reprodução, dos quais 70% eram fêmeas e 30% machos (Tabela 3). Relativamente ao diagnóstico de HVC-1, 74% dos animais positivos eram fêmeas e 26% eram machos. Na análise estatística não foi possível estabelecer uma relação entre o sexo do animal e a infeção por HVC-1 ou o título de Ac. Estes resultados vão de encontro aos descritos na literatura, onde, até à data, não foi encontrada uma correlação entre o sexo do animal e presença de infeção ou uma seroprevalência mais elevada para HVC-1 (Krogenæs et al., 2012).

Ronsse et al., (2004) demonstraram existir um aumento dos títulos de Ac com a idade. Krogenæs et al., (2012) sugerem, ainda, que, durante a puberdade, as alterações hormonais possam ser um fator desencadeante para a reativação viral ou infeção primária, pelo que o contacto com o vírus pode desencadear um aumento progressivo da produção de Ac a partir dos 2 anos até aos 6 anos de idade. Ao contrário destes estudos, no presente trabalho não se verificou qualquer associação entre o título de Ac e a idade do animal. Não se verificou, ainda, uma associação entre a idade e a presença de excreção viral.

Vários estudos apontam para que não exista uma correlação entre raça e o título de Ac anti-HVC-1 (Evermann et al., 2011; Krogenæs et al., 2012; Rezaei, Jajarmi, Kamani, Khalili, & Babaei., 2023; Ronsse et al., 2004). No entanto, Yeşilbağ et al., (2012) obtiveram seroprevalências mais elevadas em raças como Golden Retrievers e Terriers, mas sem significância estatística. Neste estudo foram encontrados títulos de Ac mais elevados em cães da raça Bull Terrier (>900) e títulos de Ac mais baixos nos cães da raça Pastor Alemão (<900), tendo estes resultados sido estatisticamente significativos, com uma associação moderada. No entanto, apesar de se observar uma relação entre estas duas raças e o título de Ac, é importante salientar que apenas fizeram parte deste estudo 4 canis de criação, cada um a reproduzir apenas uma raça.

Para além disto, apenas foram estudadas três raças. Tendo em conta estes resultados, para o futuro seria interessante alargar o estudo a uma maior diversidade de raças, mas também a um número de coletividades representativo do país.

No ano de recolha das amostras, 2022, existiu uma escassez da vacina Eurican Herpes 205® (Merial, França), pelo que apenas um dos animais em estudo se encontrava vacinado para HVC-1. Com exceção deste animal, a avaliação do título de IgG dos restantes animais em estudo evidencia ter havido contacto prévio com o vírus, uma vez que todos apresentavam títulos de Ac positivos. Segundo Rootwelt et al., (2011), animais vacinados para HVC-1 apresentam títulos de Ac moderados, semelhantes aos encontrados em animais em estado de latência. No entanto, apesar de vários trabalhos referirem os fatores que influenciam o título de Ac produzidos, poucos referem intervalos de valores para os quais estes podem ser considerados fracos, moderados ou elevados. O único animal vacinado apresentou um título de Ac de 552, valor considerado moderado.

Dias (2018) comparou o título de Ac de animais vacinados com animais expostos naturalmente aos vírus e demonstrou, não só a importância da vacinação na proteção das ninhadas, mas também que a revacinação das progenitoras em cada gestação é fundamental. Rootwelt et al., (2011) sugerem ainda que devem ser realizadas duas vacinações, uma no início e outra no final da gestação. Perante a escassa informação existente, é importante que sejam realizados mais estudos que relacionem a vacinação dos animais com a seroconversão e que possam ser um auxílio à avaliação do estado imunológico de cadelas vacinadas durante a gestação.

Vários estudos correlacionam a presença de problemas reprodutivos com a presença de infeção para HVC-1 (Cobzariu et al., 2018; Ronsse et al., 2004) e com o aumento do título de Ac anti-HVC-1 (Dahlbom, Johnsson, Myllys, Taponen & Andersson, 2009; Van Gucht, Nauwynck & Pensaert, 2001). No presente trabalho não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre estas variáveis. Uma limitação do presente estudo que poderá estar relacionada com esta divergência relativamente ao descrito por outros autores é a reduzida dimensão da amostra. O alargamento do estudo a um maior número de animais e de canis poderia trazer alguma clarificação sobre este assunto. Apesar dos animais estudados apresentarem histórico destes problemas, não foi possível determinar quando é que eles ocorreram, pelo que, os animais testados podem já não apresentar infeção ativa. Em trabalhos futuros, recomenda-se a recolha de amostras de cães com estes problemas, ou a recolha das datas a que estes ocorreram.

Carmichael et al. (1970), realizaram um estudo onde descrevem a presença de Ac anti-HVC em cães nascidos de progenitoras seropositivas. Ronsse et al. (2004) demonstraram, ainda, que fêmeas seropositivas tinham ninhadas mais saudáveis. Por outro lado, fêmeas com infecção prévia por HVC-1, quando ficam gestantes têm ninhadas sem sinais clínicos de infecção, devido à passagem de imunidade aos neonatos nas primeiras semanas de vida (Decaro et al., 2008). No presente trabalho, dois dos animais em estudo eram mãe e filho. A progenitora foi positiva por PCR para todas as zaragatoas recolhidas e apresentou um título de Ac de 1692, tendo o filho sido negativo para todas as zaragatoas e apresentado um título de Ac de 1105. Apesar de se tratar de um único caso, este resultado vai ao encontro do descrito na literatura. Estes resultados sugerem uma passagem de imunidade, da progenitora para o filho, e uma subsequente proteção contra a infecção por HVC-1.

Em animais adultos com infecção genital por HVC-1 encontram-se descritas lesões como hiperemia vaginal e prepucial ou da base do pênis (Decaro et al., 2008) e lesões genitais papulovesiculares em fêmeas, sendo estas indicativas de infecção genital ativa (Poulet et al., 2001). No presente estudo foram encontradas lesões papulovesiculares em duas cadelas da mesma coletividade. Uma apresentava estas lesões no momento da recolha das amostras (Figura 2) e encontrava-se positiva para excreção vaginal, o que vai de encontro ao descrito na literatura. Relativamente à outra cadela, apenas se recolheu a informação de que tinha historial destas lesões, não tendo sido possível averiguar a data em que ocorreram. Deste modo, o resultado negativo para zaragatoa vaginal e positivo para ocular pode demonstrar uma reativação viral e excreção ocular.

Neste trabalho, como parte das patologias urogenitais (gráfico 5), foram relatadas infecções urinárias em 58,33% (n=7) dos animais, dos quais 71,43% (n=5) foram positivos para excreção vaginal. Apesar deste ser o sinal clínico encontrado com maior frequência não foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre a presença de infecção urinária e uma infecção ativa por HVC-1. Até ao momento, não se encontram descritos casos de HVC-1 relacionados com esta doença. No entanto, tendo em conta que a reativação do HVC-1 pode ocorrer em momentos de imunossupressão, sugere-se que esta infecção possa levar a uma reativação viral a nível vaginal. Para a interpretação destes resultados deve, ainda, ter-se em conta que não foi possível saber a data em que estas infecções ocorreram.

Castro et al. (2022) descrevem, no diagnóstico molecular de HVC-1, frequências de excreção nasal de 27,8%, ocular de 22,2%, prepuciais de 11,1% e vaginais de 5,6% de vaginais.

Os resultados obtidos no presente trabalho contrastam com os dos referidos autores, tendo a excreção vaginal (64,29%) e prepucial (41,67%) sido as mais prevalentes, e a excreção ocular e nasal as que apresentaram frequências inferiores (21,95% e 17,95%, respetivamente) (gráfico 8). Quando comparadas com as amostras oculares e nasais, existe uma diferença estatisticamente significativa para amostras vaginais positivas. Os resultados moleculares obtidos neste estudo parecem sugerir, numa primeira abordagem, uma excreção viral por via vaginal superior à das vias ocular e nasal. No entanto, apesar destes resultados, as amostras nasais foram aquelas em que o rendimento da extração de DNA foi menor, tendo sido obtidas concentrações de DNA mais baixas. Em oposição, as amostras vaginais, prepuciais e, em menor grau, oculares foram aquelas em que se obteve uma maior concentração de DNA. Assim, as diferenças nas frequências de positividade à deteção molecular podem estar, também, relacionadas com o diferente conteúdo celular obtido nas várias zaragatoas e com a consequente variabilidade na concentração do DNA isolado, que pode, quando esta é mais reduzida, diminuir a sensibilidade da reação de PCR. Estes resultados podem ser úteis para o clínico no momento da colheita das amostras, pois vêm reforçar a importância da recolha de zaragatoas em mais do que uma localização, por forma a avaliar os diferentes tipos de excreção viral em animais adultos, conforme descrito por Greene (2012). Nos locais onde o conteúdo celular obtido na zaragatoa é mais reduzido, como acontece ao nível nasal, podemos sugerir a recolha de mais do que uma zaragatoa, de forma a aumentar a sensibilidade da deteção molecular.

Neste trabalho, os dois animais testados anteriormente para HVC-1, através de zaragatoas vaginais, encontravam-se negativos para o mesmo tipo de amostra à data da segunda recolha e apresentaram um título de Ac anti-HVC-1 de 674 e 907 (gráfico 10). No entanto, obteve-se um resultado duvidoso e um resultado positivo para zaragatoas oculares nestes animais. Estes resultados evidenciam a importância de testar os animais periodicamente e de avaliar a excreção em várias localizações anatómicas. Por outro lado, na análise destes resultados deve ter-se em consideração a capacidade de latência do HVC-1 nos gânglios nervosos e outros tecidos (Poulet et al., 2001). Um resultado negativo para zaragatoas oculares, nasais, vaginais ou prepuciais apenas indica não existir excreção viral e não confirma a não-infeção do animal. A pesquisa do agente nos gânglios seria mais invasiva, mas permitiria averiguar a latência do agente no hospedeiro.

Vários estudos apontam para uma elevada seroprevalência na Europa, com valores que variam entre 6% e 88% (Castro et al., 2022; Papageorgiou et al., 2016; Rijsewijk et al., 1999;

Reading & Field, 1999; Ronsse et al., 2002). No presente trabalho, foi obtida uma seroprevalência de 100%. Como já descrito anteriormente, esta variabilidade de resultados pode ser devida à utilização de diferentes técnicas de diagnóstico, dificultando a comparação de resultados.

Vários autores descrevem uma variação do título de Ac ao longo do tempo, correlacionada com a latência do vírus e a sua reativação viral (Ledbetter *et al.*, 2009; Ronsse et al., 2005; Rootwelt et al., 2011), demonstrando a importância da testagem de vários animais da mesma coletividade e a retestagem do mesmo indivíduo, principalmente de cadelas gestantes (Ronsse et al., 2005). , Em 81,82% (9/11) dos animais com títulos de Ac considerados elevados (>900), foi detetado HVC-1 em, pelo menos, uma das zaragatoas testadas, o que pode refletir uma resposta imunitária robusta, derivada de uma infecção recente.

No presente trabalho não foi possível avaliar variáveis como a dimensão populacional, as condições de higiene ou a presença de tosse do canil nos canis em estudo. No entanto, seria interessante avaliar de que forma estes fatores podem influenciar a disseminação e retenção do HVC-1 na população de canis de criação em Portugal. Segundo a literatura consultada, estes são fatores de risco para o aparecimento de doença (Evermann et al., 2011; Ronsse et al., 2004) e animais expostos aos mesmos apresentam títulos de Ac mais elevados, principalmente fêmeas (Ronsse et al., 2004).

Nas coletividades amostradas devem ser implementadas medidas profiláticas de forma a reduzir a infecção das ninhadas e salvaguardar a saúde da população. Estas medidas devem passar pela implementação de protocolos de vacinação das progenitoras durante a gestação, com 5 semanas de intervalo entre cada dose. O primeiro momento de vacinação deve ocorrer durante a reprodução ou alguns dias depois e o segundo duas semanas antes da data prevista de parto, conferindo proteção aos cachorros até às 3 primeiras semanas de vida. A ingestão do colostro até às 8 horas de vida é fundamental para a passagem dos Ac vacinais da progenitora para as crias (Rootwelt et al., 2011). Deve, ainda, fazer-se a medição do título de Ac das cadelas gestantes, por forma a separar as cadelas seronegativas das restantes, durante a gestação e nas 6 semanas após o parto (Greene, 2012). Apesar de ainda não se encontrar comprovada a correlação entre a monta natural e a transmissão de HVC-1, está recomendada a inseminação artificial nestas coletividades (Green, 2012). Como forma de profilaxia, recomenda-se, ainda, que sejam mantidas condições de higiene adequadas (Rootwelt et al., 2011), a densidade populacional deve ser diminuída, a exposição a condições de stress, como o transporte para concurso de cadelas

gestantes, deve ser reduzida e é fundamental proceder-se ao tratamento de doenças concomitantes. Os animais positivos devem, ainda, ser mantidos separados dos negativos (Rootwelt *et al.*, 2011).

A comparação dos resultados apresentados neste estudo com outros trabalhos deve ser feita de forma cautelosa. Para além de existirem poucos estudos recentes sobre HVC-1, não existe um teste de diagnóstico padronizado para este agente, sendo que diversos autores, descrevem a utilização de diferentes técnicas moleculares e serológicas. Desta forma, a utilização de diferentes metodologias não permite estabelecer intervalos de títulos de Ac anti-HVC-1 que possam ser utilizados para avaliar o estado imunológico dos animais.

Na interpretação dos resultados aqui apresentados deve, ainda, ter-se em consideração que, em 25,93% dos resultados negativos ou duvidosos para pesquisa de DNA viral, também não foi possível a amplificação do fragmento do gene da β -actina, ou essa amplificação foi negativa ou duvidosa. Nestas circunstâncias, seria desejável que tivesse sido feita a recolha de duas zaragatoa, no sentido de clarificar se a ausência de amplificação corresponde, ou não, a verdadeiros resultados negativos. Dada a inexistência dessa segunda zaragatoa, não foi possível esclarecer esta questão.

A técnica de PCR em tempo real, quando comparada com a PCR convencional, apresenta como vantagens a maior sensibilidade da deteção e a possibilidade de quantificação da carga viral (Decaro *et al.*, 2010). Para estudos futuros, seria interessante a utilização da PCR em tempo real, de forma a obter uma melhor caracterização da infeção por HVC-1 e da excreção viral nas diferentes localizações anatómicas.

O presente trabalho pretendeu colmatar a escassa informação existente em Portugal sobre infeção pelo HVC-1 em Portugal. Os elevados valores de infeção observados pelo diagnóstico molecular (77,50%) não encontram paralelo nos estudos anteriormente realizados em Portugal (Dias, 2018; Figueiredo, 2023). Até ao presente, apenas Figueiredo (2023) havia descrito o diagnóstico molecular de HVC-1 positivo em dois animais. No que respeita à seroprevalência, Dias (2018) descreve a deteção de anticorpos IgG anti-HVC-1 em 48,9% dos cães analisados (24/49); contudo, a comparação com o presente estudo deverá ser feita com cautela, uma vez que a deteção de IgG anti-HVC-1 foi feita pela técnica de imunofluorescência indireta.

Numa perspetiva de continuidade deste trabalho, seria interessante a comparação dos sinais clínicos apresentados pelos animais no momento da recolha das amostras, que não foi possível fazer no presente trabalho, e a comparação dos mesmos com os resultados para cada tipo de zaragatoa. Para além disso, apesar de ter sido avaliada a excreção viral em machos, o presente estudo não se focou na transmissão venérea de HVC-1, o que seria importante em trabalhos futuros.

Os resultados descritos na presente dissertação, evidenciam elevadas frequências de infeção e de seropositividade, vindo complementar alguns dados descritos em investigações anteriores. Este estudo reforça, assim, a necessidade de implementar medidas de prevenção, no sentido de limitar a disseminação do agente infeccioso, reduzir o impacto na saúde dos animais e evitar perdas económicas para o criador. Mostram, ainda, que é necessária a realização de mais estudos em Portugal, com uma amostra mais representativa das coletividades do país. Estes estudos possibilitariam a criação de protocolos profiláticos mais efetivos e a padronização do diagnóstico deste agente.

5. Conclusão

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar, por diagnóstico molecular, a frequência da infeção por HVC-1, em quatro canis de criação da RMLVT, comparando, ainda, a excreção viral a nível ocular, nasal e genital. Foi, ainda, intenção deste estudo determinar a seroprevalência de anticorpos anti-HVC-1 nos animais destas coletividades.

Os objetivos estabelecidos para este trabalho foram conseguidos, tendo, no conjunto dos quatro canis em estudo, sido detetada uma frequência média de infeção por HVC-1 de 77,50% e uma seroprevalência de 100%, valores que alertam para a presença ubíqua de HVC-1 nestas coletividades.

Relativamente ao local de excreção, foi detetado DNA viral em todas as localizações anatómicas analisadas, embora a frequência de resultados positivos tenha sido mais elevada a nível vaginal e prepucial, sendo estas, também, as localizações onde se obtiveram maiores concentrações de DNA extraído das zaragatoas. Estes resultados, apontam para a importância do diagnóstico da infeção em várias localizações anatómicas e da recolha de amostras em duplicado, no sentido de aumentar a sensibilidade da deteção.

A elevada frequência de infeção por HVC-1 observada na população em estudo, realça a importância do manejo adequado dos animais nestas coletividades e a necessidade de implementar medidas de prevenção da transmissão do vírus nestes locais.

O presente trabalho veio contribuir com informação adicional e essencial para aprofundar o conhecimento atualmente existente sobre a epidemiologia e a dinâmica de transmissão do HVC-1 em Portugal.

6. Referências Bibliográficas

- Anvik, J. O. (1991). Clinical considerations of canine herpesvirus infection. *Veterinary Medicine*, 86 (4), 394–403.
- Appel, M. J., Menegus, M., Parsonson, I. M., & Carmichael, L. E. (1969). Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *American journal of veterinary research*, 30(12), 2067–2073.
- Autumn, P. Jane, E. & Margret, L. (2012). Canine Herpesvirus Infection In: C. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (5thEd., pp.301 - 309). London: Elsevier
- Bujko, M., Sulović, V., Zivanović, V., Lako, B., & Dotlić, R. (1988). Effect of progesterone and pregnancy on the replication of herpes simplex virus type 2 in vivo. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 15(1-2), 34–37.
- Burr, P. D., Campbell, M. E., 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. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(96\)01227-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01227-8)
- Carmichael L. E. (1970). Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 156(12), 1714–1721.
- Carmichael, L. E. (2004). Neonatal Viral Infections of Pups: Canine Herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus-1). In L. E. Carmichael (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Disponível em <https://www.ivis.org/library/recent-advances-canine-infectious-diseases/neonatal-viral-infections-of-pups-canine#read>
- Carmichael, L. E., & Medic, B. L. (1978). Small-plaque variant of canine herpesvirus with reduced pathogenicity for newborn pups. *Infection and immunity*, 20(1), 108–114. <https://doi.org/10.1128/iai.20.1.108-114.1978>
- Carmichael, L. E., Barnes, F. D., & Percy, D. H. (1969). Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *The Journal of infectious diseases*, 120(6), 669–678. <https://doi.org/10.1093/infdis/120.6.669>
- Carmichael, L. E., Strandberg, J. D., & Barnes, F. D. (1965). Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. *Proceedings of the Society for Experimental*

Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 120(3), 644–650. <https://doi.org/10.3181/00379727-120-30614>

Castro, M. D. S., David, M. B. M., Gonçalves, E. C., Siqueira, A. S., Virgulino, R. R., & Aguiar, D. C. F. (2022). First molecular detection of canine herpesvirus 1 (CaHV-1) in the Eastern Brazilian Amazon. *Journal of veterinary science*, 23(2), e18. <https://doi.org/10.4142/jvs.21202>

Chelaru, A. (2014). Epidemiological, Chemical and Immunological Research in Canine Herpesviruses (Dissertation). University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Rumania.

Cobzariu D., Necula G.A., Baraitareanu S., Stefan G., Danes D. (2018). Canine herpesvirus-1 specific seroconversion and clinical aspects in kennel dogs from Romania. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*, Vol. LXIV, Issue 2, 23-28

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 = Zuchthygiene*, 44(1), 128–131. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01008.x>

Decaro, N., Amorisco, F., Desario, C., Lorusso, E., Camero, M., Bellacicco, A. L., Sciarretta, R., Lucente, M. S., Martella, V., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.021>

Decaro, N., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2008). Canine adenoviruses and herpesvirus. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 38(4), 799–viii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.02.006>

Dias, M.A. (2018). Análise molecular e serológica de herpesvírus canino (CHV-1) em canídeos de canis da Região de Lisboa e Vale do Tejo e do Distrito de Coimbra. *Dissertação de mestrado*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

Erles, K., & Brownlie, J. (2005). Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennelled dog populations. *Archives of virology*, 150(8), 1493–1504. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0533-x>

Erles, K., Dubovi, E. J., Brooks, H. W., & Brownlie, J. (2004). Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4524–4529. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4524-4529.2004>

European Medicines Agency (EMA). (2002). Eurican Herpes 205. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/eurican-herpes-205-epar-medicine-overview_en.pdf

European Medicines Agency (EMA). (2008). Eurican Herpes 205. In Annex 1. Summary of product characteristics. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/vetdocs/PDFs/EPAR/euricanherpes/V-059-Plen.pdf>

Evermann, J. F., Ledbetter, E. C., & Maes, R. K. (2011). Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 41(6), 1097–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.08.007>

Figueiredo, F. M. (2023). Detecção molecular de herpesvírus canino no trato genital de cadelas nas diferentes fases do ciclo éstrico (Dissertação de Mestrado), Universidade Lusofona, Lisboa.

Gracin, K., Mauric Maljkovic, M., Barbic, L., Staresina, V., Lojkic, M., & Stevanovic, V. (2023). A retrospective cohort study of canid herpesvirus-1 seroprevalence and epidemiology in kennel dogs in Croatia. *Research in veterinary science*, 158, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.03.015>

Greer, M.L. (2014). *Canine Reproduction and Neonatology* (1st ed.). Teton NewMedia. <https://doi.org/10.1201/b17885>

Hashimoto, A., Hirai, K., Suzuki, Y., & Fujimoto, Y. (1983). Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *American journal of veterinary research*, 44(4), 610–614.

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), 844–850.

Krogenæs, A., Rootwelt, V., Larsen, S., Sjøberg, E. K., Akselsen, B., Skår, T. M., Myhre, S. S., Renström, L. H., Klingeborn, B., & Lund, A. (2012). A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population. *Theriogenology*, 78(1), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.031>

- Krogenæs, A., Rootwelt, V., Larsen, S., Renström, 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. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-19>
- 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
- 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. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0092-9>
- Ledbetter E. C. (2013). Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *New Zealand veterinary journal*, 61(4), 193–201. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.768151>
- Ledbetter, E. C., Spertus, C. B., Pennington, M. R., Van de Walle, G. R., Judd, B. E., & Mohammed, H. O. (2015). In Vitro and In Vivo Evaluation of Cidofovir as a Topical Ophthalmic Antiviral for Ocular Canine Herpesvirus-1 Infections in Dogs. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 31(10), 642–649. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0024>
- Ledbetter, E. C., Kim, S. G., Dubovi, E. J., & Bicalho, R. C. (2009). Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary microbiology*, 138(1-2), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.013>
- Lust, G., & Carmichael, L. E. (1971). Suppressed synthesis of viral DNA, protein, and mature virions during replication of canine herpesvirus at elevated temperature. *The Journal of infectious diseases*, 124(6), 572–580. <https://doi.org/10.1093/infdis/124.6.572>
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., & Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta tropica*, 116(3), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.001>
- Martina, B. E. E., Harder, T. C., & Osterhaus, A. D. M. E. (2003). Genetic characterization of the unique short segment of phocid herpesvirus type 1 reveals close relationships among alphaherpesviruses of hosts of the order Carnivora. *The Journal of general virology*, 84(Pt 6), 1427–1430. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19005-0>
- Mertz G. J. (1993). Epidemiology of genital herpes infections. *Infectious disease clinics of North America*, 7(4), 825–839.

- Papageorgiou, K. V., Suárez, N. M., Wilkie, G. S., McDonald, M., Graham, E. M., & Davison, A. J. (2016). Genome Sequence of Canine Herpesvirus. *PloS one*, 11(5), e0156015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156015>
- Percy, D. H., Olander, H. J., & Carmichael, L. E. (1968). Encephalitis in the newborn pup due to a canine herpesvirus. *Pathologia veterinaria*, 5(2), 135–145. <https://doi.org/10.1177/030098586800500205>
- Piewbang, C., Rungsipat, A., Poovorawan, Y., & Techangamsuwan, S. (2017). Development and application of multiplex PCR assays for detection of virus-induced respiratory disease complex in dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 78(12), 1847–1854. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0342>
- Poulet, H., Guigal, P. M., Soulier, M., Leroy, V., Fayet, G., Minke, J., & Chappuis Merial, G. (2001). Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *The Veterinary record*, 148(22), 691–695. <https://doi.org/10.1136/vr.148.22.691>
- 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 (London, England : 1997)*, 200(2), 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.001>
- Reading, M. J., & Field, H. J. (1999). Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. *Research in veterinary science*, 66(3), 273–275. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1998.0222>
- Reagan, K. L., & Sykes, J. E. (2020). Canine Infectious Respiratory Disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 50(2), 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.10.009>
- Rezaei, M., Jajarmi, M., Kamani, S., Khalili, M., & Babaei, H. (2023). Prevalence of canine herpesvirus 1 and associated risk factors among bitches in Iranian breeding kennels and farms. *Veterinary medicine and science*, 9(6), 2497–2503. <https://doi.org/10.1002/vms3.1246>
- Richardson J. A. (2000). Accidental ingestion of acyclovir in dogs: 105 reports. *Veterinary and human toxicology*, 42(6), 370–371.
- Rijsewijk, F. A., Luiten, E. J., Daus, F. J., van der Heijden, R. W., & van Oirschot, J. T. (1999). Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Veterinary microbiology*, 65(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00285-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00285-5)

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(4), 619–636. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00249-8)

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; Zuchthygiene*, 37(5), 299–304. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00363.x>

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(1), 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.016>

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(1-2), 139–145.

Sagazio, P., Cirone, F., Pratelli, A., Tempesta, M., Buonavoglia, D., Sasanelli, M., & Rubino, G. (1998). Infezione da herpesvirus del cane: diffusione sierologica in Puglia. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 5, 63-67.

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), 1140–1147. <https://doi.org/10.2460/ajvr.77.10.1140>

Ström Holst, B., Hagberg Gustavsson, M., Grapperon-Mathis, M., Lilliehöök, I., Johannisson, A., Isaksson, M., Lindhe, A., & Axné, E. (2012). Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, 362–365. <https://doi.org/10.1111/rda.12099>

Takumi, A., Kusanagi, K., Tuchiya, K., Xuan, X. N., Azetaka, M., & Takahashi, E. (1990). Serodiagnosis of canine herpesvirus infection--development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, 52(2), 241–250. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.52.241>

- 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. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(03\)00157-8](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(03)00157-8)
- Thompson, H., Wright, N. G., & Cornwell, H. J. (1972). Canine herpesvirus respiratory infection. *Research in veterinary science*, 13(2), 123–126.
- 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.
- Willoughby, K., Bennett, M., McCracken, C. M., & Gaskell, R. M. (1999). Molecular phylogenetic analysis of felid herpesvirus 1. *Veterinary microbiology*, 69(1-2), 93–97. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00094-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00094-2)
- Yeşilbağ, K., Yalçın, E., Tuncer, P., & Yılmaz, Z. (2012). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Research in veterinary science*, 92(1), 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.016>

7. Apêndices

Apêndice A

Questionário sobre Herpesvírus canino tipo I

Nome do animal: _____ Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Vacinação para Herpesvírus? (em Agosto 2022): Sim ____ Não ____

Nº de partos precedentes (até Agosto 2022): _____

História de infertilidade? (até Agosto 2022): 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 21 dias)? Sim ____ Não ____

Outro:

Teve patologias genitais?: Sim ____ Não ____

Se sim, quais?:

Apêndice B

Figura B1 – Poster apresentado no III Encontro de investigação da FMV-ULusófona, onde recebeu a distinção de melhor poster, no dia 15 de Junho de 2024.

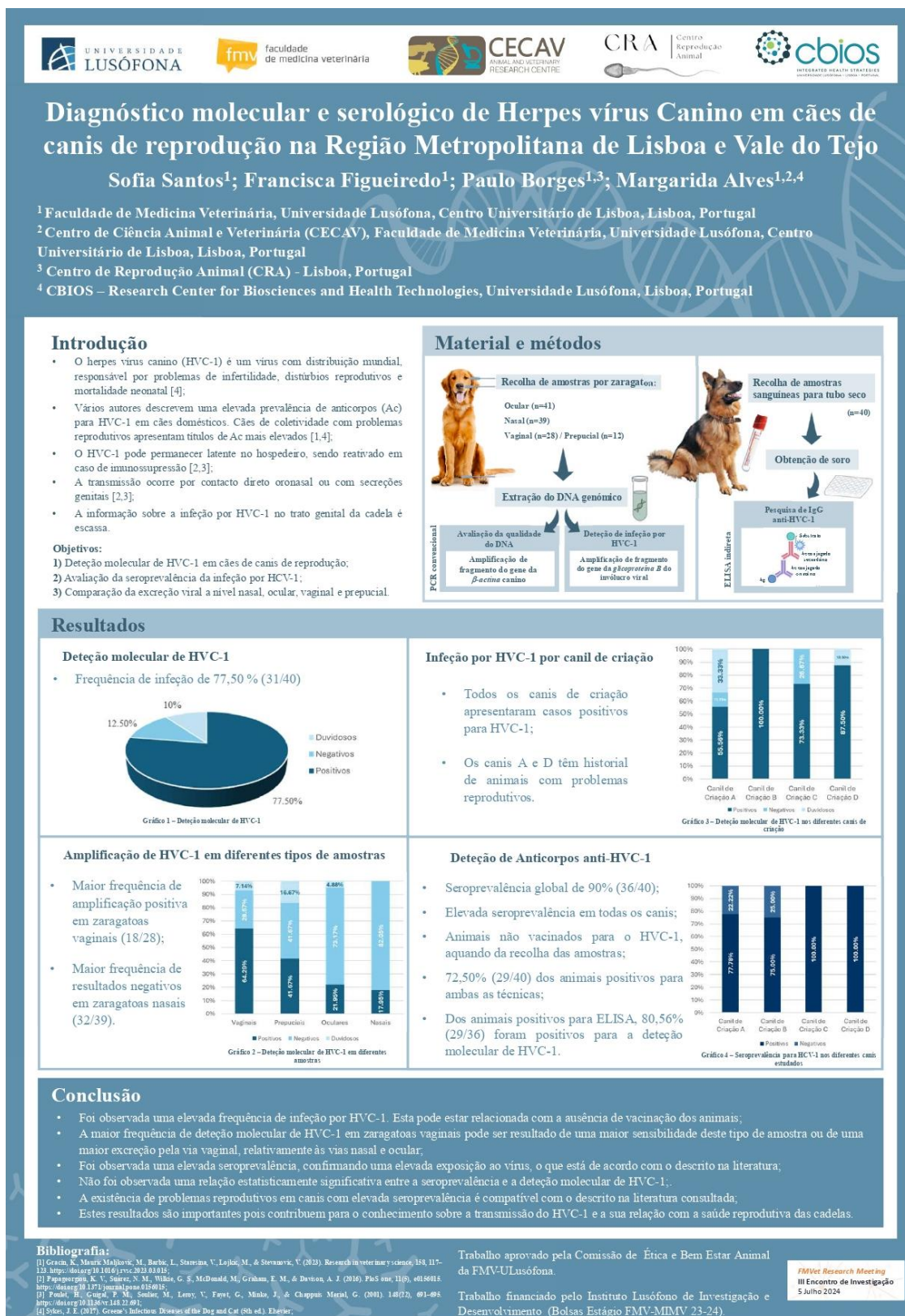


Figura B2 – Poster apresentado no Congresso Montenegro nos dias 11 e 12 de Outubro de 2024.

