

Ana Margarida Gomes de Sousa

HERPESVÍRUS:

CUIDADOS DE ENFERMAGEM VETERINÁRIA

Trabalho de Projeto

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Abril, 2014



Ana Margarida Gomes de Sousa

HERPESVÍRUS:

CUIDADOS DE ENFERMAGEM VETERINÁRIA

Trabalho de Projeto

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Trabalho efetuado sob orientação de

Dr.^a Helena Vala



Abril, 2014

“As doutrinas expressas são da exclusiva responsabilidade do autor”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais pelo amor, carinho, apoio que sempre me deram.

De seguida quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Helena Vala, e à Professora Doutora Carla Santos, pela orientação, apoio e constante disponibilidade, assim como pelas críticas, correções e sugestões determinantes na elaboração deste Projeto.

Ao Doutor Abel Fernandes e restante corpo clínico do Hospital Veterinário de Viseu – SOS Animal, obrigado! Quero agradecer-lhes não só pela ajuda neste projeto como também por me terem ensinado a ser uma Enfermeira Veterinária melhor, por me terem sempre tratado como parte da família SOS Animal.

Um agradecimento especial á Engenheira Filomena Cunha e à Professora Maria José, pela participação e ajuda no projeto.

Obrigado ao Doutor Bruno Pina e à Doutora Marta Correia do laboratório INNO® pela colaboração incansável.

Quero ainda agradecer ao Professor Doutor Joaquim Henriques não só pela contribuição, que tanto enriqueceu este Projeto, como também a oportunidade que me proporcionou de fazer parte de uma equipa fantástica no Centro Veterinário Berna. Agradeço ainda a colaboração incansável do Doutor Ricardo Felisberto fundamental para a conclusão do Projeto.

Obrigado ao André por me fazer sorrir todos os dias, pelo apoio incondicional e pelo incentivo quando a vontade era pouca.

Aos meus amigos, Ana e Renato (os melhores do mundo), sem vocês o mundo era sem dúvida muito mais monótono, sem piadinha nenhuma. Obrigado aos dois por toda amizade e carinho.

Por ultimo, um agradecimento muito especial à minha Nina, pela inspiração e amor incondicional.

RESUMO

O herpesvírus está disseminado na população canina mundial, com uma seroprevalência de cerca de 40 a 80%. A infecção por herpesvírus canino causa elevadas taxas de mortalidade em cachorros e em cães adultos pode permanecer em estado latente ou ser reativado.

A infecção por este vírus em canis de reprodução representa grandes perdas económicas, pelo que se pretende estudar a seroprevalência de herpesvírus em 52 cães pertencentes a dois canis de reprodução, para fins de venda de cães de raça. Foram analisados animais de ambos os sexos e com idades compreendidas entre 1 e 8 anos de idade. Devido a inexistências de terapia para cachorros com sintomatologia de infecção por HVC-1 pretende-se formular um protocolo de cuidados para ninhadas, suspeitas de serem portadoras deste vírus, e para os restantes cães da colónia.

Estão descritos estudos que indicam o HVC-1 como um dos agentes indiretamente envolvidos na etiologia do linfoma canino, pelo que se procurou estudar a sua seroprevalência numa amostra de 28 cães com linfoma, sendo um dos objetivos a deteção de anticorpos HVC-1, nestes animais.

PALVRAS CHAVE: Herpesvírus canino, Linfoma, morte neonatal, problemas reprodutivos

ABSTRACT

The herpes virus is widespread in the world dog population with a prevalence of 40% to 80%. Infection by HCV-1 cause high mortality rates in puppies, and in adult dogs can remain latent or be reactivated.

Infection by this virus in breeding kennels represents great economic losses, so the aim of this project it is to study the seroprevalence of HVC-1 in 52 dogs belonging to two breeding , that have the purpose of selling purebred dogs. Animals of both sexes and aged between 1 and 8 years of age were analyzed. Due to the nonexistence of a therapy for dogs with symptoms of infection by HCV -1 we to formulated a protocol of special care of litters suspected of being carriers of this virus , and to the other dogs from the colony.

Reported studies indicate that the HCV -1 as one of the agents indirectly involved in the etiology of canine lymphoma, so we sampled 28 dogs with lymphoma , with the aim of detect HCV -1 antibodies in those animals.

KEY WORDS: Canine herpes virus, lymphoma, neonatal death, reproductive problems

ÍNDICE GERAL

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE GERAL	viii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABELAS	xii
GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. HERPESVÍRUS CANINO	18
2.1. SEROPREVALENCIA	21
2.2. PATOGÉNESE E ACHADOS CLINICOS.....	23
2.2.1. INFEÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO	23
2.2.2. INFEÇÃO NEONATAL	24
2.2.3. INFEÇÃO NO APARELHO GENITAL DE CAES ADULTOS.....	29
2.2.4. INFEÇÃO DO APARELHO RESPIRATORIO EM CAES ADULTOS..	30
2.2.5. DOENÇA OCULAR ASSOCIADA A HERPES VIRUS CANINO	31
2.3. DIAGNÓSTICO	33
2.3.1. ACHADOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA.....	33
2.3.2. CULTURA DE VIRUS E DETECÇÃO DE ADN VIRAL.....	34
2.3.3. SEROLOGIA	35
2.3.4. OUTROS MÉTODOS	35
2.4. TERAPIA.....	36
2.5. PROFILAXIA	37
2.5.1. COLOSTRO	38
2.5.2. VACINAÇÃO	38
3. LINFOMA CANINO	40
4. TRABALHO PRATICO	43
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	43

4.1.1. GRUPO 1	43
4.1.2. GRUPO 2	49
4.1.3. MÉTODO DE ELISA.....	51
4.2. RESULTADOS.....	53
4.3. DISCUSSAO	63
5. INFORMAÇÃO A DAR AO PROPRIETÁRIO.....	67
5.1. IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE CUIDADOS DE ENFERMAGEM EM NINHADAS SUSPEITAS DE HERPESVÍRUS	68
5.2. APLICAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE CUIDADOS PREVENTIVOS PARA O HERPESVIRUS CANINO	74
6. CONCLUSAO	77
7. BIBLIOGRAFIA	78
8. ANEXOS.....	83
8.1. ANEXO A	83
8.2. ANEXO B	87
8.3. ANEXO C.....	88

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. HERPES VÍRUS CANINO (ADAPTADO DE ROOTWELT ET AL., 2011).	19
FIGURA 2. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA PATOGÉNESE DO HERPESVIRUS CANINO (ADAPTADO DE RONSSE <i>ET AL</i> , 2003).	24
FIGURA 3. HEMORRAGIA RENAL CARACTERÍSTICA DE INFEÇÃO POR HERPES VÍRUS CANINO (ADAPTADO DE ROOTWELT ET AL, 2011).	26
FIGURA 4. LOCAL DE NECROSE E HEMORRAGIA NUMA SECÇÃO DE RIM COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA A AMPLIAÇÃO DE 200 X (ADAPTADO DE ROOTWELT ET AL, 2011)	27
FIGURA 5. ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS VIAS E FASES DE INFEÇÃO POR HVC-1 EM NINHADAS (ADAPTADO DE EVERMANN, 2010).	28
FIGURA 6. LESÕES GENITAIS POR HERPESVÍRUS CANINO EM CADELA ADULTA (ADAPTADO DE MORRESEY, 2004).....	29
FIGURA 7. PRESENÇA DE ÚLCERA SUPERFICIAL NA CÓRNEA, DETETADA DURANTE ESTUDO DE INFEÇÃO COM HERPESVIRUS CANINO (ADAPTADO DE LEDBETTER <i>ET AL</i> , 2009)	32
FIGURA 8. CONJUNTIVITE ULCERATIVA EM CÃO COM INFEÇÃO POR HVC-1 RECORRENTE (ADAPTADO DE LEDBETTER, 2013)	32
FIGURA 9. PRESENÇA DE UM CORPO DE INCLUSÃO NUM HEPATÓCITO, QUE PODE OCORRER EM INFEÇÕES POR HERPESVIRUS CANINO (ADAPTADO DE ROOTWELT, 2011).....	34
FIGURA 10. GRÁFICO ILUSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1, DO GRUPO 2.	56
FIGURA 11. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 CONSOANTE O GÉNERO, NO GRUPO 2.	59
FIGURA 12. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 CONSOANTE O ESTADO REPRODUTIVO, NO GRUPO 2.	60
FIGURA 13. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 CONSOANTE A SINTOMATOLOGIA, NO GRUPO 2	62

FIGURA 14. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 CONSOANTE O ESTADIO CLINICO, NO GRUPO 2.	63
FIGURA 15. NINHADA DE BULLDOG FRANCESES ACONDICIONADOS COM CONTROLO DE TEMPERATURA E RECURSO A LUZ DE INFRAVERMELHOS (FOTOGRAFIA GENTILMENTE CEDIDA PELO HOSPITAL VETERINÁRIO DE VISEU SOS ANIMAL)	68
FIGURA 16. ALIMENTAÇÃO COM RECURSO A BIBERON (FOTOGRAFIA GENTILMENTE CEDIDA POR HOSPITAL VETERINÁRIO DE VISEU-SOS ANIMAL).....	71
FIGURA 17. MONITORIZAÇÃO DO PESO DO NEONATO (ADAPPTADO DE MOXON & ENGLAND, 2012).....	72

INDICE DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DE ESTÁDIO DE LINFOMA DE ANIMAIS DOMÉSTICOS CONFORME A OMS (ADAPTADO DE MORTIER <i>ET AL</i> , 2012).	41
TABELA 2. GRUPO 1.....	45
TABELA 3. DIVISÃO DO NÚMERO TOTAL DE FÊMEAS DO GRUPO 1 PELO RESPECTIVO ESTADO REPRODUTIVO.....	47
TABELA 4. ANIMAIS VACINADOS CONTRA O HVC-1	47
TABELA 5. NÚMERO DE CADELAS COM HISTORIAL DE PROBLEMAS REPRODUTIVOS.	48
TABELA 6. FÊMEAS E RESPECTIVOS PROBLEMAS REPRODUTIVOS.....	48
TABELA 7. GRUPO 2.....	49
TABELA 8. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO LINFOMA, SINAIS CLÍNICOS, ESTADIO CLINICO (A- AUSÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS E B- PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS, NO MOMENTO DO DIAGNOSTICO), TRATAMENTO E TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA, DOS CASOS QUE COMPÕE O GRUPO 2.	50
TABELA 9. RESULTADOS DO TESTE PARA DETEÇÃO DE ANTICORPOS HVC-1. GRUPO 1.....	53
TABELA 10. RESULTADOS DA DETEÇÃO DE ANTICORPOS HVC-1, DE ACORDO COM A PRESENÇA DE PROBLEMAS REPRODUTIVOS PARA O GRUPO 1.....	55
TABELA 11. RESULTADOS DO TESTE PARA DETEÇÃO DE ANTICORPOS HVC-1. GRUPO 2.	55
TABELA 12. RELAÇÃO DA IDADE COMO O NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A PRESENÇA DE HVC-1 NO GRUPO 2.	57
TABELA 13. RELAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 E RESPECTIVAS RAÇAS, NO GRUPO 2.	58
TABELA 14. RELAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 E RESPECTIVO GÊNERO, NO GRUPO 2.....	58
TABELA 15. RELAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 E RESPECTIVO ESTADO REPRODUTIVO, NO GRUPO 2.....	59
TABELA 16. RELAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HVC-1 E SINTOMATOLOGIA.	61

TABELA 17. RELAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA ESTADIO CLINICO (OMS).....	62
TABELA 18. SUGESTÃO DE APRESENTAÇÃO DE UM QUADRO PARA REGISTO DA TEMPERATURA RECTAL DOS NEONATOS	69
TABELA 19. SUGESTÃO DE APRESENTAÇÃO DE UM QUADRO PARA REGISTO DO PESO VIVO DOS NEONATOS.	71

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

EBV – Vírus Epstein Barr

HVC-1 – Herpes vírus canino tipo 1

SRD – sem raça definida

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

PCR - Polymerase Chain Reaction

OMS – Organização Mundial de Saúde

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus canino (HVC-1) foi descrito pela primeira vez em 1965 por Carmichael *et al.* (1965) e classificado posteriormente como sendo um vírus do género *Varicelovirus* da subfamília *Alphaherpesviridae* (Reading&Field, 1998; Fontbonne, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Através de inúmeros estudos realizados por Ronsee *et al.* (2002), Reading & Field (1998), Rijsewijk *et al.* (1999) e Krogenaes *et al.* (2012), dentro e fora da europa, sabe-se que o herpesvírus canino está disseminado na população mundial canina, sendo que a seroprevalência deste vírus é de cerca de 40 a 88%. Percentagens mais altas estão diretamente relacionadas com o número de animais que vivem em grupo, como no caso de canis de recolha de animais ou de criação de cães de raça, bem como com a idade. Isto é, elevado número de animais, com mais de dois anos, a viver em grupo são condições propícias, predisponentes, à instalação da doença (Rijsewijk *et al.*, 1999; Morresey, 2003; Ronsse *et al.*, 2005; Acar *et al.*, 2009; Evermann&Kennedy, 2010; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012).

Para além dos fatores mencionados, o herpesvírus canino está também associado com episódios de tosse do canil, más práticas de higiene, e uso de animais, que não pertencem ao grupo do criador, para fins de reprodução (Morresey, 2003; Ronsse *et al.*, 2005; Acar *et al.*, 2009; Evermann&Kennedy, 2010; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012).

Em cães adultos, o HVC-1 é transmitido através do contacto oronasal e genital com animais infetados. Em recém-nascidos, além do contágio oronasal, este vírus pode ser transmitido ao recém-nascido durante o parto, através do contacto com as secreções da fêmea portadora de herpesvírus (Reading&Field, 1998; Morresey, 2003; Ronsse *et al.*, 2005; Acar *et al.*, 2009; Fontbonne, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Em cadelas adultas, os efeitos do vírus traduzem-se pela perda tardia da gestação, reabsorção embrionária, nascimento de cachorros inviáveis e lesões vesiculares no vestíbulo e vagina. Nos machos, a manifestação clínica do herpes vírus é muito subtil podendo apresentar petéquias e inflamação da mucosa peniana. Em ambos, machos e fêmeas, o HVC-1 pode assumir uma

vertente ocular e respiratória com sinais clínicos que incluem úlceras da córnea, tosse, secreções nasais e dificuldade em respirar, os quais, muitas vezes, passam despercebidos junto dos donos (Reading&Field, 1998; Morresey, 2003; Ronsse *et al.*, 2005; Acar *et al.*, 2009; Fontbonne, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Em cachorros portadores deste vírus o prognóstico é bem mais reservado e os sinais clínicos bastante mais severos que em animais adultos, sendo que a taxa de mortalidade em cachorros com herpesvírus canino é bastante elevada podendo atingi de 100% de taxa de mortalidade. Cachorros com menos de 3 a 2 semanas de idade infetados com HVC-1, podem apresentar distúrbios gastrointestinais e respiratórios graves, devido à incapacidade de controlarem a sua temperatura corporal, septicémia hemorrágica, hipoglicémia e necrose das extremidades, provocada por fenómenos de vasculite. A presença deste vírus em ninhadas representa grandes perdas a nível monetário em canis específicos para reprodução de cães de raça (Reading&Field, 1998; Ronsse *et al.*, 2005; Decaro *et al.*, 2008; Noakes *et al.*, 2008; Acar *et al.*, 2009; Evermann&Kennedy, 2010; Fontbonne, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

Por norma, os cães portadores de HVC-1 apresentam o vírus na sua forma latente, o qual pode ser reativado por influência de fatores externos e internos que causam imunossupressão, como tratamentos com esteroides, stresse, gestação e doenças concomitantes, sendo assim determinantes na patogenia do herpesvírus canino (Ronsse *et al.*, 2005; Noakes *et al.*, 2008; England, 2010).

Existe uma vacina contra o herpesvírus canino, com o objetivo de proteger os cachorros nonatos durante as 2 a 3 primeiras semanas de vida, através da transferência de anticorpos maternos, para tal é necessário que a cadela seja vacinada durante o período de gestação (Noakes *et al.*, 2008; Rootwelt *et al.*, 2011; Krogenaes *et al.*, 2012).

O objetivo deste trabalho passa, não só pelo estudo da seroprevalência do Herpesvírus, em canis de reprodução de cães para fins, de venda de cães de variadas raças, como pela elaboração de um plano de cuidados que os proprietários devem ter com as suas ninhadas, nomeadamente se estas forem suspeitas de serem portadoras do HVC-1, e com a restante colónia.

O Linfoma canino é das doenças hematopoiéticas mais frequentes em cães. Sabe-se que tem origem em células linfoides malignas, e que a sua

etiologia multifatorial afeta principalmente cães mais velhos e de meia-idade. O agente etiológico não é conhecido, no entanto Huang *et al* (2012), Chiu *et al* (2013), Milman *et al* (2011), descrevem a presença de anticorpos para um vírus tipo o vírus Epstein-Barr, que tem como espécie alvo o humano, em cães.

Em adição ao estudo da prevalência de herpesvírus canino este trabalho tem também por objetivo a detecção de anticorpos HVC-1 em cães com linfoma diagnosticado.

2. HERPESVÍRUS CANINO

A família *Herpesviridae* é uma família de vírus que compreende um largo espectro de hospedeiros que está presente não só nos humanos mas também em várias espécies de mamíferos, reptéis e aves, sendo que estão descritas até agora cerca de 130 espécies de Herpesvírus (Murphy *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2006; Griffin *et al.*, 2010; Maclachlan&Dubovi, 2011).

São vírus de grande dimensão, cerca de 100 a 200nm de diâmetro (Figura 1), conhecidos pela sua capacidade de provocar infeções latentes nos diferentes hospedeiros. Todas as espécies de Herpesvírus até agora conhecidas, para além da capacidade de se manterem em estado latente nas células hospedeiras, são capazes de criar situações patológicas numa infeção primária, ou quando o vírus é reativado (Murphy *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2006; Griffin *et al.*, 2010; Maclachlan&Dubovi, 2011).

Sabe-se que não há um antigénio comum a todas as famílias, sendo que a cada hospedeiro corresponde uma espécie de Herpesvírus.

A família *Herpesviridae* divide-se em três sub-famílias:

- *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* e *Gamaherpesviridae*

A maioria dos Herpesvírus de importância médico veterinária fazem parte do género *Varicellovirus* da subfamília *Alphaherpesviridae* (Carter *et al.*, 2006; Griffin *et al.*, 2010).

Existem alguns herpesvírus de importância zoonótica. O *Herpesvirus simiae* (*herpesvirus B*), tem como reservatório natural o macaco rhesus, e assim como o herpes simplex nos humanos, este tem a capacidade de causar infeção latente em macacos adultos. Profissionais da área da veterinária e investigação, que estejam em contacto com esta espécie são susceptíveis a este vírus, que pode ser transmitido ao homem por mordeduras ou lesões da pele contaminadas com saliva de primatas, e também por aerossóis através da conjuntiva, nariz e faringe (Huff&Barry, 2003; Tischer&Osterrieder, 2010).

Enquanto que, no macaco este vírus permanece em estado latente na maioria dos casos, no ser humano, se os sintomas não forem tratados com antivírico específico, a taxa de mortalidade pode chegar aos 80% (Huff&Barry, 2003; Tischer&Osterrieder, 2010).

Dentro da ordem herpesvírus, está também descrita a possibilidade de infecção de animais com herpesvírus humanos. Por exemplo, o HHV-4, ou Vírus Epstein-Barr, foi detetado em cães, levantando assim a hipótese de haver transmissão do vírus humano para os cães, devido à proximidade entre estas duas espécies, ou da existência de um gamaherpesvírus similar a este vírus (Tischer&Osterrieder, 2010; Milman et al., 2011; Chiu et al., 2013).

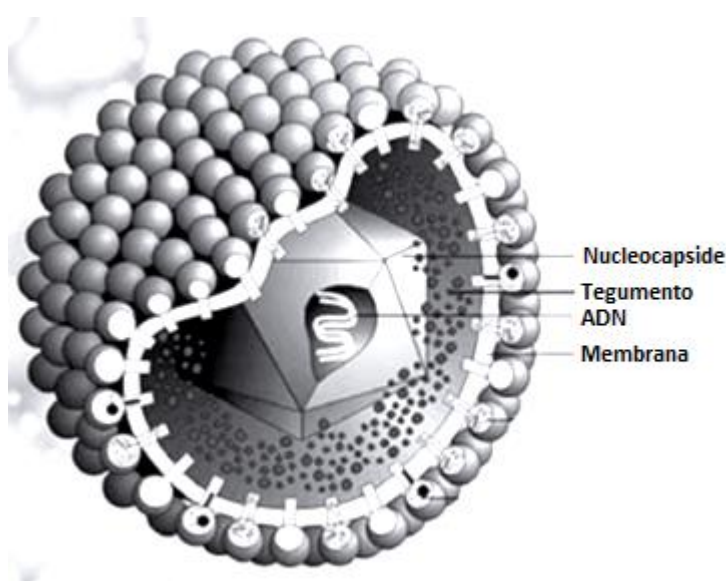


Figura 1. Herpes vírus canino (Adaptado de Rootwelt et al., 2011).

A subfamília Alphaherpesviridae está disseminada pelos humanos, animais domésticos e selvagens sendo a sua seroprevalência de cerca de 90% em algumas das espécies. O vírus é caracterizado por ter um ciclo produtivo curto e rápida disseminação, com capacidade para destruição das células hospedeiras (Davidson, 2009; Parzefall, 2010).

O Herpesvírus canino tipo 1 (HVC-1) é um vírus relativamente grande, pertencente à família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesviridae*, género *Varicellovirus* (Ronsse et al., 2003; Fontbonne, 2011; Rootwelt et al., 2011).

Tem como hospedeiros um grupo restrito de espécies, sendo que apenas é patogénico em animais domésticos e animais selvagens da família *Canidae*. Esta especificidade para determinadas espécies está relacionada com

recetores específicos existentes na superfície das células. Sabe-se que existe ainda uma proximidade genética deste vírus com o Herpesvírus felino (Haanes&Tomlinson, 1998; Nakamichi *et al.*, 2000; Carmichael, 2004; Greene, 2012).

O HVC-1 é sensível a fatores ambientais, sendo inativado após 22 horas à temperatura de 37°C e, mais rapidamente, a temperaturas mais elevadas, sendo que a temperatura ótima de replicação viral ronda os 35°C, correspondentes à temperatura encontrada nas vias respiratórias e aparelho genital. Este vírus é também sensível a variações no pH, sendo destruído quando exposto a valores de pH inferiores a 5 ou superiores a 8. Sabe-se ainda que não é resistente à maioria dos desinfetantes e solventes lipídicos como o éter ou clorofórmio (Murphy *et al.*, 1999; Morresey, 2003; Carmichael, 2004; Parzefall, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011).

Perante estes dados, podemos afirmar que o Herpesvírus canino está em ambiente ótimo para replicação, quando se encontra a temperaturas de 35 a 37°C, semelhante à temperatura encontrada não só nos cachorros durante as primeiras semanas de vida, como também nas mucosas das vias respiratórias superiores e mucosa do aparelho reprodutivo. Este fator indica que, para que seja possível a transmissão do vírus, é necessária proximidade entre animais, evitando assim a exposição do vírus ao meio ambiente (Murphy *et al.*, 1999; Morresey, 2003; Parzefall, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011).

A replicação do HVC-1 ocorre no núcleo das células, originando corpos de inclusão intranucleares, importantes para o diagnóstico de animais portadores (Greene, 2012).

Como na maioria dos vírus da subfamília *Alphaherpesviridae*, o Herpes vírus canino, durante o período de latência, expressa apenas parte do seu genoma, e localiza-se no tecido ganglionar e linfoide, nomeadamente das zonas de contágio como as zonas da mucosa oral e reprodutiva (Murphy *et al.*, 1999; Morresey, 2003; Rootwelt *et al.*, 2011).

Está também descrito que situações de stresse como proestro, gestação e parto, e estados de imunossupressão, podem reativar o vírus em estado latente, embora o mecanismo pelo qual isto acontece não se encontre descrito (Murphy *et al.*, 1999; Noakes *et al.*, 2008; Rootwelt *et al.*, 2011).

2.1. SEROPREVALENCIA

Vários estudos comprovam que o herpesvírus está presente em todos os continentes, sendo que Ronsee *et al* (2002), Reading & Field (1998), Rijsewijk *et al* (1999) e Krogenaes *et al* (2012) sugerem que o HVC-1 é comum na população canina. A prevalência traduz-se pela percentagem de uma população afetada com uma doença particular num determinado período, sendo que, estudos realizados na Bélgica, Reino Unido e Holanda revelam que a seroprevalência dos anticorpos do HVC-1 na população de cães saudáveis varia entre 40 a 88%, (Reading&Field, 1998; Carmichael, 2004; Nothling *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012; Yesilbag *et al.*, 2012).

Está descrito que quando se realizam testes serológicos, os títulos dos anticorpos são significativamente mais elevados em cães que pertencem a colónias ou canis, com registo de problemas reprodutivos (Reading&Field, 1998; Carmichael, 2004; Nothling *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012; Yesilbag *et al.*, 2012).

Num estudo realizado na Bélgica, conduzido por Ronsee *et al.* (2005) foram investigados fatores que poderiam influenciar a seroprevalência deste vírus, não tendo sido descritas diferenças entre género e raça. No entanto, os níveis de anticorpos sofriam grande variação, quando comparadas amostras de cães com diferentes idades, sendo que, animais com menos de seis meses de idade não apresentavam anticorpos e a partir dos dois anos de idade os títulos aumentavam consideravelmente (Acar *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012; Yesilbag *et al.*, 2012).

Ficou também provada a relação entre o herpesvírus e o número de animais que coabitam determinado espaço, visto que em canis, com 6 ou mais cães, se observaram títulos mais elevados do que em canis com menos de seis cães, sendo que este fator se torna mais evidente se as condições de higiene não forem as ideais (Acar *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012; Yesilbag *et al.*, 2012).

Está também demonstrado que os animais de canis com registo de episódios de tosse do canil apresentam títulos superiores para Herpesvírus (Acar *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012; Yesilbag *et al.*, 2012).

Segundo Reading & Field (1998), e tendo em conta as propriedades dos *Alphaherpesviridae*, podemos assumir que quase todos, se não todos os cães seropositivos para herpesvírus possuem o vírus na forma latente, tendo a capacidade de, posteriormente, reativar o vírus e transmitir a infeção (Reading&Field, 1998; Carmichael, 2004) .

Ronsee *et al.* (2005) estudou 27 cadelas de reprodução durante um ciclo de reprodução, para deteção de ADN viral e anticorpos específicos. Todas as cadelas que demonstraram ser negativas para presença de herpesvírus canino sofreram seroconversão ao longo do estudo. 40% das cadelas seropositivas voltaram a ser seronegativas, deixando assim a hipótese de que toda a colónia tivesse Herpesvírus, mesmo após resultado seronegativo de alguns testes. Nesse mesmo estudo foram detetados diferentes padrões para os títulos dos anticorpos consoante a fase do ciclo em que a cadela se encontrava (Ronsse *et al.*, 2005; Nothling *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2010).

Defende-se ainda que uma vez infetado com Herpesvírus, o cão irá ser portador o resto da sua vida, de forma sintomática ou assintomática (Rijsewijk *et al.*, 1999).

2.2. PATOGÉNESE E ACHADOS CLINICOS

O Herpesvírus nos cães pode manifestar-se de várias formas, dependendo da idade, género, estado imunitário e via de transmissão do vírus. A figura 2 mostra como o herpesvírus canino pode afetar o hospedeiro conforme a idade e o género.(Ronsse *et al.*, 2003; Fontbonne, 2011).

2.2.1. INFEÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO

Na cadela gestante, se o vírus for reativado, devido a fatores de stresse, como a própria gestação, ou se ocorrer uma primeira infeção pelo Herpesvírus canino, origina lesões degenerativas e necrosantes na placenta, e ainda a possibilidade de infeção do feto por via transplacentária (Morresey, 2004; Ronsse *et al.*, 2004; Noakes *et al.*, 2008; Forsberg, 2010; Maclachlan&Dubovi, 2011).

Certos estudos sugerem que a infeção durante a primeira fase de gestação pode provocar morte fetal e subsequente mumificação, enquanto a meio do tempo de gestação pode provocar aborto, e no fim do tempo de gestação, pode provocar o nascimento da cria antes da data prevista (Morresey, 2003; Ronsse *et al.*, 2004; Noakes *et al.*, 2008; Forsberg, 2010; Holst *et al.*, 2012).

No entanto, se a fêmea já tiver sido exposta a este vírus anteriormente, por norma as ninhadas são saudáveis devido a existência de anticorpos no colostro da mãe, capazes de proteger as crias deste vírus. Embora este fator varie de fêmea para fêmea é provavelmente o único fator que explica o facto de fêmeas seropositivas terem ninhadas saudáveis (Morresey, 2004; Djønne, 2007).

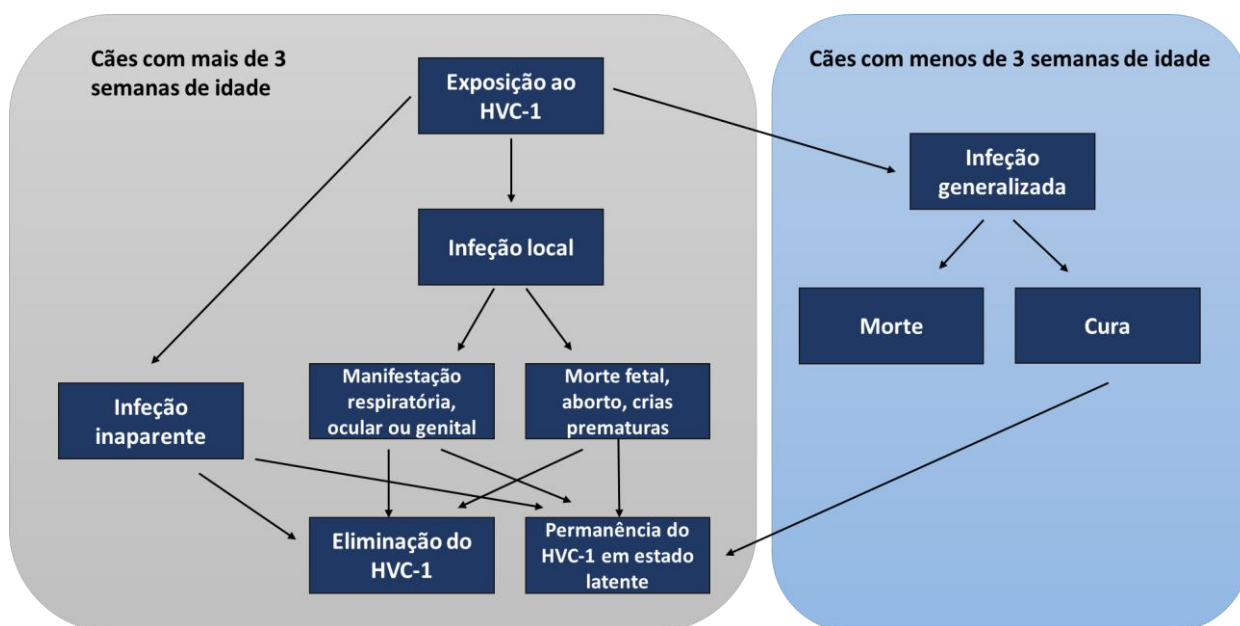


Figura 2. Esquema ilustrativo da patogênese do Herpesvirus canino (Adaptado de Ronsse *et al.*, 2003).

2.2.2. INFEÇÃO NEONATAL

A taxa de mortalidade em cachorros é caracterizada por ser bastante elevada, e reconhecida como um problema para muitos criadores de cães devido as perdas económicas. (Indrebø *et al.*, 2007; Tønnessen *et al.*, 2012).

Cachorros recém-nascidos não controlam a sua temperatura, o que os torna suscetíveis a hipotermia, e devido ao funcionamento imaturo dos rins temo risco de sofrerem desidratação aumentado. O sistema imune, ainda em desenvolvimento, torna-os vulneráveis a infeções, e as reduzidas reservas de glicogénio no fígado, aumentam a probabilidade de hipoglicemia, se houver falhas na alimentação (Simpson *et al.*, 2004; Day, 2007).

O período neonatal está definido como sendo as duas a três primeiras semanas de vida do cachorro, e durante este período a mortalidade pode dever-se a vários fatores como distocia, negligência por parte da mãe, distúrbios na nutrição, anomalias congénitas, fatores ambientais ou agentes infecciosos, sendo que as doenças infecciosas representam a segunda maior causa de mortalidade neonatal (Indrebø *et al.*, 2007; Münnich, 2008).

Os criadores de cães usam o termo “Síndrome de morte súbita em cachorros” para descrever situações em que, independentemente dos cuidados prestados, o neonato não sobrevive. A etiologia é diversa, pode dever-se a

hipotermia, aporte de nutrientes deficitário e ingestão insuficiente de colostro, trauma, deformações congénitas, peso vivo abaixo do normal e por fim as infeções por bactérias ou vírus, da qual faz parte o Herpesvírus canino como agente etiológico (Gill, 2001; Indrebø *et al.*, 2007; Ranjan, 2010; Greene, 2012; Tønnessen *et al.*, 2012)

O Herpesvírus canino está descrito como sendo a infeção viral mais comum e violenta em cachorros neonatos, podendo atingir taxas de mortalidade de 100% numa ninhada (Carmichael, 2004; Decaro *et al.*, 2008).

A manifestação de sinais clínicos pode variar dentro da mesma ninhada, sendo que o facto de um cachorro apresentar sinais clínicos não significa que toda a ninhada seja portadora deste vírus (Davidson, 2003; Morresey, 2004; Evermann&Kennedy, 2010) .

A idade com que o cachorro, portador de HVC-1, começa a manifestar sinais clínicos depende do período de infeção. A morte de cachorros durante a primeira semana de vida indica ocorrência de infeção pré-natal, no entanto se os sinais clínicos se manifestarem entre a primeira e a terceira semana de vida indica que ocorreu infeção durante o período pós-natal. Sabe-se ainda que o período de incubação é de cerca de 3 a 7 dias após infeção (Morresey, 2004; Evermann&Kennedy, 2010; Greene, 2012; Kustritz, 2012).

A infeção pode ocorrer durante a passagem pelo canal do parto, através do contacto com a mucosa, mais comumente, por contacto com secreções oronasais da progenitora ou outros cães do canil, ou através de cachorros da mesma ninhada infetados com HVC-1. Grande parte dos cachorros portadores de HVC-1 acabam por morrer entre a primeira e a terceira semana de idade, no entanto, se o cachorro sobreviver durante este período as hipóteses de sobrevivência aumentam, mesmo com exposição ao vírus (Carmichael, 2004; Evermann&Kennedy, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012; Kustritz, 2012).

Por norma, o cachorro pode sobreviver 1 a 3 dias, desde a manifestação dos sinais clínicos até à morte, sendo que, com base nos dados descritos anteriormente, sabe-se que o período de maior perigo é de três semanas antes do parto e três semanas depois do parto (Carmichael, 2004; Evermann&Kennedy, 2010).

Após inoculação, o vírus replica-se nas células epiteliais e ganglionares e difunde-se depois pelo sistema sanguíneo, através dos monócitos. A virémia

ocorre no terceiro ou quarto dia após infecção. A concentração do vírus é maior nos rins, nas glândulas adrenais, pulmões, fígado e baço, onde ocorrem a maioria dos danos endoteliais com vasculite necrosante nos vasos sanguíneos, o que dá origem a processos de necrose e hemorragias (Figura 3 e Figura 4) nos diferentes órgãos (Poulet, 2001; Evermann&Kennedy, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011).

O processo de infecção por este vírus é normalmente seguido de trombocitopénia generalizada. O HVC-1 pode ser transportado, posteriormente ao longo dos axónios até ao sistema nervoso central, causando meningoencefalite, embora os sinais clínicos desta fase não sejam frequentes, uma vez que geralmente os cachorros morrem antes da manifestação dos mesmos (Carmichael, 2004).

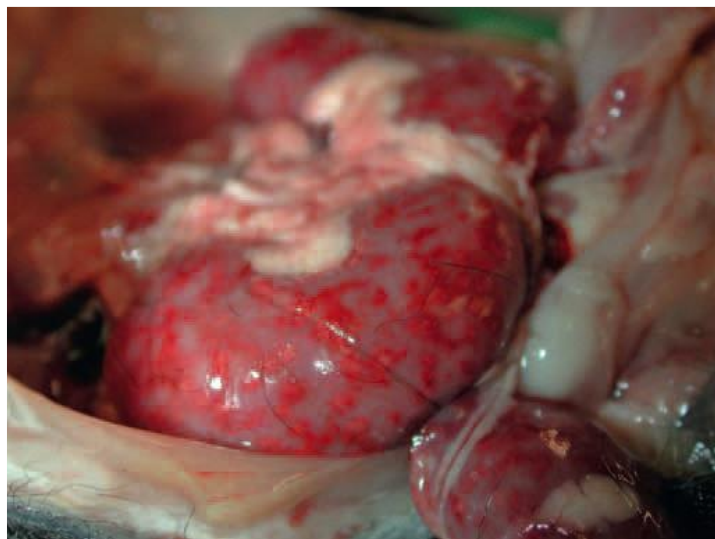


Figura 3. Hemorragia renal característica de infecção por herpes vírus canino (Adaptado de Rootwelt *et al.*, 2011).

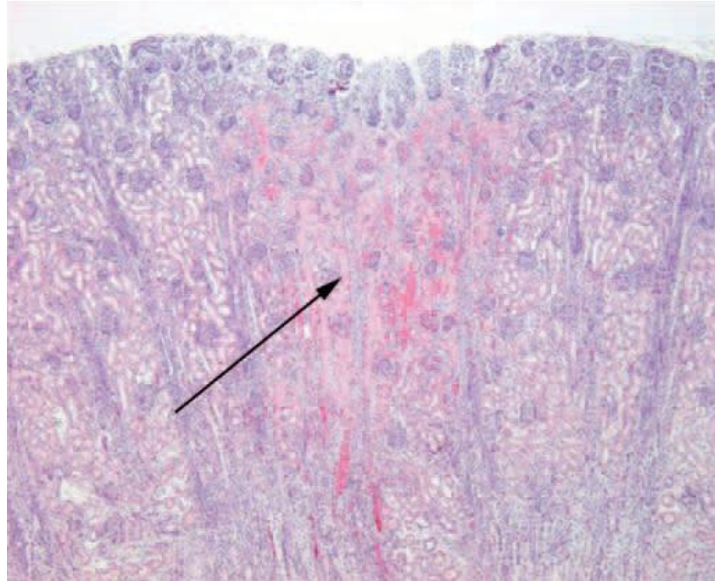


Figura 4. local de necrose e hemorragia numa secção de rim com coloração de Hematoxilina-eosina a ampliação de 200 x (Adaptado de Rootwelt et al, 2011)

Outro dos sinais clínicos associados ao herpesvírus são as lesões oculares e as displasias da retina, que se devem ao facto do desenvolvimento da retina ocorrer nas primeiras semanas de vida do cachorro (Rootwelt *et al.*, 2011).

O facto da cadela ser portadora de herpesvírus é um fator importante na progressão da infeção nos cachorros, por exemplo no caso de transmissão de herpes vírus à ninhada por outros animais do canil, sendo a progenitora sero negativa o desenvolvimento de infeção nesta ninhada terá consequências muito mais graves do que a progressão da infeção numa ninhada protegida com anticorpos de uma progenitora seropositiva (Figura 5) (Rootwelt *et al.*, 2011).

A progressão da doença é rápida com um prognóstico muito reservado. Os sinais clínicos apresentados pelo cachorro incluem recusa da mama ou biberon, letargia, dor abdominal e choro. Ocasionalmente, pode ser observada diarreia sanguinolenta, descarga nasal e hemorragia abdominal (Evermann&Kennedy, 2010; Kustritz, 2012).

O motivo pelo qual os cachorros com menos de 4 semanas de vida são vulneráveis a este vírus, evidenciando sinais clínicos severos, prende-se essencialmente com o facto destes não serem capazes de regular a sua temperatura corporal, que por norma se encontra 1 a 1,5 graus abaixo da

temperatura normal de um cão adulto, dificuldade esta que é agravada pela febre provocada pela infecção (Rootwelt *et al.*, 2011).

Apesar de poderem apresentar tremores, os cachorros não são capazes de elevar a temperatura corporal. Por fim o cachorro fica inconsciente, com possibilidade de ocorrência de opistótono e espasmos imediatamente antes de ocorrer morte (Carmichael, 2004; Fontbonne, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

Cachorros que sobrevivem podem desenvolver sinais neurológicos como ataxia, cegueira e alterações do equilíbrio. Quando são infectados por HVC-1 a partir das três semanas de idade podem desenvolver lesões oftalmológicas e neurológicas, secundárias a meningoencefalite não supurativa (Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012).

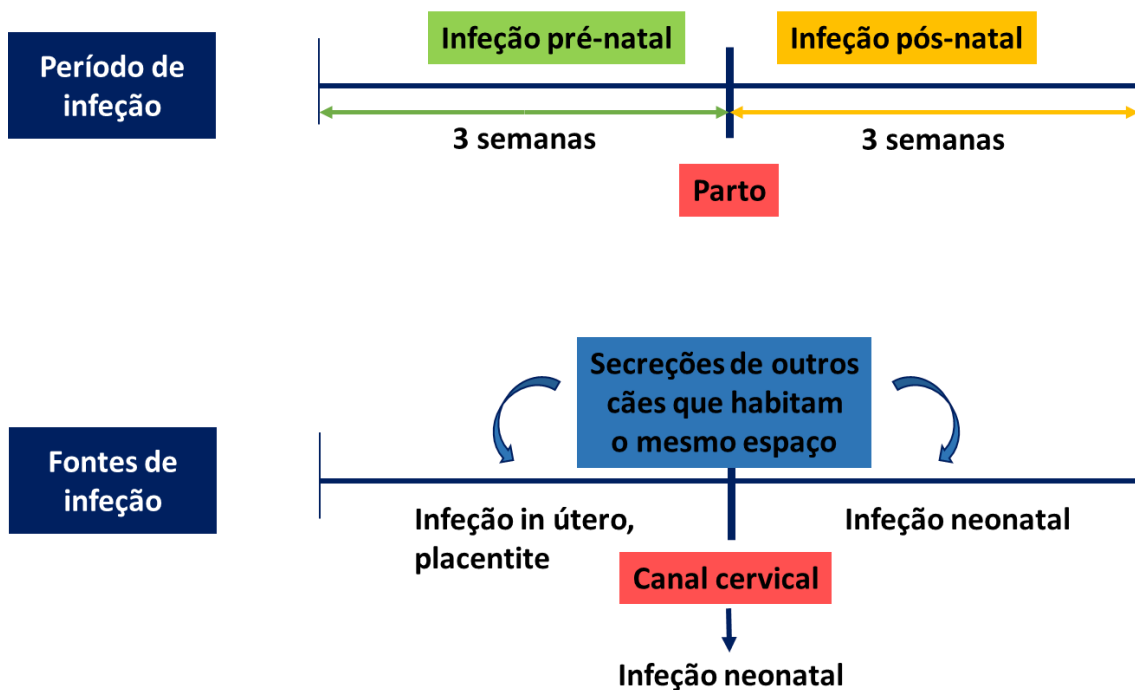


Figura 5. Esquema representativo das vias e fases de infecção por HVC-1 em ninhadas (Adaptado de Evermann, 2010).

2.2.3. INFEÇÃO NO APARELHO GENITAL DE CAES ADULTOS

O herpesvírus canino tem a capacidade de permanecer em estado de latência durante o período de vida do cão. Depois de um período inicial de infecção ativa e resposta antiviral, o vírus não é completamente eliminado do hospedeiro e mantém a capacidade constante ou intermitente de se replicar (Fontbonne, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

O HVC-1 está perfeitamente adaptado ao hospedeiro, podendo causar lesões insignificantes ou manter-se em estado de latência. Na população adulta o herpesvírus encontra-se disseminado, sem provocar sinais clínicos aparentes. No entanto, numa fase inicial de infecção pode ser observado aumento dos gânglios linfáticos, hemorragia submucosa e hiperémia no sítio de inoculação viral (Figura 6). Foram também observadas lesões vesiculares em fêmeas durante o período de proestro, com regressão no período de anestro. Lesões similares podem ocorrer nos machos na base do pênis e ao longo do prepúcio (Carmichael, 2004; Morresey, 2004; Davidson, 2006; Djønn, 2007; Holst *et al.*, 2012).

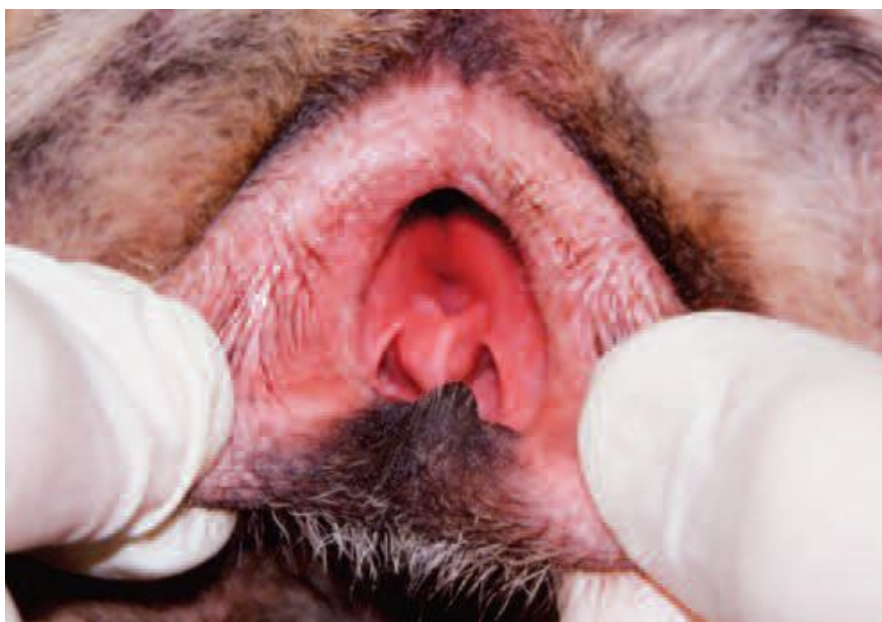


Figura 6. Lesões genitais por herpesvírus canino em cadela adulta (Adaptado de Morresey, 2004)

2.2.4. INFEÇÃO DO APARELHO RESPIRATORIO EM CAES ADULTOS

Sabe-se que o herpesvírus canino está relacionado com doença respiratória infecciosa canina, mais conhecida como “tosse do canil”. Sabe-se que o vírus da parainfluenza canina e a *Bordetella bronchiseptica* são agentes infecciosos frequentemente envolvidos no desenvolvimento da doença respiratória infecciosa canina. Quanto á influencia do HVC-1, nesta patologia, não está bem determinada, apesar de estar descrita a capacidade do HVC-1 se replicar no aparelho respiratório do cão, tendo sido já identificado em várias amostras através de PCR (Erles&Brownlie, 2005; Evermann&Kennedy, 2010; Fontbonne, 2011).

Estudos experimentais de infeção de cães com HVC-1 resultaram em sintomas clínicos de rinite, faringite e traqueobronquite (Morresey, 2004; Ronsse *et al.*, 2004; Buonavoglia&Martella, 2007).

2.2.5. DOENÇA OCULAR ASSOCIADA A HERPES VIRUS CANINO

São vários os estudos que demonstram a similaridade deste vírus com outros vírus da família Alphaherpesviridae como o herpesvírus simplex, herpesvírus bovino, e herpesvírus felino, vírus esses que estão diretamente relacionados com doenças oculares recorrentes nas respectivas espécies.

Em cães neonatos o herpesvírus canino pode provocar alterações oculares como, Panuveíte associada a infecção viral intranuclear, tendo como sequelas frequentes queratite, cataratas, neurite ótica, necrose e displasia da retina. Em cães adultos, as lesões verificam-se a nível da córnea, conjuntiva e pálpebra, ao contrário do que acontece com neonatos (Evermann&Kennedy, 2010; Ledbetter, 2013).

Ledbetter *et al.*, em 2009 estudaram o efeito do HVC-1, após a inoculação do vírus em cães, tendo observado conjuntivite bilateral com blefarospasmo intermitente, fotofobia, prurido ocular, elevação da membrana nictitante, hiperemia conjuntival, secreções oculares mucoides a mucopurulentas, tendo ainda sido detetadas úlceras a nível da córnea (Figura 7) e conjuntiva (Figura 8. **Conjuntivite ulcerativa em cão com infecção por HVC-1 recorrente (Adaptado de Ledbetter, 2013)**) (Ledbetter, 2013)

Durante esse mesmo estudo ficou também demonstrada a capacidade de reativação do vírus, após a administração de prednisolona em doses imunossupressoras (Ledbetter *et al.*, 2009; Fontbonne, 2011).

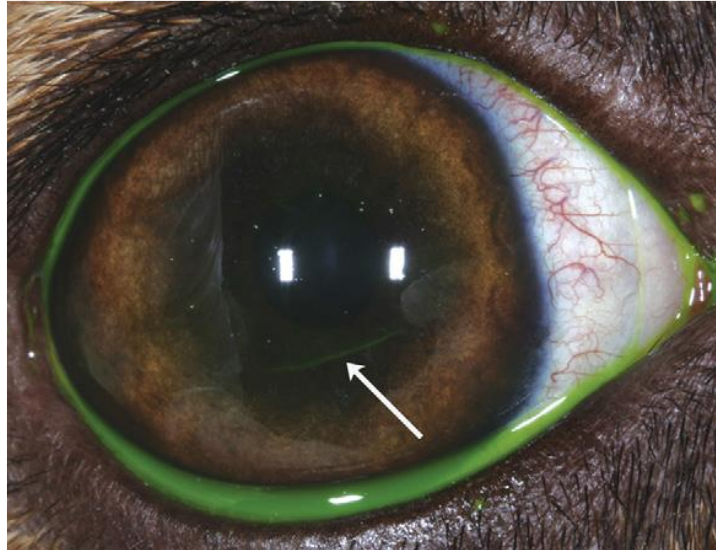


Figura 7. Presença de úlcera superficial na córnea, detetada durante estudo de infecção com herpesvirus canino (Adaptado de Ledbetter *et al*, 2009)



Figura 8. Conjuntivite ulcerativa em cão com infecção por HVC-1 recorrente (Adaptado de Ledbetter, 2013)

2.3. DIAGNÓSTICO

O Herpesvírus canino pode ser diagnosticado através da combinação de sinais clínicos, história pregressa e observação da progressão da infecção. No período neonatal é importante ter em conta o diagnóstico diferencial, considerando a hipótese de ocorrer sépsis, sendo que o diagnóstico definitivo é, na maioria das vezes, realizado por achados de necrópsia, e detecção de ADN viral nos órgãos (Rootwelt *et al.*, 2011).

2.3.1. ACHADOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA

Quando é realizada a necrópsia para diagnóstico de HVC-1, devem ser consideradas lesões macroscópicas características, como múltiplas petéquias, hematomas e focos de necrose disseminados, principalmente no rim, fígado e pulmão, embora também possam surgir no baço, cérebro, coração, timo, glândulas adrenais e mucosa intestinal. Pode também ser observada esplenomegália, linfadenomegália, presença de líquido peritoneal e pleural, seroso ou sero-hemorrágico (Poulet, 2001; Ronsse *et al.*, 2003).

Histologicamente, as lesões por HVC-1 são caracterizadas por focos de necrose no parênquima, frequentemente com hemorragias periféricas com infiltração de macrófagos e linfócitos. A replicação do vírus é rápida e altamente destrutiva, originando corpos de inclusão intranucleares eosinofílicos na periferia do foco de necrose, importante no diagnóstico de herpesvírus canino (Ronsse *et al.*, 2003; Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012).

Se o vírus tiver sido transportado ao longo do nervo trigêmeo ou através do nervo olfatório pode observar-se degenerescência e necrose de células da glia e neurónios no cerebelo (Ronsse *et al.*, 2003; Fontbonne, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

Em caso de aborto, o exame macroscópico e histológico da placenta pode revelar necrose focal na parte fetal da placenta (Ronsse *et al.*, 2003; Rootwelt *et al.*, 2011).

As lesões papulovesiculares da pele e mucosas observadas nos cães adultos, são causados pela degeneração celular, resultando em acantólise epitelial pronunciada (Ronsse *et al.*, 2003; Fontbonne, 2011).

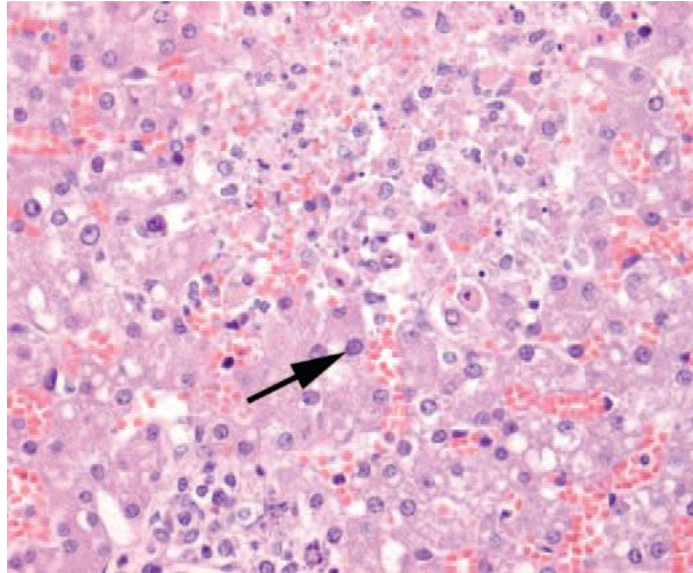


Figura 9. Presença de um corpo de inclusão num hepatócito, que pode ocorrer em infecções por herpesvirus canino (Adaptado de Rootwelt, 2011).

2.3.2. CULTURA DE VIRUS E DETECÇÃO DE ADN VIRAL

A cultura de vírus é um processo para detecção de HVC-1, de difícil execução, devido a necessidade de condições ótimas do meio de cultura e armazenamento da amostra. Para cultura de vírus devem ser usadas amostras de órgãos frescas ou congeladas. O HVC-1 é sensível pelo que a deterioração dos tecidos no período *post mortem* reduz a probabilidade de detecção viral. No caso de serem usados zaragatoas devem ser retiradas amostras da mucosa nasal ou do trato genital, dependendo dos sinais clínicos apresentados, enviadas depois para laboratório devidamente refrigeradas ou congeladas (Fontbonne, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

Devido à instabilidade deste vírus no meio ambiente, é preferível a utilização do método de PCR para demonstração do ADN, em detrimento do isolamento do vírus. Esta técnica não só é mais sensível para detecção de ADN viral como também possibilita a detecção do vírus, mesmo em estado de latência no hospedeiro, o que torna o método de PCR o método mais comum e sensível para detecção de herpesvírus canino (Ronsse *et al.*, 2003; Decaro *et al.*, 2008; Decaro *et al.*, 2010; Fontbonne, 2011).

2.3.3. SEROLOGIA

Vários testes para detecção de anticorpos de HVC-1 tem sido desenvolvidos, sendo que o método de ELISA é conhecido pela sua sensibilidade e fácil utilização devido ao seu processo sistematizado. Este método de diagnóstico não é útil em recém-nascidos devido ao curto espaço de tempo entre a infecção e a manifestação de sinais clínicos (Ronsse *et al.*, 2003; Fontbonne, 2011; Rootwelt *et al.*, 2011).

Os cães adultos e cachorros com idade entre as seis a oito semanas, desenvolvem anticorpos após exposição ao vírus, podendo estes anticorpos ser detetados no soro, através de métodos de diagnóstico serológico. Perante uma infecção ativa, são detetados títulos elevados de anticorpos que se mantêm neste nível durante alguns meses, seguindo-se uma diminuição destes valores (Ronsse *et al.*, 2003).

2.3.4. OUTROS MÉTODOS

Em cadáveres, podem ser realizados testes de Imunofluorescência em criosecções dos pulmões, rins e fígado de recém-nascido (Parzefall, 2010).

A microscopia eletrónica pode também ser usada para evidenciar a presença de partículas virais em tecidos infetados. Contudo, esta técnica não é muito utilizada devido à longa duração de todo o processo (Ronsse *et al.*, 2003; Parzefall, 2010).

2.4. TERAPIA

Por norma, em cães adultos o HVC-1 provoca apenas uma infecção assintomática que não requer tratamento, exceto no caso de existência de lesões oculares, genitais e respiratórias que requerem tratamento sintomático.

Em humanos recém-nascidos estão descritos tratamentos com doses altas de aciclovir, com resultados eficazes no herpesvírus humano neonatal (Kimberlin *et al.*, 2001).

Em cachorros estão descritas experiências de tratamento com aciclovir, embora seja referido que as consequências negativas, do efeito tóxico, no miocárdio e no sistema nervoso central, devido a ingestão acidental, são mais significativas que os benefícios. Doses elevadas de aciclovir têm ainda como efeitos secundários, perturbações gastrointestinais, anorexia e nefropatias obstrutivas (Evermann&Kennedy, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011).

Em geral a terapia em cachorros, que apresentem sintomas de infecção por HVC-1, é limitada e de pouca relevância no prognóstico (Greene, 2012).

2.5. PROFILAXIA

O vírus em estado latente pode ser reativado mediante situações de stresse. Assim sendo, cães destinados a criação não devem ser sujeitos a viagens longas, concursos, e outras atividades que possam provocar stresse em alturas de cruzamento ou durante o período de gestação (Rootwelt et al., 2011).

É importante que o cão se encontre em boas condições de saúde, o que inclui o cumprimento do plano vacinal completo, uma vez que qualquer infeção pode despoletar a reativação do vírus (Rootwelt et al., 2011).

Como descrito anteriormente, a principal via de transmissão do vírus é o contacto entre animais infetados, assim sendo, o criador deve manter os animais para criação isolados e afastados de ambientes que possam potenciar a transmissão do vírus, bem como disponibilizar canis com higiene adequada, que pode ser feita de forma efetiva com a maioria dos desinfetantes comuns e dissolventes lipídicos. Um exemplo é a limpeza com lixívia diluída ou a clorohexidina. (Morresey, 2004; Rootwelt et al., 2011).

A taxa de mortalidade fetal e neonatal até às quatro semanas de idade é muito variável e está dependente de muitos fatores como o trabalho de parto, anomalias congénitas e doenças adquiridas. A taxa média de morte fetal durante o trabalho de parto, com complicações ou não, ronda os 5,5% a 33%. Sabe-se ainda que a taxa de mortalidade de neonatos que nascem por cesariana é de 6% a 11%. A taxa de mortalidade é superior durante a primeira semana de vida, pelo que devem ser implementados cuidados para controlar ou eliminar fatores os que contribuem para a morbilidade do cachorro (Carmichael, 2004; Rootwelt et al., 2011).

Devido a incapacidade de termorregulação dos cachorros, o ambiente deve ser mantido a temperaturas que rondem os 35-37°C juntamente com lâmpadas de aquecimento e mantas de calor, sendo necessário que a cadela tenha uma área para fugir ao calor e evitar o desconforto (Davidson, 2003; Morresey, 2004; Rootwelt et al., 2011).

2.5.1. COLOSTRO

Uma pequena parte dos anticorpos são transferidos para o feto durante a gestação. No entanto, a maioria dos anticorpos é obtida pelos cachorros através do colostro da mãe. Assim sendo, o colostro, nas primeiras horas de vida, é essencial para a proteção contra as infeções, conferindo quantidades adequadas de imunoglobulinas nas primeiras 8 horas após o nascimento (Davidson, 2003; Carmichael, 2004).

O herpesvírus canino afeta principalmente cachorros filhos de cadelas que adquiriram infeção primária por HVC-1 durante a gestação. Este facto ocorre porque as cadelas, previamente infetadas por HVC-1, têm anticorpos específicos que conferem alguma imunidade aos cachorros, durante as duas primeiras semanas (Carmichael, 2004; Morresey, 2004).

Há casos em que o cachorro não tem acesso ao colostro, nesses casos, podem ser administrados cerca de 1-2 mL de soro de cães com títulos de anticorpos contra herpesvírus elevados, 3 vezes com intervalos de 6 horas a 8 horas, devidamente refrigerado, como medida profilática para prevenir os sintomas de HVC-1, se ocorrer infeção posterior (Indrebø *et al.*, 2007; Rickard, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011).

2.5.2. VACINAÇÃO

Está licenciada na europa uma vacina inativada (Eurican® Herpes 205, Merial, França). Esta vacina confere imunidade materna passiva em cachorros, quando estes adquirem as imunoglobulinas G, provenientes do sistema imunitário da progenitora, através do colostro, conferir imunidade à ninhada durante as primeiras 2 a 3 semana de vida, através dos anticorpos maternos transferidos pelo colostro (Carmichael, 2004; Morresey, 2004; Rootwelt *et al.*, 2011).

A vacina é administrada pela via subcutânea em cadelas sendo que, o programa vacinal consiste em 2 doses com um intervalo de 5 semanas, sendo que a primeira dose é administrada durante o cio ou 7 a 10 dias após a

presumível data de acasalamento, e a segunda dose 1 a duas semanas antes da data prevista para o parto (Carmichael, 2004; Morresey, 2004; Rootwelt *et al.*, 2011).

A vacinação para o HVC-1 não faz parte do protocolo vacinal de rotina e não é muito praticada em parte pela necessidade de seguir um protocolo tendo como base as datas de concepção e o parto (Carmichael, 2004; Morresey, 2004; Rootwelt *et al.*, 2011).

3. LINFOMA CANINO

O Linfoma, também designado por linfossarcoma ou linfoma maligno, é uma das neoplasias mais frequentes em cães. Representa cerca de 7% a 24% das doenças neoplásicas e 83% das doenças hematopoiéticas. A sua origem provem da proliferação de células linfoides malignas, normalmente oriundas do sistema linfoide, principalmente como linfonodos, baço, tonsilas e medula óssea (Mortier *et al.*, 2012; Vail *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2014).

A etiologia do linfoma é considerada multifatorial. Vários fatores ambientais, infecciosos, imunomediados e genéticos estão associados com um maior risco de desenvolver esta patologia. Afeta principalmente cães mais velhos, meia-idade, e não apresenta diferença de predisposição consoante o género (Mortier *et al.*, 2012; Vail *et al.*, 2012).

Pode apresentar-se em quatro formas (Mortier *et al.*, 2012; Vail *et al.*, 2012):

- Multicêntrico, caracterizado por linfadenopatia generalizada,
- Alimentar, caracterizado por infiltração do trato gastrointestinal,
- Mediastínico e extranodal, que afetam outros órgão e tecidos.

O linfoma multicêntrico é a forma mais comum de linfoma em cães, representando cerca de 80% dos linfomas caninos, sendo comparado ao linfoma non-hodgkin's em humanos (Mortier *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2014).

Um dos sinais mais comuns do linfoma é o aumento de tamanho dos gânglios linfáticos, que chega a ser inicialmente o único sinal perceptível. Outros sinais incluem a letargia, fraqueza, falta de apetite, perda de peso, diarreia, dificuldades respiratórias, dificuldades na deglutição, aumento da sede e poliúria. O fígado, o baço, os rins, os pulmões, o intestino, a medula óssea, o olho, o sistema nervoso central e a pele são alguns dos órgãos que podem ser afetados (Mortier *et al.*, 2012; Vail *et al.*, 2012).

Apesar da sintomatologia ser bastante específica, o diagnóstico definitivo requer citologia, histopatologia ou diagnóstico molecular. Uma vez confirmado o diagnóstico segue-se a determinação do estágio e sub-estágio de acordo com a organização mundial de saúde (OMS) (Mortier *et al.*, 2012).

Tabela 1. Classificação de estágio de Linfoma de animais domésticos conforme a OMS (Adaptado de Mortier *et al*, 2012).

Estádios	Parâmetros
I	Um único linfonodo afetado ou um único órgão linfoide, exceto a medula óssea.
II	Envolvimento de vários linfonodos de uma mesma região anatômica.
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos periféricos ou profundos.
IV	Estagio III e envolvimento do fígado e/ou baço.
V	Estagio III ou IV e envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos.
Subestádio a	Sem sinais clínicos de doença
Subestádio b	Com sinais clínicos de doença

A terapia consiste fundamentalmente na combinação de vários agentes quimioterápicos de acordo com um protocolo predefinido. São vários os protocolos formulados e em constante atualização. Por norma os cães reagem melhor à quimioterapia, em comparação com os humanos relativamente aos efeitos secundários (Mortier *et al.*, 2012).

Enquanto nos gatos o linfoma tem como agente etiológico o vírus da leucemia felina, o agente etiológico do linfoma canino não está estudado. Células provenientes do linfoma canino revelaram conter retrovírus, no entanto a sua caracterização não foi estudada (Huang *et al.*, 2012; Vail *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2013).

Mais de 90% das pessoas tem anticorpos para o vírus Epstein-Barr, um *Gammaherpesvirus* comum na população humana, mais conhecido por ser o

agente etiológico da mononucleose. Este vírus está também associado aos linfomas humanos Hodgkin, não-Hodgkin e linfoma de Burkitt, evidenciado pela detecção de ADN deste vírus em células destes linfomas (Huang *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2014).

Nos humanos, este vírus é transmitido através de secreções orais, e replica-se na orofaringe onde infeta as células epiteliais e os linfócitos B, podendo estar presente também em órgãos linfoides como as adenoides e as amígdalas (Milman *et al.*, 2011).

Após uma fase aguda de infeção, o vírus entra em fase latente e, em alguns casos, o vírus Epstein-Barr promove crescimento anormal de células B, que contribui para o desenvolvimento de linfoma (Milman *et al.*, 2011).

Recentemente foram detetados anticorpos para o vírus EBV, ou um similar, em cães, sugerindo assim a hipótese deste vírus se ter adaptado ao principal animal de companhia que mais intimamente convive com os humanos. Deixando assim a hipótese de existir um herpesvírus com potencial oncogénico relacionado com o linfoma canino, tal como o EBV está relacionado com o linfoma em humanos (Milman *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2013; Ito *et al.*, 2014).

O herpesvírus canino está associado à infeção sistémica neonatal e à doença respiratória em cães adultos, e está descrito que persiste numa variedade de tecidos incluindo os gânglios (Rootwelt *et al.*, 2011).

4. TRABALHO PRÁTICO

O objetivo deste trabalho prático consistiu no estudo da seroprevalência do herpesvírus canino numa amostra de cães e cadelas, pertencentes a canis de criadores de determinadas raças, aparentemente saudáveis, com exceção de alguns problemas reprodutivos, como abortos, dificuldade em ficar gestante e prolapso vaginal. Pretendendo-se assim avaliar a relação da existência deste vírus nesses canis com os problemas reprodutivos reportados pelo criador, e ainda saber qual a percentagem de animais infetados por este vírus.

Outro dos objetivos consistiu na elaboração de um protocolo, prático, para criadores, contemplando os cuidados a ter com as ninhadas e com os animais coabitantes.

Ao longo do projeto foi incluída uma segunda amostra que compreendia animais adultos de ambos os sexos, de vários proprietários, com a particularidade de todos estes animais terem Linfoma diagnosticado, avaliando assim a possibilidade do herpes vírus estar relacionado com esta patologia.

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. GRUPO 1

O Grupo 1 foi composto por uma amostra de 52 cães, 40 fêmeas e 12 machos, com 1 a 8 anos de idade, pertencentes às raças Bulldog Francês, Bulldog Inglês, Cocker Spaniel, Pug, Shih Tzu, Yorkshire Terrier, Spitz, Pinscher e Chihuahua, representados na Tabela 2. Este grupo pertencia a dois canis de criação, cada um com mais de 20 animais, das raças descritas, destinados a fins de criação e venda de cachorros de raça, ambos na área geográfica do distrito de Viseu.

Foram recolhidas amostras de sangue de cada cão, por venipunctura para tubo seco, posteriormente refrigerado, recolhido o soro e enviado para o

laboratório INNO®, com espaços e equipamentos acreditados, dedicados à medicina veterinária.

No momento da recolha foi realizado um questionário presencial, ao proprietário dos animais que compunham esta amostra, para preenchimento com os dados relativos a cada cão, bem como com os dados relativos ao canil.

Relativamente a cada animal do estudo, foi registado o sexo, idade, raça, estado reprodutivo (inteiro/a, castrado/esterilizada). Os proprietários foram ainda questionados acerca de eventuais problemas de saúde, nomeadamente oculares e respiratórios, e medicações que os animais pudessem estar a fazer, no momento da recolha das amostras. No caso das fêmeas, foi questionado o estado vacinal para Herpesvírus, a situação relativamente ao ciclo éstrico, nomeadamente se estariam em cio, em anestro ou gestantes. No caso dos animais gestantes, foi registado o tempo de gestação, se era a primeira gestação e se esta teve origem em monta natural ou inseminação artificial. O questionário incluía também a questão para indagar eventuais problemas reprodutivos com o intuito de os identificar e registar.

Tabela 2. Grupo 1.

CASO Nº	GÉNERO	IDADE	RAÇA	VACINA HVC	ESTADO REPRODUTIVO	PROBLEMAS REPRODUTIVOS
1	MACHO	4	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	INTEIRO	NÃO
2	FÊMEA	1	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	ANESTRO	NÃO
3	FÊMEA	6	BULLDOG FRANCÊS	SIM	GESTANTE	SIM
4	FÊMEA	4	PINSCHER	NÃO	CIO	NÃO
5	FÊMEA	2	PINSCHER	NÃO	GESTANTE	NÃO
6	FÊMEA	1	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
7	MACHO	4	YORKSHIR E TERRIER	NÃO	INTEIRO	NÃO
8	FÊMEA	4	YORKSHIR E TERRIER	NÃO	ANESTRO	NÃO
9	FÊMEA	4	YORKSHIR E TERRIER	NÃO	GESTANTE	SIM
10	FÊMEA	6	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
11	FÊMEA	6	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
12	FÊMEA	6	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
13	FÊMEA	7	COCKER SPANIEL	NÃO	GESTANTE	NÃO
14	MACHO	8	BASSET HOUND	NÃO	INTEIRO	NÃO
15	FÊMEA	3	BASSET HOUND	NÃO	ANESTRO	SIM
16	FÊMEA	5	COCKER SPANIEL	NÃO	ANESTRO	NÃO
17	FÊMEA	7	COCKER SPANIEL	NÃO	ANESTRO	NÃO
18	FÊMEA	8	BASSET HOUND	NÃO	ANESTRO	NÃO
19	FÊMEA	1	COCKER SPANIEL	NÃO	ANESTRO	NÃO
20	MACHO	2	COCKER SPANIEL	NÃO	INTEIRO	NÃO
21	MACHO	2	PINSCHER	NÃO	INTEIRO	NÃO
22	FÊMEA	4	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
23	FÊMEA	4	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
24	FÊMEA	3	BULLDOG INGLÊS	NÃO	ANESTRO	SIM
25	FÊMEA	4	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	ANESTRO	SIM
26	FÊMEA	3	SHIH TZU	NÃO	ANESTRO	NÃO
27	FÊMEA	4	BULLDOG INGLÊS	SIM	CIO	SIM
28	MACHO	2	CHIHUAHUA	NÃO	INTEIRO	NÃO

29	FÊMEA	3	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
30	MACHO	6	PINSCHER	NÃO	INTEIRO	NÃO
31	MACHO	3	CHIHUAH UA	NÃO	INTEIRO	NÃO
32	FÊMEA	7	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
33	FÊMEA	6	PINSCHER	NÃO	ANESTRO	NÃO
34	MACHO	4	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	INTEIRO	NÃO
35	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	ANESTRO	NÃO
36	MACHO	2	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	INTEIRO	NÃO
37	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	GESTANTE	NÃO
38	FÊMEA	4	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	ANESTRO	NÃO
39	FÊMEA	5	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	CIO	NÃO
40	FÊMEA	2	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	GESTANTE	NÃO
41	FÊMEA	2	PUG	NÃO	ANESTRO	SIM
42	FÊMEA	2	PUG	NÃO	ANESTRO	NÃO
43	FÊMEA	4	SPITZ ALEMÃO	NÃO	ANESTRO	SIM
44	FÊMEA	4	BULLDOG FRANCÊS	SIM	ANESTRO	NÃO
45	MACHO	7	PUG	NÃO	INTEIRO	NÃO
46	MACHO	4	SPITZ ALEMÃO	NÃO	INTEIRO	NÃO
47	FÊMEA	5	SPITZ ALEMÃO	NÃO	ANESTRO	SIM
48	FÊMEA	3	CHIHUAH UA	NÃO	ANESTRO	SIM
49	FÊMEA	3	CHIHUAH UA	NÃO	ANESTRO	SIM
50	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	ANESTRO	SIM
51	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	ANESTRO	NÃO
52	FÊMEA	1	BULLDOG FRANCÊS	NÃO	CIO	NÃO

Foram escolhidas, aleatoriamente, cadelas em diferentes fases do ciclo reprodutivo (estro, anestro, gestação), de acordo com as informações obtidas juntos dos criadores, representado na Tabela 3, incluindo apenas três cadelas vacinadas contra herpesvírus (Tabela 4). Obtivemos assim amostras de 30 cadelas na fase de Anestro, 4 na fase de Estro, e 6 cadelas em vários períodos de gestação.

Tabela 3. Divisão do número total de fêmeas do grupo 1 pelo respetivo estado reprodutivo.

ESTADO REPRODUTIVO GRUPO 1	
ANESTRO	30
ESTRO	4
GESTAÇÃO	6
Total Geral	40

Tabela 4. Animais vacinados contra o HVC-1

Animais vacinados contra o HVC-1
3
27
44

Apesar de em ambos os canis os animais apresentarem boa condição física, estarem devidamente vacinados e desparasitados e seguirem o plano de saúde preconizado e seguido no Hospital Veterinário de Viseu – SOS Animal, i.e. sem problemas de saúde, excepto alguns problemas reprodutivos em algumas fêmeas que incluíam cios silenciosos, vaginite, prolapso vaginal, perdas de ninhadas, nados mortos, infertilidade e necessidade de recorrer a cesariana, representados na Tabela 5 e Tabela 6. Nos machos não foram reportados quais quer problemas de saúde, reprodutivos ou não.

Tabela 5. Número de cadelas com historial de problemas reprodutivos.

PROBLEMAS REPRODUTIVOS	
GRUPO 1	
NÃO	38
SIM	14
Parto distócico	4
Cios silenciosos	1
Dificuldade em ficar gestante	1
Morte dos cachorros até às 8 semanas pós parto	1
Morte dos cachorros na 1ª semana pós parto	4
Nados mortos	1
Vaginite	1
Prolapso vaginal	1
Total Geral	52

Tabela 6. Fêmeas e respetivos problemas reprodutivos

CASO Nº	PROBLEMAS REPRODUTIVOS – GRUPO 1
3	Nados mortos
9	Parto distócico
15	Cesariana
24	Vaginite
25	Dificuldade em ficar gestante
27	Parto distócico
35	Parto distócico
39	Parto distócico
41	Prolapso vaginal
43	Morte na 1ª semana pós parto
47	Morte na 1ª semana e até as 8 semanas pós parto
48	Morte na 1ª semana pós parto
49	Morte na 1ª semana pós parto
50	Morte na 1ª semana pós parto

4.1.2. GRUPO 2

As amostras de soro sanguíneo do segundo grupo foram obtidas do banco de amostras do Centro Veterinário Berna e, posteriormente, enviadas para laboratório INNO®, para realização do protocolo para deteção de HVC-1.

O segundo grupo era composto por 14 machos e 14 fêmeas, com idades compreendidas entre os 5 e os 17 anos, seguidos num hospital veterinário de referência em oncologia, Centro Veterinário Berna, no distrito de Lisboa, sendo que todos os animais deste grupo apresentavam diagnóstico de linfoma.

Os indivíduos deste grupo não viviam em colónia, e compreendiam várias raças como Beagle, Cocker Spaniel, Dogue Alemão, Fila S. Miguel, Golden Retriever, Labrador Retriever, Pastor Alemão, Rottweiler, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier, e cães sem raça definida, como representado na Tabela 6.

Tabela 7. Grupo 2

CASO Nº	GENERO	IDADE	RAÇA
1	FÊMEA	9	LABRADOR RETRIEVER
2	FÊMEA	9	SRD
3	MACHO	13	GOLDEN RETRIEVER
4	MACHO	12	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER
5	FÊMEA	9	SRD
6	FÊMEA	14	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER
7	FÊMEA	8	SRD
8	MACHO	12	SRD
9	MACHO	7	FILA S. MIGUEL
10	MACHO	5	SRD
11	FÊMEA	8	LABRADOR RETRIEVER
12	FÊMEA	5	SRD
13	MACHO	15	COCKER SPANIEL
14	FÊMEA	13	GOLDEN RETRIEVER
15	MACHO	8	SRD
16	MACHO	14	YORKSHIRE TERRIER
17	MACHO	12	SRD
18	MACHO	8	ROTTWEILER
19	MACHO	10	DOG ALEMÃO
20	MACHO	8	PASTOR ALEMÃO

21	MACHO	11	SRD
22	FÊMEA	13	ROTTWEILER
23	FÊMEA	17	SRD
24	FÊMEA	11	SRD
25	FÊMEA	10	COCKER SPANIEL
26	FÊMEA	14	SRD
27	MACHO	13	SRD
28	FÊMEA	14	BEAGLE

O tratamento dirigido ao linfoma, nestes animais, foi o mesmo para todos numa fase inicial. O protocolo CHOP utilizado no Centro Veterinário Berna foi também suplementado com o tratamento de suporte gastrointestinal.

Foram determinados os estádios em que se encontrava cada animal segundo a tabela de referência da OMS. Sendo que se tratavam de linfomas multicêntricos, ou seja com envolvimento nodal indicativo de doença sistémica, foram classificados como no mínimo nível III, em que apenas uma região está afetada, e de nível IV, quando todos os gânglios periféricos estão palpáveis (Tabela 8).

Foram ainda descritos os valores de sobrevivência até à data, e o tipo de células afetadas (linfoma de células B ou T)

Tabela 8. Apresentação clínica do linfoma, sinais clínicos, estadio clinico (a- ausência de sinais clínicos e b- presença de sinais clínicos, no momento do diagnostico), tratamento e tempo de sobrevivência, dos casos que compõe o Grupo 2.

CASO Nº	Apresentação Clínica	Sinais clínicos	Estadio Clínico (OMS)	Fenótipo	Tratamento	Tempo de Sobrevivência (dias)
1	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	210
2	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	201
3	Multicêntrico	Anorexia, Prostração	IV b	B	CHOP	até 25/4/2014
4	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	até 25/4/2014
5	Multicêntrico	Anorexia, Dispneia	IV b	B	CHOP	até 25/4/2014
6	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	até 25/4/2014
7	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	98
8	Multicêntrico	Anorexia, Vômitos	IV b	B	CHOP	134
9	Multicêntrico	Assintomático	IV a	T	CHOP	237
10	Multicêntrico	Vômitos, Diarreia	IV b	B	CHOP	230
11	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	144
12	Multicêntrico	Diarreia, Vômitos, anorexia	IV b	B	CHOP	330
13	Multicêntrico	Tosse, Anorexia	IV b	B	CHOP	45

14	Multicêntrico	Tosse, Prostração	IV b	B	CHOP	70
15	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	206
16	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	133
17	Multicêntrico	Anorexia, Prostração	IV b	B	CHOP	189
18	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	95
19	Multicêntrico	Diarreia	IV b	B	CHOP	629
20	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	128
21	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	78
22	Multicêntrico	Cegueira, Anorexia, prostração	IV b	B	CHOP	236
23	Multicêntrico	Anorexia, Vômitos	IV b	B	CHOP	81
24	Multicêntrico	Anorexia, Prostração	III b	B	CHOP	425
25	Multicêntrico	Assintomático	IV a	B	CHOP	156
26	Multicêntrico	Anorexia	IV b	B	CHOP	até 25/4/2014
27	Hepato- Esplênico	Vômitos, Diarreia	IV b	T	CHOP	127
28	Multicêntrico	Assintomático	III a	B	CHOP	até 25/4/2014

4.1.3. MÉTODO DE ELISA

No laboratório, foi realizado o teste de ELISA para as 80 amostras, através do kit de ELISA EVL® para detecção de anticorpos policlonais anti HVC-1, IgG e IgM. Trata-se de um teste qualitativo com um cutoff de 1:100, o que significa que acima deste valor, o resultado é positivo para anticorpos HVC-1 e um valor inferior indica que a amostra é negativa para os mesmos anticorpos.

Protocolo utilizado (gentilmente cedido pelo laboratório INNO® que o realizou):

A. Lavagem :

1. A placa deve ser virada ao contrário e ligeiramente agitada para remover o tampão de cada poço.
2. Deve encher-se cada poço com 250 µl da solução de lavagem.
3. Os passos 1 e 2 devem ser repetidos pelo menos 4 vezes.
4. A placa deve ser reposicionada virada para baixo, sobre papel absorvente, e deve bater-se firmemente para remover os vestígios de solução de lavagem remanescente nos poços.

5. Deve ter-se o cuidado de assegurar que os poços não estão completamente secos antes de usar o reagente seguinte.

B. Teste:

1. Proceder à lavagem de acordo com o protocolo, após ter o cuidado de diluir 200x em água desionizada a solução de lavagem providenciada pelo kit.

2. Teste qualitativo: realizar uma diluição de 1:100 de cada amostra em tampão ELISA numa microplaca. Fazer diluição de 1:50 do controlo positivo e do controlo negativo.

3. Transferir 100 µl de cada diluição para cada poço das microplacas revestidas previamente com antigénio HVC-1

4. Selar e incubar durante 60 min, à temperatura de 37°C.

5. Repetir o passo 1.

6. Colocar 100 µl do anticorpo conjugado anti-HVC-1 em todos os poços.

7. Selar e incubar durante 60 min, à temperatura de 37°C.

8. Repetir o passo 1.

9. Misturar cuidadosamente partes iguais do tampão A e do tampão B.

Esta solução deve ser preparada imediatamente antes de ser usada. Colocar 100 µl do substrato em cada poço e incubar durante 15-25 min, à temperatura ambiente (21°C)

10. Adicionar 50 µl da solução de bloqueio em cada poço e misturar bem.

11. Ler os resultados de densidade óptica (OD – optical density) imediatamente, no prazo de 10 min, a 450 nm. Usar como referência um comprimento de onda de 620nm.

C. Interpretação dos resultados:

1. A amostra é considerada positiva se a OD for 2.5 vezes superior à OD do controlo negativo.

4.2. RESULTADOS

Das 52 amostras do grupo 1, 51 amostras foram positivas evidenciando a presença de anticorpos HVC-1, e apenas uma amostra, pertencente a uma cadela, revelou ser negativa, resultando em 98% de cães seropositivos para o grupo 1 (Tabela 9). Os testes realizados foram devidamente validados pelos respectivos controlos positivos e negativos, de acordo com o kit utilizado.

Tabela 9. Resultados do teste para detecção de anticorpos HVC-1. Grupo 1.

CASO Nº	GÉNERO	IDADE	RAÇA	HVC
1	MACHO	4	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
2	FÊMEA	1	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
3	FÊMEA	6	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
4	FÊMEA	4	PINSCHER	POSITIVO
5	FÊMEA	2	PINSCHER	POSITIVO
6	FÊMEA	1	PINSCHER	POSITIVO
7	MACHO	4	YORKSHIRE TERRIER	POSITIVO
8	FÊMEA	4	YORKSHIRE TERRIER	POSITIVO
9	FÊMEA	4	YORKSHIRE TERRIER	POSITIVO
10	FÊMEA	6	PINSCHER	POSITIVO
11	FÊMEA	6	PINSCHER	POSITIVO
12	FÊMEA	6	PINSCHER	POSITIVO
13	FÊMEA	7	COCKER SPANIEL	POSITIVO
14	MACHO	8	BASSET HOUND	POSITIVO
15	FÊMEA	3	BASSET HOUND	POSITIVO
16	FÊMEA	5	COCKER SPANIEL	POSITIVO
17	FÊMEA	7	COCKER SPANIEL	POSITIVO
18	FÊMEA	8	BASSET HOUND	POSITIVO
19	FÊMEA	1	COCKER SPANIEL	POSITIVO
20	MACHO	2	COCKER SPANIEL	POSITIVO
21	MACHO	2	PINSCHER	POSITIVO
22	FÊMEA	4	PINSCHER	POSITIVO
23	FÊMEA	4	PINSCHER	POSITIVO
24	FÊMEA	3	BULLDOG INGLÊS	POSITIVO
25	FÊMEA	4	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
26	FÊMEA	3	SHIH TZU	POSITIVO
27	FÊMEA	4	BULLDOG INGLÊS	POSITIVO
28	MACHO	2	CHIHUAHUA	POSITIVO
29	FÊMEA	3	PINSCHER	POSITIVO
30	MACHO	6	PINSCHER	POSITIVO
31	MACHO	3	CHIHUAHUA	POSITIVO

32	FÊMEA	7	PINSCHER	POSITIVO
33	FÊMEA	6	PINSCHER	NEGATIVO
34	MACHO	4	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
35	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
36	MACHO	2	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
37	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
38	FÊMEA	4	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
39	FÊMEA	5	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
40	FÊMEA	2	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
41	FÊMEA	2	PUG	POSITIVO
42	FÊMEA	2	PUG	POSITIVO
43	FÊMEA	4	SPITZ ALEMÃO	POSITIVO
44	FÊMEA	4	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
45	MACHO	7	PUG	POSITIVO
46	MACHO	4	SPITZ ALEMÃO	POSITIVO
47	FÊMEA	5	SPITZ ALEMÃO	POSITIVO
48	FÊMEA	3	CHIHUAHUA	POSITIVO
49	FÊMEA	3	CHIHUAHUA	POSITIVO
50	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
51	FÊMEA	3	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO
52	FÊMEA	1	BULLDOG FRANCÊS	POSITIVO

No que respeita à idade dos animais do grupo 1, a fêmea em que não foram detetados anticorpos HVC-1 tinha seis anos e era da raça Pinscher. Os restantes animais foram todos positivos.

Relativamente ao estudo da presença de anticorpos HVC-1 em cadelas com historial de problemas reprodutivos e perda de ninhadas, todas revelaram ser portadoras de anticorpos HVC-1, sendo que a única cadela do grupo 1 negativa para esta patologia não apresentava nenhum destes problemas.

Em relação aos machos, não foram descritos quaisquer sintomas a nível reprodutivo, no entanto todos estes revelaram ser portadores de anticorpos HVC-1.

Dos sintomas reprodutivos registados em fêmeas, verificou-se uma maior frequência da intervenção de parto distócico (n = 4), morte do recém-nascido na 1ª semana após o parto (n = 4), e com menor frequência cio silencioso, dificuldade em ficar gestante, morte dos cachorros até às 8 semanas após o parto, nados mortos, vaginite e prolapso vaginal, com um caso cada (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados da detecção de anticorpos HVC-1, de acordo com a presença de problemas reprodutivos para o grupo 1.

CASO Nº	HVC	PROBLEMAS REPRODUTIVOS
3	POSITIVO	Nados mortos
9	POSITIVO	Cios silenciosos
15	POSITIVO	Parto distócico
24	POSITIVO	Vaginite
25	POSITIVO	Dificuldade em ficar gestante
27	POSITIVO	Parto distócico
35	POSITIVO	Parto distócico
39	POSITIVO	Parto distócico
41	POSITIVO	Prolapso vaginal
43	POSITIVO	Morte na 1ª semana pós parto
47	POSITIVO	Morte na 1ª semana e até as 8 semanas pós parto
48	POSITIVO	Morte na 1ª semana pós parto
49	POSITIVO	Morte na 1ª semana pós parto
50	POSITIVO	Morte na 1ª semana pós parto

Não foram reportados sinais clínicos respiratórios, oculares ou lesões vesiculares. Nenhum dos animais se encontrava a fazer tratamento com esteroides, sendo que neste caso os únicos fatores de imunossupressão possíveis o stresse e gestação.

Das 28 amostras do grupo 2, 16 amostras foram positivas evidenciando a presença de anticorpos HVC-1, e 12 amostras revelaram ser negativas (Tabela 11), resultando em 57% de cães seropositivos para o grupo 2 (Figura 10).

Tabela 11. Resultados do teste para detecção de anticorpos HVC-1. Grupo 2.

CASO Nº	GENERO	IDADE	RAÇA	HVC
1	FEMEA	9	LABRADOR RETRIEVER	POSITIVO
2	FEMEA	9	SRD	POSITIVO
3	MACHO	13	GOLDEN RETRIEVER	POSITIVO
4	MACHO	12	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	POSITIVO
5	FEMEA	9	SRD	NEGATIVO
6	FEMEA	14	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	NEGATIVO
7	FEMEA	8	SRD	POSITIVO
8	MACHO	12	SRD	POSITIVO
9	MACHO	7	FILA S. MIGUEL	POSITIVO
10	MACHO	5	SRD	POSITIVO
11	FEMEA	8	LABRADOR RETRIEVER	POSITIVO
12	FEMEA	5	SRD	NEGATIVO

13	MACHO	15	COCKER SPANIEL	NEGATIVO
14	FEMEA	13	GOLDEN RETRIEVER	POSITIVO
15	MACHO	8	SRD	POSITIVO
16	MACHO	14	YORKSHIRE TERRIER	POSITIVO
17	MACHO	12	SRD	POSITIVO
18	MACHO	8	ROTTWEILER	POSITIVO
19	MACHO	10	DOG ALEMÃO	NEGATIVO
20	MACHO	8	PASTOR ALEMÃO	NEGATIVO
21	MACHO	11	SRD	POSITIVO
22	FEMEA	13	ROTTWEILER	NEGATIVO
23	FEMEA	17	SRD	NEGATIVO
24	FEMEA	11	SRD	NEGATIVO
25	FEMEA	10	COCKER SPANIEL	NEGATIVO
26	FEMEA	14	SRD	NEGATIVO
27	MACHO	13	SRD	NEGATIVO
28	FEMEA	14	BEAGLE	POSITIVO

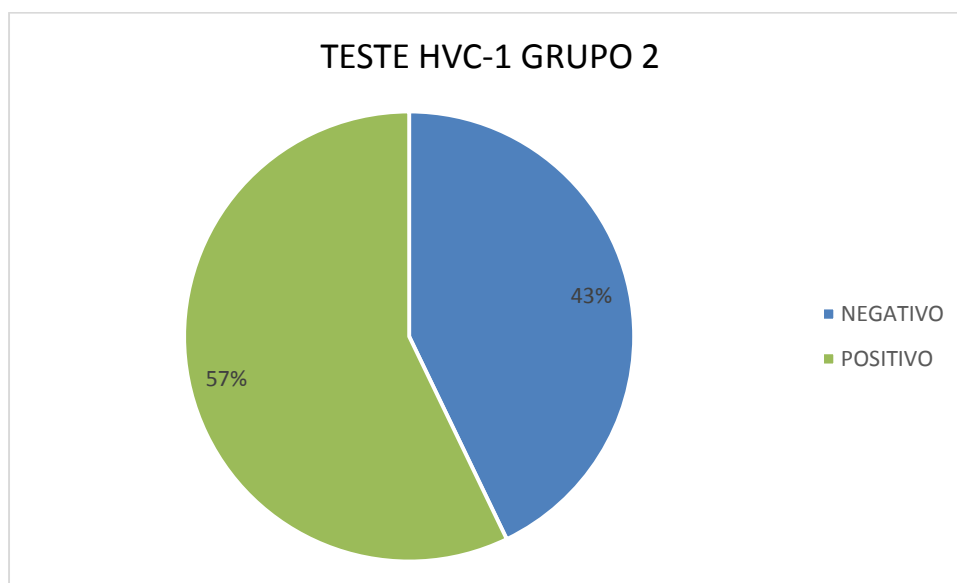


Figura 10. Gráfico ilustrativo do número de animais positivos e negativos para HVC-1, do Grupo 2.

Relativamente à idade dos animais do grupo 2, a relação do número de animais positivos e negativos relativamente à faixa etária, e tendo em conta que a amostra era composta apenas por animais a partir dos 5 anos de idade, a distribuição de animais com e sem anticorpos para HVC-1 é homogénea dentro das várias idades, como representado na tabela 12.

Tabela 12. Relação da idade como o número de animais positivos e negativos para a presença de HVC-1 no grupo 2.

CASO Nº	IDADE	HVC	CASO Nº	IDADE	HVC
1	9	POSITIVO	15	8	POSITIVO
2	9	POSITIVO	16	14	POSITIVO
3	13	POSITIVO	17	12	POSITIVO
4	12	POSITIVO	18	8	POSITIVO
5	9	NEGATIVO	19	10	NEGATIVO
6	14	NEGATIVO	20	8	NEGATIVO
7	8	POSITIVO	21	11	POSITIVO
8	12	POSITIVO	22	13	NEGATIVO
9	7	POSITIVO	23	17	NEGATIVO
10	5	POSITIVO	24	11	NEGATIVO
11	8	POSITIVO	25	10	NEGATIVO
12	5	NEGATIVO	26	14	NEGATIVO
13	15	NEGATIVO	27	13	NEGATIVO
14	13	POSITIVO	28	14	POSITIVO

Em relação às raças dos cães que compunham o grupo 2, a distribuição de indivíduos positivos e negativos para HVC-1 nos cães sem raça definida é de 6 negativos e 7 positivos. Os casos nº 19, 13, 25 e 20, da raça Dogue Alemão, Cocker Spaniel, e Pastor Alemão, foram as únicas raças que não apresentaram animais seropositivos, como demonstra a Tabela 13.

Tabela 13. Relação do número de animais positivos e negativos para HVC-1 e respetivas raças, no Grupo 2.

CASO Nº	RAÇA	HVC	CASO Nº	RAÇA	HVC
1	LABRADOR RETRIEVER	POSITIVO	15	SRD	POSITIVO
2	SRD	POSITIVO	16	YORKSHIRE TERRIER	POSITIVO
3	GOLDEN RETRIEVER	POSITIVO	17	SRD	POSITIVO
4	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	POSITIVO	18	ROTTWEILER	POSITIVO
5	SRD	NEGATIVO	19	DOG ALEMÃO	NEGATIVO
6	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	NEGATIVO	20	PASTOR ALEMÃO	NEGATIVO
7	SRD	POSITIVO	21	SRD	POSITIVO
8	SRD	POSITIVO	22	ROTTWEILER	NEGATIVO
9	FILA S. MIGUEL	POSITIVO	23	SRD	NEGATIVO
10	SRD	POSITIVO	24	SRD	NEGATIVO
11	LABRADOR RETRIEVER	POSITIVO	25	COCKER SPANIEL	NEGATIVO
12	SRD	NEGATIVO	26	SRD	NEGATIVO
13	COCKER SPANIEL	NEGATIVO	27	SRD	NEGATIVO
14	GOLDEN RETRIEVER	POSITIVO	28	BEAGLE	POSITIVO

Em relação ao género, a distribuição de casos positivos e negativos revela uma maior concentração de casos positivos em machos e casos negativos em fêmeas, ou seja 66% dos animais negativos para anticorpos anti HVC1 são fêmeas e 63% dos animais positivos são machos, (Figura 11), como demonstra a Tabela 14.

Tabela 14. Relação do número de animais positivos e negativos para HVC-1 e respetivo género, no Grupo 2.

CASO Nº	GENERO	HVC	CASO Nº	HVC	
1	FÊMEA	POSITIVO	15	MACHO	POSITIVO
2	FÊMEA	POSITIVO	16	MACHO	POSITIVO
3	MACHO	POSITIVO	17	MACHO	POSITIVO
4	MACHO	POSITIVO	18	MACHO	POSITIVO
5	FÊMEA	NEGATIVO	19	MACHO	NEGATIVO
6	FÊMEA	NEGATIVO	20	MACHO	NEGATIVO
7	FÊMEA	POSITIVO	21	MACHO	POSITIVO
8	MACHO	POSITIVO	22	FÊMEA	NEGATIVO
9	MACHO	POSITIVO	23	FÊMEA	NEGATIVO
10	MACHO	POSITIVO	24	FÊMEA	NEGATIVO
11	FÊMEA	POSITIVO	25	FÊMEA	NEGATIVO
12	FÊMEA	NEGATIVO	26	FÊMEA	NEGATIVO
13	MACHO	NEGATIVO	27	MACHO	NEGATIVO
14	FÊMEA	POSITIVO	28	FÊMEA	POSITIVO

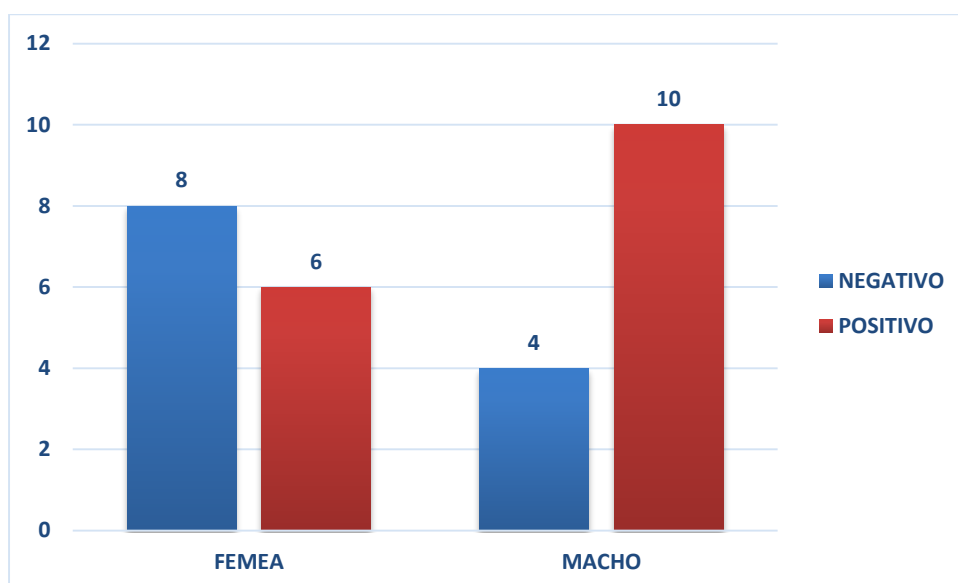


Figura 11. Gráfico representativo do número de animais positivos e negativos para HVC-1 consoante o género, no Grupo 2.

Em relação ao estado reprodutivo dos animais que compõe este grupo foi possível verificar que a maioria dos animais, positivos para HVC-1, são animais inteiros (n=13), ou seja, fêmeas e machos que não foram esterilizados (Tabela 15). Relativamente aos animais esterilizados, que se tratavam apenas de fêmeas, a distribuição de casos positivos e negativos revela-se homogénea, como demonstrado na Figura 12.

Tabela 15. Relação do número de animais positivos e negativos para HVC-1 e respetivo estado reprodutivo, no Grupo 2.

CASO Nº	HVC	ESTADO REPRODUTIVO	CASO Nº	HVC	ESTADO REPRODUTIVO
1	POSITIVO	OVH/CASTRACÃO	15	POSITIVO	INTEIRO
2	POSITIVO	OVH/CASTRACÃO	16	POSITIVO	INTEIRO
3	POSITIVO	INTEIRO	17	POSITIVO	INTEIRO
4	POSITIVO	INTEIRO	18	POSITIVO	INTEIRO
5	NEGATIVO	INTEIRO	19	NEGATIVO	INTEIRO
6	NEGATIVO	OVH/CASTRACÃO	20	NEGATIVO	INTEIRO
7	POSITIVO	INTEIRO	21	POSITIVO	INTEIRO
8	POSITIVO	INTEIRO	22	NEGATIVO	INTEIRO
9	POSITIVO	INTEIRO	23	NEGATIVO	OVH/CASTRACÃO
10	POSITIVO	INTEIRO	24	NEGATIVO	INTEIRO
11	POSITIVO	OVH/CASTRACÃO	25	NEGATIVO	INTEIRO
12	NEGATIVO	INTEIRO	26	NEGATIVO	OVH/CASTRACÃO
13	NEGATIVO	INTEIRO	27	NEGATIVO	INTEIRO

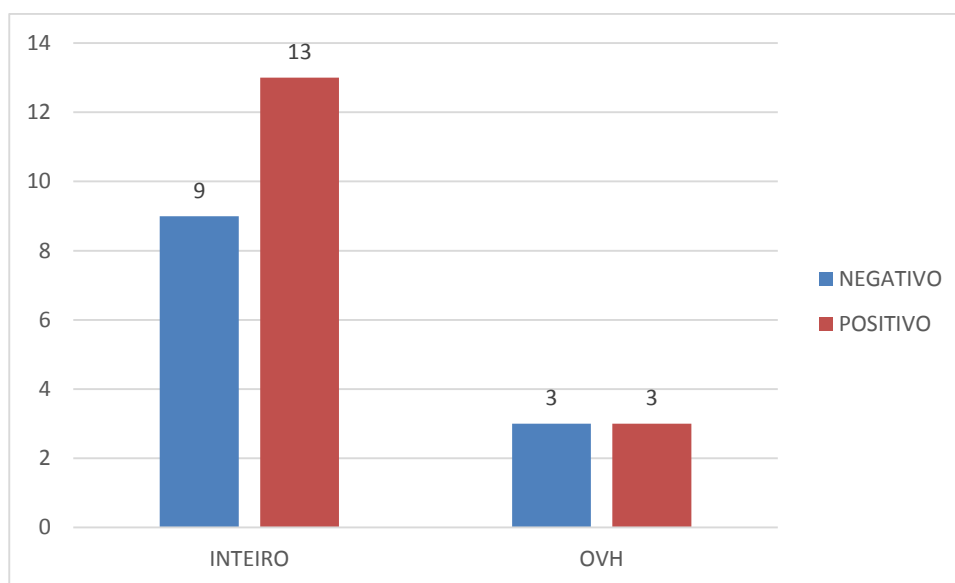


Figura 12. Gráfico representativo do número de animais positivos e negativos para HVC-1 consoante o estado reprodutivo, no Grupo 2.

No que toca à sintomatologia apresentada, no momento do diagnóstico pelos animais que compreendem o Grupo 2 (Tabela 16) não apresentavam registo de sinais clínicos característicos de HVC-1. Relativamente a outros sintomas, verificou-se um maior número de animais positivos sem sintomatologia (n=11), como se pode verificar na Figura 13.

Tabela 16. Relação do número de animais positivos e negativos para HVC-1 e sintomatologia.

CASO Nº	HVC	SINAIS CLÍNICOS
1	POSITIVO	Assintomático
2	POSITIVO	Assintomático
3	POSITIVO	Anorexia, Prostração
4	POSITIVO	Assintomático
5	NEGATIVO	Anorexia, Dispneia
6	NEGATIVO	Assintomático
7	POSITIVO	Assintomático
8	POSITIVO	Anorexia, Vômitos
9	POSITIVO	Assintomático
10	POSITIVO	Vômitos, Diarreia
11	POSITIVO	Assintomático
12	NEGATIVO	Diarreia, Vômitos, anorexia
13	NEGATIVO	Tosse, Anorexia
14	POSITIVO	Tosse, Prostração
15	POSITIVO	Assintomático
16	POSITIVO	Assintomático
17	POSITIVO	Anorexia, Prostração
18	POSITIVO	Assintomático
19	NEGATIVO	Diarreia
20	NEGATIVO	Assintomático
21	POSITIVO	Assintomático
22	NEGATIVO	Cegueira, Anorexia, prostração
23	NEGATIVO	Anorexia, Vômitos
24	NEGATIVO	Anorexia, Prostração
25	NEGATIVO	Assintomático
26	NEGATIVO	Anorexia
27	NEGATIVO	Vômitos, Diarreia
28	POSITIVO	Assintomático

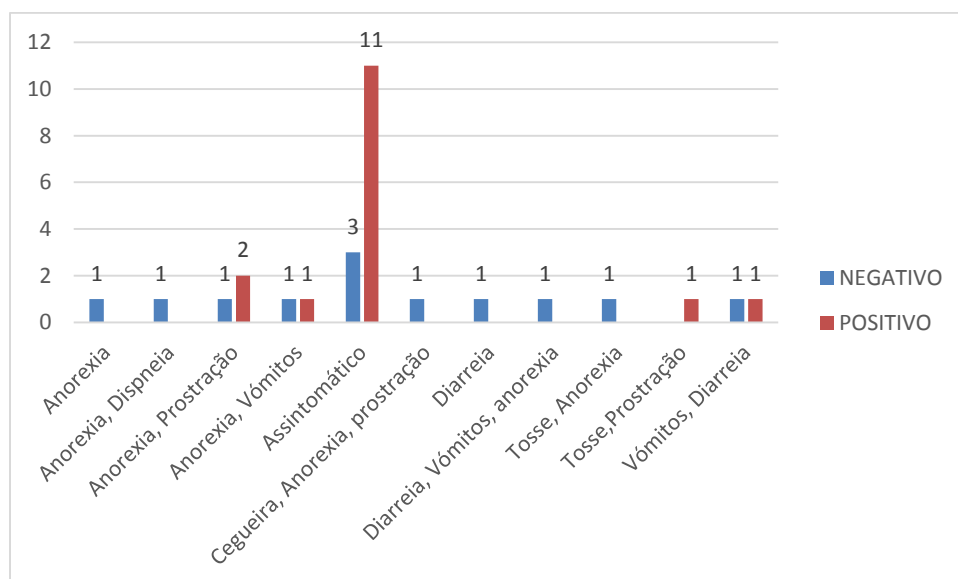


Figura 13. Gráfico representativo do número de animais positivos e negativos para HVC-1 consoante a sintomatologia, no Grupo 2

Com o estudo da prevalência do HVC-1 em comparação com o estágio clínico em que se encontrava cada animal (Tabela 17), verificou-se uma maior tendência de animais positivos para HVC-1 durante o estágio “IV a” (n=10), e animais negativos no estágio “IV b” (n=8) (Figura 14).

Tabela 17. Relação do número de animais positivos e negativos para estágio clínico (OMS).

CASO Nº	HVC	Estadio Clínico (OMS)	CASO Nº	HVC	Estadio Clínico (OMS)
1	POSITIVO	IV a	15	POSITIVO	IV a
2	POSITIVO	IV a	16	POSITIVO	IV a
3	POSITIVO	IV b	17	POSITIVO	IV b
4	POSITIVO	IV a	18	POSITIVO	IV a
5	NEGATIVO	IV b	19	NEGATIVO	IV b
6	NEGATIVO	IV a	20	NEGATIVO	IV a
7	POSITIVO	IV a	21	POSITIVO	IV a
8	POSITIVO	IV b	22	NEGATIVO	IV b
9	POSITIVO	IV a	23	NEGATIVO	IV b
10	POSITIVO	IV b	24	NEGATIVO	III b
11	POSITIVO	IV a	25	NEGATIVO	IV a
12	NEGATIVO	IV b	26	NEGATIVO	IV b
13	NEGATIVO	IV b	27	NEGATIVO	IV b
14	POSITIVO	IV b	28	POSITIVO	III a

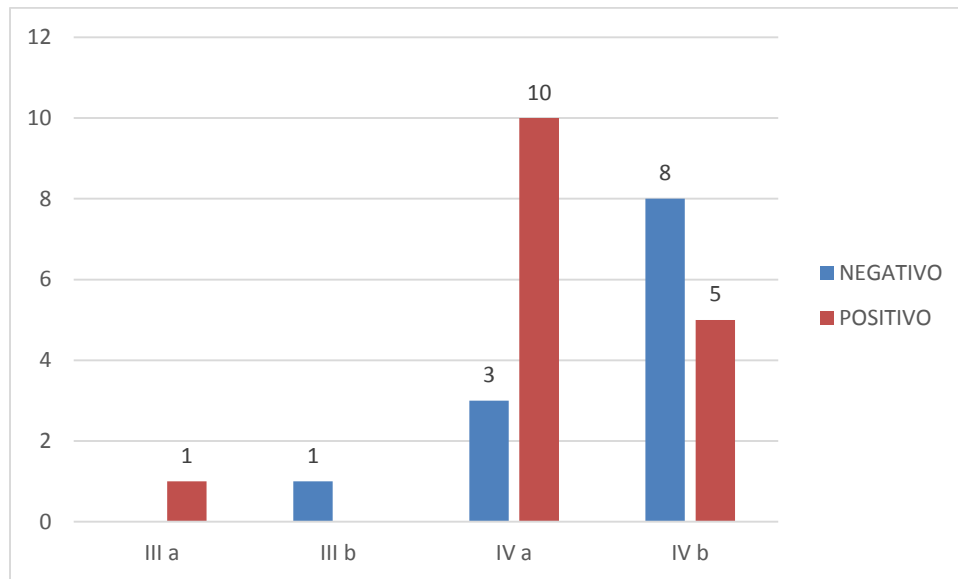


Figura 14. Gráfico representativo do número de animais positivos e negativos para HVC-1 consoante o estadio clínico, no Grupo 2.

4.3. DISCUSSAO

Ambos os grupos apresentaram seroprevalência elevada, superior a 95% no Grupo 1, e 57% no Grupo 2, o que está de acordo com os trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos por vários autores, que revelam uma seroprevalência de cerca de 40% a 88%, do HVC-1, na população mundial canina (Rijsewijk *et al.*, 1999; Morresey, 2003; Ronsse *et al.*, 2005; Acar *et al.*, 2009; Evermann&Kennedy, 2010; Kawakami *et al.*, 2010; Krogenaes *et al.*, 2012).

Em relação ao grupo 1 verificou-se existência de apenas um animal que não apresentava anticorpos HVC-1. Corresponde ao caso nº 33, uma fêmea com 6 anos de idade, de raça Pinscher. O facto de existir neste grupo mais animais desta raça, idade e sexo, que apresentaram anticorpos HVC-1, impossibilita a averiguação da possibilidade de existir ou não predisposição, para presença de HVC-1 consoante a raça, idade e sexo.

Os animais que compõem o Grupo 1 pertencem a dois canis diferentes de proprietários independentes, em que cada canil era composto por mais de 20 animais cada, tendo-se observado uma seroprevalência de 95%, o que está de acordo com o demonstrado por Ronsee *et al* (2005), que provou o facto de o número de animais positivos para herpesvírus ser bastante superior quando se tem grupos de 20 ou mais animais, em detrimento de grupos de animais de menor dimensão, devendo-se à particularidade de que a vida em grupo potencia a propagação deste vírus.

Foi possível verificar que todas as fêmeas portadoras de sintomas reprodutivos suspeitos, eram positivas para o HVC-1 mas que, além dessas, um nº muito elevado e maioritário de fêmeas assintomáticas também foram positivas, indicando elevada prevalência do vírus em fêmeas que vivem em canis, independentemente de possuírem sintomatologia suspeita. Estes resultados estão de acordo com um estudo preconizado por Ronsee *et al* (2005), que estudou 27 cadelas de reprodução, ao longo do ciclo reprodutivo, e constatou que havia fêmeas negativas para HVC-1, que ao longo do ciclo, sofreram alterações nos títulos de anticorpos HVC-1 e foram consideradas positivas. A permanência e infecciosidade deste vírus, exige a implementação de medidas sérias para o seu controlo.

A maioria das perdas das ninhadas, ocorreram durante a primeira semana de vida dos cachorros, confirmando assim o que vários autores têm vindo a descrever, ou seja, grande parte dos cachorros portadores de HVC-1 acabam por morrer entre a primeira e a terceira semana de idade (Carmichael, 2004; Evermann&Kennedy, 2010; Rootwelt *et al.*, 2011; Greene, 2012; Holst *et al.*, 2012; Kustritz, 2012).

Os animais que compunham o grupo 1 pertenciam a canis de dimensão considerável, coabitando com mais de 20 animais. Estes animais não tem a uma relação tao próxima com o dono como os animais pertencentes ao grupo 2. A este facto pode estar associada a ausência de sinais clínicos respiratórios, oculares e reprodutivos, não pela sua inexistência mas pela possibilidade de poderem passar despercebidos.

No grupo 1, 3 cadelas estavam vacinadas para HVC-1. Apenas a nº 3 apresentava sinais clínicos e por isso foi vacinada, as outras duas foram vacinadas como medida de prevenção. No caso da cadela nº 44 a criadora

registou um aumento do número de crias por ninhada, visto que antes a media era de um cachorro por ninhada e após vacinação passou a uma média de 3-5 cachorros por ninhada

Seria interessante a realização de estudos quantitativos de herpesvírus, com determinação de anticorpos HVC-1, consoante o estado reprodutivo em que a fêmea se encontra, avaliando assim a influência deste fator, bem como a realização de testes periódicos para avaliar a seroconversão descrita por alguns autores, como Ronsee *et al* (2005), que descreveram que um grupo de cães inicialmente revelou ser negativo para herpesvírus canino, tendo 40% dos cães deste grupo sofrido seroconversão, com presença de anticorpos HVC-1. Neste mesmo estudo foi demonstrada uma variação nos títulos apresentados.

Em relação ao Grupo 2, a seroprevalência não foi tão elevada como no grupo 1. Esta diferença pode dever-se ao facto dos cães que compunham a amostra do 2 pertencerem a donos individuais e não a uma colónia como no Grupo 1, e de não apresentarem historial de problemas reprodutivos.

Quanto ao fator idade, este grupo era composto por animais com mais de 5 anos de idade, sendo que todas as faixas etárias apresentaram animais positivos e negativos de forma homogénea, exceto os animais com 8 e 12 anos de idade que apresentam 4 e 3 animais positivos para HVC-1, respetivamente, resultados que se podem dever ao facto de estas duas faixas etárias terem mais animais representados na amostra do que as restantes.

As raças representadas neste grupo obtiveram tanto resultados negativos, como positivos, evidenciando a maioria dos casos positivos e negativos em animais sem raça definida, no entanto o grupo 2 é composto por 13 animais sem raça definida, pelo que não é possível provar a existência de predisposição racial visto que quase metade da amostra era composta por animais sem raça definida.

Relativamente ao género, os resultados obtidos revelam uma clara tendência para animais positivos do sexo masculino, tendo em conta que a amostra era equitativa em relação a ambos os sexos (14 fêmeas e 14 machos), estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Ronsee *et al* (2005), que obteve mais animais, do sexo masculino, positivos para HVC-1.

A maioria dos animais positivos para HVC-1 não apresentavam qualquer tipo de sintomatologia (n=11). Apenas nos casos nº 3, 8, 10, 13 e 17, foram

detetados sinais como anorexia, prostração, tosse, vômito e diarreia, no momento de diagnóstico. É ainda de realçar que todos os animais que indicaram ser negativos para a presença de HVC-1 tinham historial de sintomatologia associada ao linfoma, sendo que havia apenas 3 animais assintomáticos.

Através da comparação do estadio (segundo a OMS) em que o animal se encontrava e da presença do HVC-1, foi possível verificar que 10 dos animais positivos para HVC-1 se encontravam no estadio “IV a” e 8 dos animais negativos para HVC-1 no estadio “IV b”. Ou seja 63% dos animais positivos apresentava todos os gânglios periféricos palpáveis mas com ausência de sinais clínicos, e 66% dos animais negativos apresentava todos os gânglios periféricos palpáveis com presença de sinais clínicos, sugerindo assim uma influência na presença do vírus na manifestação de sinais clínicos.

5. INFORMAÇÃO A DAR AO PROPRIETÁRIO

Antes de apresentar os protocolos aos proprietários devem ser fornecidas algumas noções base, para que estes possam compreender melhor as medidas que vão implementar. Segue-se um exemplo da informação que deve ser dada:

1. Uma vez que, nos primeiros dias de vida, o neonato dependente da progenitora, não só para alimentação mas também para controlo de temperatura, conforto, incentivo para a micção e defecação, não se esqueça de que é essencial respeitar todos estes parâmetros quando não é possível ter a progenitora junto dos cachorros

2. Não podemos esquecer que no útero, o neonato se encontrava sujeito a um ambiente com temperatura controlada e constante, agora, depois de nascer, encontra-se exposto a variações de temperatura e, como também ainda dispõe de pouca gordura subcutânea, isoladora contra as variações de temperatura, é essencial ajudá-lo a manter a temperatura corporal.

Naturalmente a progenitora também ajuda os recém-nascidos na manutenção da temperatura corporal, no entanto, é necessário controlar a temperatura ambiental. Para isso, deve:

2.1. Manter nas primeiras 24 horas de vida do neonato uma temperatura ambiental que deve rondar os 30 a 33°C. Esta deve ser reduzida para os 26 a 30°C nos 3 a 4 dias seguintes.

2.2. Deve ser mantido um registo diário da temperatura corporal, por forma a confirmar que segue a linha padrão:

a) Na altura do parto é de cerca de 36°C;

b) Poucas horas após o parto baixa para os 30°C, voltando depois a subir para os 38°C;

c) Deve manter nos 7 dias seguintes os 38°C.

3. É essencial monitorizar a alimentação dos neonatos e reconhecer quando é necessário suplementar ou alimentar por outra vias que não o leite materno. Quando a fêmea está ausente ou quando por algum motivo não

conseguir fornecer a quantidade de leite necessária aos cachorros é essencial a administração de substitutos deste.

5.1. IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE CUIDADOS DE ENFERMAGEM EM NINHADAS SUSPEITAS DE HERPESVÍRUS

1. Registrar a temperatura dos cachorros diariamente. O proprietário deve manter o registo da temperatura (Tabela 18) dos cachorros, de preferência sempre à mesma hora, utilizando um termómetro lubrificado com vaselina e devidamente desinfetado com álcool após cada utilização. A área que os abrange deve ser devidamente aquecida com recurso a fontes de calor como luz infravermelha (Figura 11).

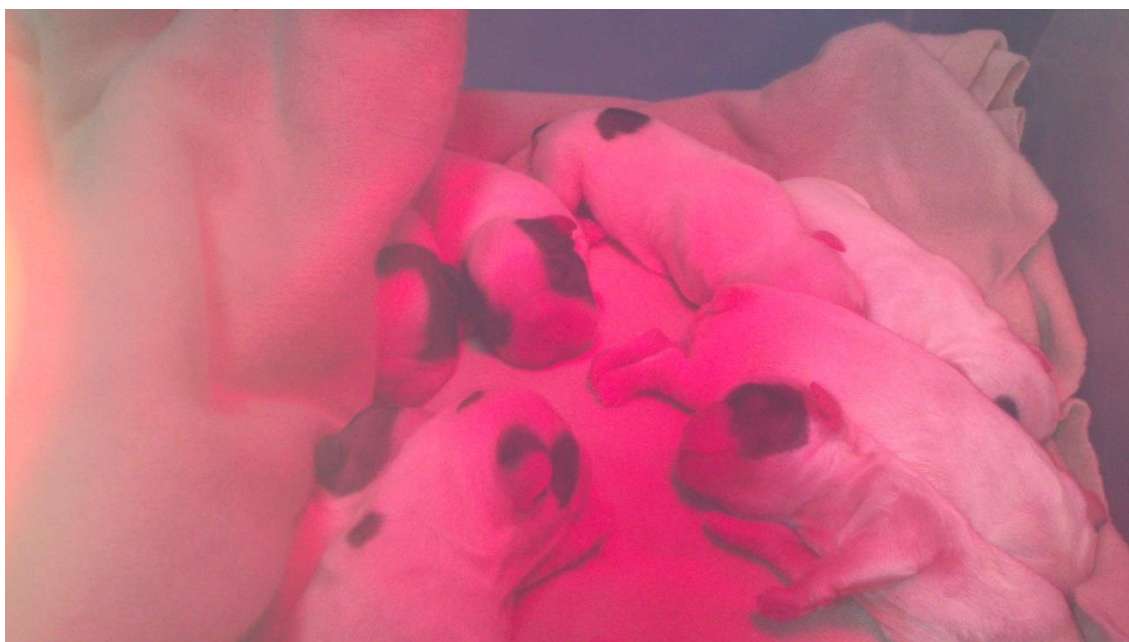


Figura 15. Ninhada de bulldog franceses acondicionados com controlo de temperatura e recurso a luz de infravermelhos (fotografia gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário de Viseu SOS Animal)

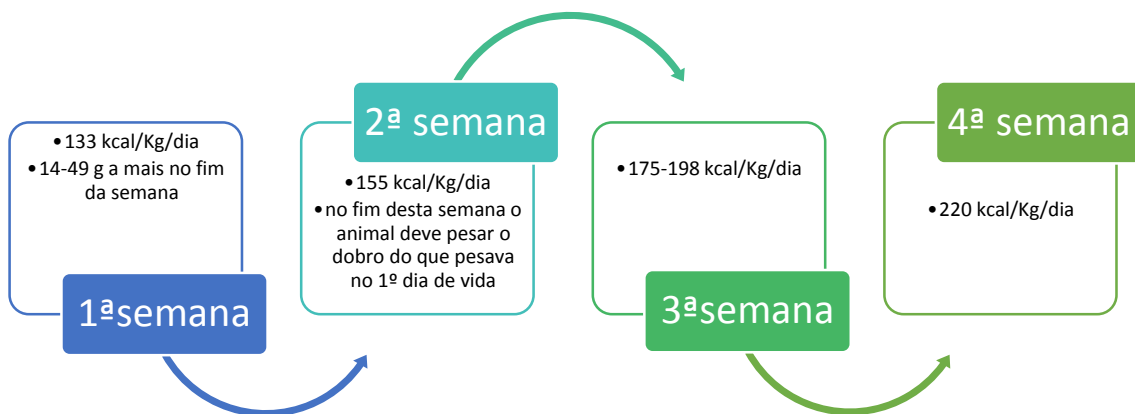
Tabela 18. Sugestão de apresentação de um quadro para registo da temperatura rectal dos neonatos

REGISTO DIARIO DA TEMPERATURA RETAL			
DIA	TEMPERATURA	DIA	TEMPERATURA
1		16	
2		17	
3		18	
4		19	
5		20	
6		21	
7		22	
8		23	
9		24	
10		25	
11		26	
12		27	
13		28	
14		29	
15		30	

2. A área onde se encontram os cachorros deve contemplar uma área distante da fonte de calor, para onde a progenitora se possa dirigir para evitar sobreaquecimento. Deve optar-se por uma estrutura de madeira, em forma de caixilho, com largura, comprimento e altura adequada á raça em questão, permitindo assim que a fêmea consiga entrar e sair facilmente, sem que os cachorros consigam sair.
3. O proprietário deve certificar-se de que todos os cachorros ingerem o colostro. Durante os primeiros dez dias de vida, o sistema imunitário do neonato ainda se encontra em desenvolvimento, pelo que deve ingerir o colostro da mãe imediatamente após parto, conferindo alguma imunidade a infeções, causadas por vírus e bactérias, através dos anticorpos da progenitora. Os cachorros devem começar a mamar pouco depois de nascerem. O

proprietário deve assegurar que todos os cachorros têm acesso ao colostro nas primeiras 24 horas de vida.

- Os neonatos têm poucas reservas de gordura e a capacidade metabólica de gerar glucose a partir dos seus precursores é limitada. No caso de cachorros alimentados com dietas de substituição, as doses recomendadas são cerca de 133 calorias por quilo por dia, na primeira semana, 155 calorias na segunda semana, 175 a 198 na terceira semana, e por fim, 220 calorias na quarta semana. Os cachorros devem ganhar cerca de 2 a 7g por dia, ou seja aumentar o seu peso corporal em 5 a 10%, sendo que 10 a 12 dias após o parto o seu peso a atingir deve ser o dobro do peso do primeiro dia de vida.



Ex: um cão de raça média, deve ter entre 250 gramas a 350 gramas quando nasce.

Assumindo o valor de 350 gramas de peso vivo do cachorro este deve ingerir cerca de 47 kcal no primeiro dia. Devido ao rápido crescimento devem ser pesados diariamente e as quantidades ajustadas. Se no final da semana o cão tiver mais 25 gramas a energia requerida é de cerca de 50 kcal.

Este exemplo deve ser aplicado para as semanas seguintes, ajustando o peso e a energia requerida consoante a idade.

5. Assim, para se certificar que o cachorro vai aumentando de peso, de forma equilibrada, o proprietário deve registar diariamente o peso dos cachorros, sempre a mesma hora, antes da amamentação, durante as 2 primeiras semanas, e, posteriormente, de 3 em 3 dias até às 4 semanas (Tabela 19).

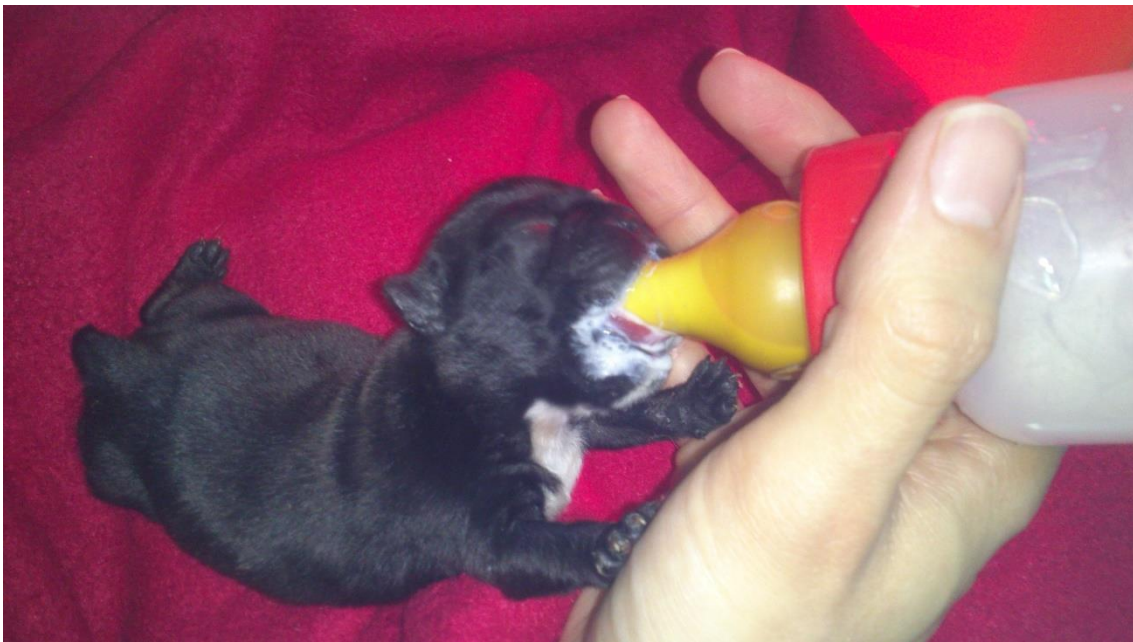


Figura 16. Alimentação com recurso a biberon (fotografia gentilmente cedida por Hospital Veterinário de Viseu-SOS Animal)

Tabela 19. Sugestão de apresentação de um quadro para registo do peso vivo dos neonatos.

REGISTO DO PESO NAS PRIMEIRAS DUAS SEMANAS DE VIDA	
DIA	PESO KG
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

10	
11	
12	
13	
14	
15	
REGISTO DO PESO A PARTIR DAS 2 SEMANAS ATÉ ÀS 4 SEMANAS DE IDADE	
DIA	PESO KG
18	
21	
24	
27	
30	



Figura 17. Monitorização do peso do neonato (Adaptado de Moxon & England, 2012)

- Os cachorros devem ser mantidos em boas condições de higiene e longe de possíveis focos de infeção como outros cães do canil, idealmente em compartimentos isolados, sem acesso a outros animais. A limpeza dos canis deve ser feita diariamente. Um exemplo eficaz é a limpeza com lixívia diluída (1litro de lixívia em 30 litros de água) ou a clorhexidina.

No caso de desenvolvimento de sinais clínicos de HVC-1 nos cachorros, devem ser prestados cuidados adicionais, através do médico e enfermeiro veterinário, os quais incluem:

1. Principalmente quando a progenitora não tem anticorpos contra HVC-1, a administração de soro de um cão seropositivo pode conferir alguma imunidade aos cachorros. Para tal é necessário o controlo de animais seropositivos através de testes serológicos regulares. Pode ser feita também a administração de soro da progenitora se esta for seropositiva, em conjunto com o colostro, reforçando assim a imunidade dos cachorros. Esta medida só é eficaz quando a infeção não é generalizada. A partir do momento em que surgem os sinais clínicos, a administração de soro subcutâneo não tem qualquer influência no decorrer da infeção.
2. Se o neonato não tiver o reflexo de mamar, pode administrar-se uma solução aquecida de lactato de ringier e com solução de glucose a 5% via subcutânea, na dose de 1mM por cada 30 gr de peso vivo, até que o cachorro consiga mamar ou ser alimentado com fórmulas específicas de substituição do leite materno. Pode também recorrer-se ao uso da sonda nasogástrica, para forçar a alimentação.
3. No caso de se comprovar que uma fêmea gestante é seropositiva e por forma a evitar a passagem do HVC-1 para o cachorro, via canal do parto, deve optar-se por fazer a cesariana e separar a progenitora dos cachorros.

Proprietário

Regulação e registo da temperatura dos cachorros

Veterinário/Enfermeiro vet

Cuidados de nutrição e registo do peso vivo/colostró

administração de soro subcutâneo

cesariana/isolamento

Alimentação forçada/Suplementada

Acondicionamento adequado da fêmea e crias/higiene dos cães

5.2. APLICAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE CUIDADOS PREVENTIVOS PARA O HERPESVÍRUS CANINO

Para manter as ninhadas viáveis e também toda a colônia saudável, os principais cuidados preventivos a aplicar incluem:

1. Aplicação do protocolo vacinal para HVC-1, em todas as fêmeas de reprodução, para conferir proteção à progenitora e também aos neonatos.
2. Realizar inseminação artificial, em detrimento da monta natural, para diminuir a probabilidade de transmissão de herpesvírus canino. A recolha de sêmen é feita pela ajuda do médico ou enfermeiro veterinário. A inseminação da fêmea

pode ser realizada logo de seguida, evitando necessidade de recorrer a métodos de conservação do sémen.

3. Isolar animais seropositivos, evitando o contacto com os animais saudáveis, com o intuito de diminuir a probabilidade de haver transmissão do vírus.
4. Para os animais seropositivos, é também recomendável a castração dos machos e a esterilização das fêmeas, eliminando-os, assim, do programa de reprodução.
5. Testar os animais recém-adquiridos antes da sua introdução nos canis.
6. Manter instalações com ventilação e higienização adequada. Sugere-se a limpeza diária com desinfetantes comuns, como a lixívia e dissolventes lipídicos, como álcool, éter e acetona.
7. Isolar os cachorros dos outros animais pertencentes ao canil, devendo, para isso, a maternidade estar separada das restantes instalações, por forma a evitar o contacto entre animais e a transmissão do vírus, mesmo que a ninhada seja saudável e proveniente de parto normal, com a progenitora saudável.
8. As fêmeas gestantes ou macho e fêmea na altura da cópula, não devem ser sujeitos a fatores de stresse como viagens, concursos e manipulação.

Cuidados preventivos

Animais

Protocolo vacinal Castração/OVH

Inseminação artificial

Castração/OVH

Testes HVC-1

Evitar stress

Instalações

higiene adequada

isolamento da
maternidade

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a seroprevalência elevada no grupo 1 se encontra relacionada com a vida em grupo, já que cada um dos canis amostrados possuía cerca de 50 animais cada, em contacto uns com os outros, o que é potenciador da transmissão do vírus via oronasal e via genital, através da cópula.

Não foi encontrada qualquer relação significativa entre a seropositividade ao HVC-1 e o sexo, idade ou raça.

Foi também possível encontrar uma associação positiva de 100% entre o historial de problemas reprodutivos e perdas de ninhadas com a seropositividade ao HVC-1, contudo a elevada seropositividade em fêmeas assintomáticas demonstrou a elevada prevalência do vírus em fêmeas de vida comunitária, independentemente de possuírem sintomatologia suspeita. Logo, a permanência e disseminação da infeção deste vírus, exige a implementação de medidas sérias para o seu controlo.

Não foi detetada relação entre a seroprevalência do herpesvírus e a presença de linfoma.

Conclui-se assim, que é imprescindível que os proprietários ou responsáveis de canis sejam consciencializados para importância do HVC-1 e que o enfermeiro veterinário tenha um papel dinâmico na apresentação bem fundamentada, numa fase inicial, e implementação, numa segunda fase, de protocolos de saúde, prevenção e monitorização junto dos mesmos. Estes protocolos devem incluir um conjunto de medidas eficazes que constituam uma ajuda prática e objetiva na prevenção da doença e suas perdas associadas.

7. BIBLIOGRAFIA

Acar A, Gur S, Dogan I, Akca Y (2009). A serologic investigation of canine herpesvirus type 1 infection in kangal dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **8**: 1377-1380.

Buonavoglia C, Martella (2007). Canine respiratory viruses. *Veterinary Research*. **38**: 355 - 373.

Carmichael L (2004). Neonatal Viral Infections of Pups: Canine Herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus-1). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. 4.

Carter G, Wise D, Flores E (2006). Herpesviride. *A concise review of veterinary virology*. 4.

Chiu H, Chow K, Fan Y, Chang S, Chiou S, Chiang S, Chiou C, Wu G, Yang H, Ho S, Chen y, Lee W, Sun H (2013). Expression of EBV-encoded oncogenes and EVB-like virions in multiple canine tumors. *Veterinary Microbiology*. **163**: 79-89.

Davidson A (2003). Approaches to Reducing Neonatal Mortality in Dogs. In: Service IVI. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, 4.

Davidson A (2006). Current concepts on infertility in the bitch. *Waltham Focus*. **16**: 13 - 21.

Davidson A (2009). The Order Herpesvirales. *Archives of Virology*. **154**: 171-177.

Day M (2007). Immune system development in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*. **137**: S10-S15.

Decaro N, Amorisco F, Desario C, Lorusso E, Camero M, Bellacicco A, Sciarretta R, Lucente M, 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**: 176-180.

Decaro N, Martella V, Buonavoglia C (2008). Canine Adenovirus and Herpesvirus. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*. **38**: 799-814.

Djønne B (2007). Infections and perinatal diseases – a comparative overview. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **49**:

England G (2010). Canine Female Infertility. In: Ettinger S, Feldman E. *Textbook of veterinary internal medicine (7ª Edição)*. W. B. Saunders Company: 1700.

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**: 1493 - 1504.

Evermann J, Kennedy M (2010). Viral infections. In: Elsevier. *Small animal pediatrics: The first 12 months of life* 122-123.

Fontbonne A (2011). L'Herpès-virose canine. *Bulletin De L Academie Veterinaire De France*. **164**: 331-340.

Forsberg CL (2010). Abnormalities in canine pregnancy, parturition, and the periparturient period. In: Ettinger S, Feldman E. *Textbook of veterinary internal medicine*, Saunders: 1633.

Gill M. 2001. Perinatal and late neonatal mortality in the dog, University of Sydney.

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

Griffin B, Verweij M, Wiertz E (2010). Herpesviruses and immunity: The art of evasion. *Veterinary Microbiology*. **143**: 89 - 100.

Haanes E, Tomlinson C (1998). Genomic organization of the canine herpesvirus US region. *Virus Research*. **53**: 151 - 162.

Holst B, Gustavsson M, Grapperon-Mathis M, Lilliehook I, Johannisson A, Isaksson M, Lindhe A, Axné E (2012). Canine Herpesvirus During Pregnancy and Non-Pregnant Luteal Phase. *Reproduction in Domestic Animals*. **47**: 362-365.

Huang S, Kozak P, Kim J, Habineza-Ndikuyeze G, Meade C, Gournier-Hausser A, Patel R, Robertson E, Mason N (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology*. **427**: 107-117.

Huff J, Barry P (2003). B-Virus (Cercopithecine herpesvirus 1) Infection in Humans and Macaques: Potential for Zoonotic Disease. *Emerging infectious diseases*. **9**: 246-250.

Indrebø A, Trangerud C, Moe L (2007). Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **49**: 1 - 5.

Ito D, Frantza A, Modiano J (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1-10.

Kawakami K, Ogawa H, Maeda K, Imai A, Ohashi E, Matsunaga S, Tohya Y, Ohsima T, Mochizuki M (2010). Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. *Journal of clinical microbiology*. **48**: 1176 - 1181.

Kimberlin D, Lin C, Soong S, Kiell J, Lakeman F, Whitley R, Jacobs R, Powell D, Corey L, Gruber W, Rathore M, Bradley J, Diaz P, Kumar M, Arvin A, Gutierrez K, Shelton M, Weiner L, Sleasman J, De Sierra T (2001). Safety and Efficacy of High-Dose Intravenous Acyclovir in the Management of Neonatal Herpes Simplex Virus Infections. *Pediatrics*. **108**: 230-238.

Krogenaes A, Rootwelt V, Larsen S, Sjøberg E, Akselsenc B, Skård T, Myhreb S, Renströme L, Klingeborn B, Lundf A (2012). A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population. *Theriogenology*. **78**: 153-158.

Kustritz M (2012). Canine Neonatal Disorders. In: *Management of Pregnant and Neonatal Dogs, Cats, and Exotic Pets* Wiley-Blackwell: 129-144.

Ledbetter E (2013). Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *New Zealand Veterinary Journal*. **61**: 193-201.

Ledbetter E, Kim S, Dubovi E, Bicalho R (2009). Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. **138**: 98-105.

Maclachlan N, Dubovi E (2011). *Fenner's Veterinary Virology* Elsevier: 179-201.

Milman G, Smith K, Erles K (2011). Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Veterinary Microbiology*. **150**: 15-20.

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

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

Mortier F, Daminet S, Vandenabeele S, Maele I (2012). Canine lymphoma: a retrospective study (2009-2010). *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. **81**:

Münnich A (2008). The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Veterinary Research Communication*. **32**: S81-S85.

Murphy F, Gibbs E, Horzinek M, Studdert M (1999). In: Elsevier. *Veterinary virology* 301 - 325.

Nakamichi K, Ohara K, Matsumoto Y, Otsuka H (2000). Attachment and penetration of canine herpesvirus 1 in non-permissive cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. **62**: 965-970.

Noakes D, Parkinson T, England G, Arthur G (2008). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics* (8ª Edição). W. B. Saunders Company: 649-650.

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

Parzefall B. 2010. PCR-based investigation of the presence of herpesvirus in the peripheral vestibular system in cats and dogs, Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Poulet H (2001). Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Veterinary Record*. **148**: 691-695.

Ranjan A (2010). Fading puppy syndrome: An overview. *Veterinary Practitioner*. **11**: 171-173.

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

Rickard V (2010). Birth and the First 24 Hours. In: Peterson M, Kutzler M. *Small animal pediatrics : the first 12 months of life* Elsevier: 11-19.

Rijsewijk F, Luiten E, FJ D, Heijden R, Oirschot J (1999). Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997±1998. *Veterinary Microbiology*. **65**: 1 - 7.

Ronsse V, Poulet H, Verstegen J, Thiry E (2003). L'herpés-virose canine. *Annales de Médecine Vétérinaire*. **147**: 65-76.

Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H (2004). Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*. **61**: 619-636.

Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberlé C, Brunet S, Poulet H (2005). Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*. **64**: 61-74.

Rootwelt V, Lund A, Krogenaes A (2011). Herpes virus infection in the dog – a review. *European Journal of Companion Animal Practice*. **21**: 31-36.

Simpson G, England G, Harvey M (2004). The Neonate: Congenital Defects and Fading Puppies. In: *BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology* BSAVA: 1788-1801.

Tischer B, Osterrieder N (2010). Herpesviruses - a zoonotic threat? *Veterinary Microbiology*. **27**: 3-4.

Tønnessen R, Borgea K, Nødtvedta A, Indrebø A (2012). Canine perinatal mortality: A cohort study of 224 breeds. *Theriogenology*. **77**: 1788-1801.

Vail D, Pinkerton M, Young K (2012). Hematopoietic Tumors. In: Withrow S, Vail D, Page R. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition* Saunders: 608. 4.

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

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A

PROTOCOLO UTILIZADO NA DETEÇÃO DE ANTICORPOS HVC-1



CHV ANTIBODY TEST KIT

An ELISA test to detect antibodies
against Canine Herpes Virus
in serum or plasma.

(Cat.no.: D1004-AB01)

BV EUROPEAN VETERINARY LABORATORY EVL

7-1997

chv

I INTRODUCTION

Canine Herpes Virus (CHV). Neonatal canine herpes infection, fading puppy syndrome is an important disease in young dogs (wild and domestic). This infection results in a high rate of mortality under pups. Only pups become heavily infected because the thermo regulation of young pups doesn't function well and the virus multiplies the best at a temperature between 25°C - 30°C. Older dogs develop only subclinical infections and have only symptoms like respiratory tract infections.

When pregnant bitches become infected this can result in abortion. Antibody titers are usually low. In infected populations many dogs have high or intermediary titers. Some of the recovered dogs become carriers of the virus and can infect other dogs. Important in the diagnosis of CHV are:

- clinical history
- clinical signs
- laboratory findings: - antibody detection

II INTENDED USE OF THE TEST KIT

The CHV ELISA test kit is designed to detect antibodies against CHV proteins. CHV proteins are attached to the solid phase. After washing the strips are incubated with the dog sera to be tested. The strips are washed after incubation to remove unbound materials. A HRPO labeled anti-species conjugate is added to detect bound dog antibodies to CHV proteins. After incubation and rinsing the substrate is added and the optical density is measured at 450 nm.

III PRINCIPLE OF THE TEST

- The test is based on the reaction of CHV proteins with polyclonal dog antibodies. To this end CHV proteins have been coated to a 96-well microtiter plate.
- The diluted dog serum/plasma sample is added to the wells of the coated plate.
- After washing the bound dog antibodies are detected by a HRPO conjugated antispecies conjugate.
- The color reaction in the wells is directly related to the concentration of CHV antibodies in the serum/plasma sample.

IV CONTENTS

- 12 x 8-well microtiter strips coated with CHV proteins
- 1 x stripholder
- 2 x 6 ml HRPO-conjugated (anti-species) antibody
- 1 x 1 ml CHV weak positive control serum (freeze dried)
- 1 x 1 ml CHV negative control serum (freeze-dried)
- 1 x 60 ml wash solution 200 x concentrated, which must be diluted in deionized water before use!
- 3 x 5 ml ELISA buffer
- 1 x 8 ml substrate buffer A
- 1 x 8 ml substrate buffer B
- 1 x 8 ml stop solution
- 1 x plastic cover seal

V HANDLING AND STORAGE OF SPECIMENS.

The kit should be stored at +4°C. An open packet should be used within 10 days. Samples may be used fresh or may be kept frozen below -20°C before use. Positive and negative controls may be stored after reconstitution in aliquots at -20°C and used until the expire date. Avoid repeated freezing and thawing as this increases non-specific reactivity and decrease antibody titer.

VI WASHING PROTOCOL

In ELISA's, un-complexed components must be removed efficiently between each incubation step. This is accomplished by appropriate washing. It should be stressed that each washing step must be carried out with care to guarantee reproducible inter- and intra-assay results. It is essential to follow the washing procedures outlined below. Washing may be done manually or with automatic equipment. Automatic washing equipment usually gives better results.

Manual washing

1. Empty each well by turning the microtiter plate upside down, followed by a firm vertical downward movement to remove the buffer.
2. Fill all the wells with 250 μ l washing solution.
3. This washing cycle (1 and 2) should be carried out at least 4 times.
4. Turn the plate upside down and empty the wells by a firm vertical movement.
5. Place the inverted plate on absorbent paper towels and tap the plate firmly to remove any residual washing solution in the wells.
6. Take care that none of the wells dries out before the next reagent is dispensed.

Washing with automatic equipment

When automatic plate washing equipment is used, check that all wells are aspirated completely and that the washing solution is correctly dispensed, reaching the rim of each well during each rinsing cycle. The washer should be programmed to execute at least 4 washing cycles.

VII TEST PROTOCOL

1. Open the packet of strips and take out the strips to be used. Cover the remaining strips with a part of the provided seal and store them at +4°C. and use them within 10 days.
Wash the microtiter strip(s) with washing solution, according to washing protocol. The washing solution provided must be diluted 200 x in deionized water!
2. Qualitative: Make a dilution 1:100 of each sample in ELISA buffer in a round bottomed titer plate. Make a dilution 1:50 of the (weak) positive and negative control.
Quantitative: Make 3-step dilutions of each sample in ELISA buffer, starting 1:30 (90; 270; 810) in a round bottomed microtiter plate. Make also a 3-step dilution of the positive and negative control.
3. Transfer 100 μ l of this dilutions to the CHV coated microtiter strips.
4. Seal and incubate for 60 min. at 37°C.
5. Wash as in 1.
6. Dispense 100 μ l conjugated anti-species antibody to all wells.
7. Seal and incubate 60 min. at 37°C.
8. Wash as in 1.
9. Mix equal parts of buffer A and buffer B with gentle shaking. Prepare immediately before use! Dispense 100 μ l substrate solution to each well. Incubate 15-25 min. at room temperature (21°C).

10. Add 50 µl stop solution to each well; mix well.
11. Read the absorbency values immediately (within 10 min.!) at 450 nm. Use as a reference a wavelength of λ 620nm.

VIII PRECAUTIONS

- Handle all biological material as though capable of transmitting CHV.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or prepare foods, or apply cosmetics within the designated work area.
- TMB is toxic by inhalation, through contact with skin or when swallowed; observe care when handling the substrate.
- Do not use components past the expire date and do not mix components from different serial lots together.
- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy.
- Each well is ultimately used as an optical cuvette. Therefore, do not touch the under-surface of the microtiter plate and protect it from damage and dirt.

IX VALIDATION OF THE TEST

In order to confirm appropriate test conditions, the weak positive control should give an extinction ≥ 0.300 OD units and an end point titer ≥ 90 . The negative control should give an OD ≤ 0.250 and an end point titer ≤ 30 .

X INTERPRETATION OF TESTRESULTS

This test can be used in two ways:

- a. qualitatively: positive or negative
- b. quantitatively: end point titer

- a. A sample is scored positive if the OD is higher than 2,5 x OD of the negative control.
- b. The end point titer of the sample is the dilution which gives an extinction just above 0.250 OD units (450nm)

Antibody titers of 90 and higher in diseased animals showing signs suggestive of CHV are considered positive and the dog will be suspected of shedding CHV. A rise in antibody titer in a dog with CHV represents an exaggerated, immune response.

In summary:	≤ 30	=	no antibodies found
	90-270	=	diseased , antibodies found, probably shedding CHV, retest in 3 months not diseased , low titers, normally found in completely recovered dogs but they still might be virus carriers.
	≥ 810	=	high titer of antibodies found in young animals recovered diseased animals.

The entire risk as to the performance of these products is assumed by the purchaser. EVL shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of the products.

8.2. ANEXO B

FORMULÁRIO UTILIZADO NA RECOLHA DE DADOS DOS CÃES UTILIZADOS NO ESTUDO

HERPES VÍRUS:
CUIDADOS DE ENFERMAGEM VETERINÁRIA

RECOLHA DE
DADOS

Amostranº _____

Nome do animal: _____

Idade: _____

Raça: _____

Macho Fêmea

Estado reprodutivo: _____

Historial de doenças e/ou medicações:

Preencher se for fêmea:

a. Vacinação para herpesvírus: SIM NÃO

b. Historial reprodutivo: _____

c. Número de ninhadas e crias por ninhada: _____

d. Abortos? _____

e. Dificuldade em ficar prenha? _____

f. Ninhadas que não foram bem-sucedidas? _____

g. Problemas reprodutivos?

8.3. ANEXO C

FORMULÁRIO PREENCHIDO PELO CRIADOR/DONO DA ASSOCIAÇÃO OU HOTEL

HERPES VÍRUS:
CUIDADOS DE ENFERMAGEM VETERINÁRIA

QUESTIONÁRIO

Canil para fins de:

- a. Abrigo de animais abandonados
- b. Hotel
- c. Criação de cães de raça

Número total de animais: _____

Número de fêmeas: _____

Número de machos: _____

Número de crias: _____

Observações:
