

**UNIVERSIDADE FERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DO HERPESVÍRUS
CANINO TIPO-1 EM CADELAS COM HISTÓRICO
DE DESORDENS REPRODUTIVAS NO SUDESTE
DO BRASIL**

Thaís Reis dos Santos
Médica Veterinária

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

**UNIVERSIDADE FERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DO HERPESVÍRUS
CANINO TIPO-1 EM CADELAS COM HISTÓRICO
DE DESORDENS REPRODUTIVAS NO SUDESTE
DO BRASIL**

Thaís Reis dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley

Dissertação Apresentada ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária- UFU como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica Médica e Investigação Etiológica).

**Uberlândia - MG
Janeiro - 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237d Santos, Thaisa Reis dos, 1986-
2014 Detecção molecular do herpesvírus canino tipo-1 em cadelas com histórico de desordens reprodutivas no sudeste do Brasil / Thaisa Reis dos Santos. – 2014.
41 f. : il.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros.

Coorientadora: Selwyn Arlington Headley.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. I. Medeiros, Alessandra Aparecida. II. Headley, Selwyn Arlington. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

*“Nem olhos viram, nem ouvidos
ouviram, nem o coração do homem
pode imaginar o que Deus tem
preparado à seus filhos que O
amam!!!”*

AGRADECIMENTOS

À Deus minha gratidão pelo seu grande amor e cuidado! Pela vida, saúde, sabedoria e oportunidade de concretizar mais uma etapa de minha formação com sucesso!

Aos meus pais pelas orações e demonstrações de amor e afeto! Obrigada por apoiar minhas decisões e entendê-las!

Ao meu amor sou grata pelas palavras de incentivo e por sempre acreditar nos meus sonhos! Agradeço pela companhia constante, pelas palavras motivadoras e pelo amor que compartilhamos um com outro, que é tão grande e tão especial, que nos fez formar uma família! Te amo...

Aos meus irmãos e a todos os meus familiares e amigos pelo apoio e orações! Sei que sempre estarão comigo...

Aos meus queridos professores orientadores Dra. Alessandra e Dr. Selwyn pela confiança em minha capacidade profissional. Obrigada pelo apoio e dedicação. Sou grata por repassarem a mim seus conhecimentos, pela troca de experiência e principalmente pela amizade...

Aos profissionais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia pela amizade. São anos de convivência, troca de experiência e aprendizado!

Ao laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina, em especial aos Professores Dr. Amauri e Dra. Alice. À toda equipe sou grata pela receptividade! Minha gratidão por me repassarem ensinamentos fundamentais para a realização desta pesquisa. Os trabalhos realizados em equipe são essenciais para o sucesso de um profissional.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	07
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	08
2.1 Etiologia.....	08
2.2 Epidemiologia.....	09
2.3 Patogênese.....	11
2.3.1 Infecção Neonatal Sistêmica.....	11
2.3.2 Infecção do Sistema Reprodutivo.....	12
2.3.3 Infecção Respiratória.....	12
2.3.4 Infecção Ocular.....	13
2.4 Sinais Clínicos.....	14
2.5 Diagnóstico.....	16
2.6 Controle e Profilaxia.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODO.....	19
3.1 Animais, Local e Coleta de Amostras Biológicas.....	19
3.2 Extração de Ácidos Nucleicos e PCR.....	19
4 RESULTADOS.....	22
5 DISCUSSÃO.....	25
6 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
APÊNDICES.....	37
Apêndice A – Ficha Clínica e Questionário Reprodutivo.....	38
Apêndice B – Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU)....	39

TABELA

	Página
TABELA1. Soroprevalência de herpesvirus canino tipo 1 em populações de cães domésticos.....	10
TABELA 2. Dados biológicos e resultados da PCR para CaHV-1 em amostras de 20 cadelas com desordens reprodutivas, Uberlândia, MG.....	23

FIGURA

Página

FIGURA 1. Coleta de amostras. A. <i>Swab</i> vaginal. B. <i>Swab</i> ocular.....	20
FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras positivas para CaHV-1. 1. Padrão 100pb; 2. Controle positivo; 3. Amostra de urina animal 1; 4. Controle negativo.....	24
FIGURA 3. Árvore filogenética baseada em sequências de CaHV-1 depositadas no <i>GenBank</i> . As setas indicam as sequências de CaHV-1 determinadas nesta pesquisa.....	24

DETECÇÃO MOLECULAR DO HERPESVÍRUS CANINO TIPO-1 EM CADELAS COM HISTÓRICO DE DESORDENS REPRODUTIVAS NO SUDESTE DO BRASIL

RESUMO - O Herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) está associado a desordens reprodutivas e mortalidade neonatal, podendo ser encontrado em cães saudáveis assintomáticos ou associado a manifestações clínicas variadas como lesões vesiculares genitais, infecções oculares e doença respiratória. O objetivo deste estudo foi detectar a presença do CaHV-1, através da reação em cadeia de polimerase (PRC), em amostras de urina e em swab ocular e vaginal de cadelas na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 20 cadelas com histórico ou sinais de desordens reprodutivas. Dois animais apresentaram resultado positivo na PCR (10%) nas amostras de urina e secreção ocular, respectivamente, um diagnosticado com piometra e outro saudável e histórico de natimortalidade. Todas as amostras de secreção vaginal foram negativas. No sequenciamento de DNA as amostras positivas apresentaram 100% de similaridade de nucleotídeos com outras quatro cepas de CaHV-1 já descritas e depositadas no *Genbank*. Os cães positivos na PCR no presente estudo provavelmente eram portadores de infecção latente. A detecção do DNA viral nas amostras avaliadas confirma a presença do CaHV-1 na população canina do município de Uberlândia. Trata-se da primeira detecção molecular do agente na região sudeste do Brasil.

Palavras-Chave: Herpesvírus Canino, infecção latente, reação em cadeia de polimerase, doenças reprodutivas.

**MOLECULAR DETECTION OF CANINE HERPESVIRUS-1 (CAHV-1) IN
BITCHES WITH HISTORY OF REPRODUCTIVE DISORDERS FROM
SOUTHEAST BRAZIL**

ABSTRACT – Canine herpesvirus-1 (CaHV-1) is known to cause reproductive disorders and fatal infections in puppies, and may also be found in asymptomatic dogs or related to vaginal vesicular lesions, ocular infections and respiratory diseases. The aim of this study was investigate the occurrence of CaHV-1 using the polymerase chain reaction (PCR) within urine samples, ocular and vaginal swab samples from Uberlândia, MG, Brazil. Twenty mature bitches, with at least one estrous and reproductive disorders history and/or symptoms were used. Two out of twenty dogs (10%) were positive in the urine and ocular swab samples, respectively, one with pyometra diagnosis and another one healthy with history of stillbirth. No positive results were detected within vaginal swab samples. Sequence analysis of the DNA polymerase gene of the positive samples indicated 100% identity with the sequence of the four CaHV-1 strains selected from Genbank. These findings suggest that positive dogs might be CaHV-1 latent carriers. Additionally, the results confirm the presence of CaHV-1 circulating within urban canine population of Uberlândia, MG. This is the first report that a CaHV-1 infection has been detected in the Southeast Brazil.

Key words: Canine Herpesvirus, latent infection, polymerase chain reaction, reproduction diseases.

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus canino tipo 1 (canine herpesvirus-1; CaHV-1) pode ser encontrado em cães saudáveis assintomáticos ou associado a manifestações clínicas variadas (ANVIK, 1991) como desordens reprodutivas (POSTE; KING, 1971), lesão genital (KRAFT et al., 1986), infecção ocular (LEDBETTER et al., 2009a; EVERMANN et al., 2011), doença respiratória (BUONAVOGLIA; MARTELLA 2007) e mortalidade neonatal (OLIVEIRA et al., 2009; GREENE, 2012).

O vírus pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae* e gênero *Varicellovirus* (FRANCO et al., 2012) e foi primeiramente descrito em 1965 como o agente causador da doença hemorrágica fatal em neonatos (CARMICHAEL et al., 1965).

Desordens reprodutivas como reabsorção embrionária, abortos e natimortos estão associadas à infecção pelo CaHV-1 (POSTE; KING, 1971; GREENE, 2012). Além disso, a cadela pode apresentar lesão papulovesicular na mucosa vaginal (KRAFT et al., 1986). Cães imaturos e adultos podem apresentar alterações respiratórias (KARPAS et al., 1968; KAWAKAMI et al., 2010) e doença ocular (LEDBETTER et al., 2006; EVERMANN et al., 2011).

Latência do CaHV-1 tem sido demonstrada em gânglios sensoriais (MIYOSHI et al., 1999; ANVIK, 1991), podendo ser reativado nas quedas de imunidade do animal devido ao estresse, gestação, doenças prévias ou uso de medicamentos (OKUDA et al., 1993; RONSSE et al., 2004; LEDBETTER et al., 2009b; GREENE, 2012). Os portadores latentes, geralmente animais assintomáticos, corroboram para a disseminação do vírus entre a população canina (RONSSE et al., 2005; DAHLBOM et al., 2009). Neste sentido, os canis e abrigos apresentam-se como locais importantes para a circulação do vírus, já que os animais encontram-se aglomerados e os sinais clínicos da infecção são inespecíficos.

O CaHV-1 é mundialmente distribuído, com soroprevalência maior que 40% em algumas populações caninas (RIJSEWIJK et al. 1999; RONSSE et al.,

2002; LEDBETTER, 2013). No entanto, a real soroprevalência do CaHV-1 ainda não é conhecida no Brasil e os estudos envolvendo a infecção pelo vírus são escassos. Além disso, não há relatos na literatura da presença do vírus na região Sudeste do Brasil.

A alta taxa de mortalidade e morbidade entre filhotes pelo CaHV-1 (OLIVEIRA et al., 2009) e as perdas relacionadas aos problemas reprodutivos, principalmente em cadelas reprodutoras infectadas (RONSSE et al., 2005; DAHLBOM et al., 2009), são fatores que ressaltam a importância de estudos envolvendo a infecção pelo CaHV-1. No Brasil, pouco se sabe sobre a influência do vírus na ocorrência de desordens reprodutivas em cadelas.

A carência de sistemas de diagnóstico etiológico e sorológico disponíveis na rotina clínica dos hospitais veterinários e a ausência de suspeita clínica pelo médico veterinário, no Brasil, evidenciam que as infecções pelo CaHV-1 têm sido negligenciadas.

Dessa maneira, objetivou-se detectar a presença do CaHV-1 em secreções e excreções de cadelas com histórico de desordens reprodutivas na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, utilizando as ferramentas da biologia molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O CaHV-1 é um vírus DNA, envelopado, possui rápida replicação intracelular seguida por efeito citopático (lise celular), formação de inclusões intranucleares e indução de sincícios em algumas situações. A replicação ocorre dentro do núcleo do hospedeiro, como em todos os Herpesvírus. O vírus é inativado a -20°C, estável a -80°C e pH entre 6,5 e 7,6, sendo rapidamente destruído em pH <5 ou pH >8. A temperatura ótima de replicação do CaHV-1 é de 37°C e está relacionada à sua predileção por gânglios, tecidos linfóides e mucosa genital, ocular e nasal (GREENE, 2012).

Embora o CaHV-1 possua relação antigênica com o Herpesvírus Felino tipo 1 (FHV-1) (FRANCO et al., 2012), ele é altamente espécie específico e infecta células teciduais de canídeos domésticos e selvagens. A infecção inter-espécies pelo herpesvírus pode ocorrer experimentalmente, mas não há relatos desta ocorrência de forma natural (GREENE, 2012).

Uma importante característica entre todos os Herpesvírus é a latência. Quando infectados, o hospedeiro permanece portador do vírus na sua forma latente, com ausência de replicação viral. Assim, não há manifestação de sinais clínicos, caracterizando-se por uma doença subclínica e de difícil diagnóstico. A infecção latente é reativada em situações de estresse, seguida de replicação e excreção viral, com sinais clínicos brandos ou ausentes possibilitando a transmissão viral entre hospedeiros susceptíveis de forma altamente eficaz (FRANCO et al., 2012).

No cão o vírus permanece na sua forma latente nos gânglios trigeminal e lombossacral (BURR et al., 1996; MIYOSHI et al., 1999). As infecções latentes persistem durante toda a vida do animal (FRANCO et al., 2012) e a excreção viral ocorrendo mesmo na ausência de sinais clínicos corrobora para disseminação do vírus entre a população canina (GREENE, 2012).

2.2 Epidemiologia

A infecção pelo CaHV-1 está mundialmente distribuída e a soroprevalência varia de 6% a 100% em vários países (LEDBETTER, 2013), conforme pode ser vista na Tabela 1. As maiores soroprevalências são relatadas na Europa, principalmente em canis de criação, onde a aglomeração de cães é frequente e a disseminação ocorre mais facilmente. Embora altas taxas de anticorpos contra o CaHV-1 estão presentes em várias populações caninas em todo o mundo, muitas vezes os sinais clínicos não são evidentes (GREENE, 2012).

No Brasil há poucas descrições da infecção pelo CaHV-1 em cães. Oliveira et al. (2009) relataram a infecção pelo CaHV-1 em filhotes de duas

ninhadas provocando morte em um curto período de tempo. Avila et al. (2011) relataram a ocorrência da infecção em filhotes da raça Golden Retriever.

Tabela 1. Soroprevalência de herpesvírus canino tipo 1 em populações de cães domésticos

PAÍS	SOROPREVALÊNCIA (%)	REFERÊNCIA
África do Sul	22	Nöthling et al. (2008)
Alemanha	9 a 22	Bibrack, Schaudinn (1976); König et al. (2004)
Argentina	23	De Palma et al. (2010)
Bélgica	46	Ronsse et al. (2002)
Coréia do Sul	37	Seo et al. (1994)
Eslováquia	36	Mojzisova et al. (2011)
Estados Unidos	6	Fulton et al. (1976)
Finlândia	82	Dahlbom et al. (2009)
França	43	Lacheretz e Cognar (1988)
Holanda	42	Rijsewijk et al. (1999)
Irã	21	Babaei et al. (2010)
Itália	28	Sagazio et al. (1988)
Japão	22 a 26	Takumi et al. (1990); Kawakami et al. (2010)
Lituânia	15 a 85	Musayeva et al. (2013)
Noruega	80	Krogenaes et al. (2012)
Reino Unido	93 a 94	Reading e Field (1999)
Suécia	100	Ström Holst et al. (2012)
Suíça	19	Engels et al. (1980)
Turquia	39 a 72	Acar et al. (2009); Yesilbag et al. (2012)

Nota: Tabela adaptada de Ledbetter (2013)

A transmissão ocorre pelo contato direto de animais susceptíveis com excreção (urina) e secreção ocular, nasal e genital de animais infectados (GREENE, 2012). Neonatos podem ser infectados pelo contato com secreções uterinas no canal do parto (ARDANS, 2007). Além disso, a transmissão transplacentária e pelo coito pode ocorrer (GREENE, 2012).

Após resolução da infecção primária, o animal torna-se portador latente e a infecção viral poderá ser reativada esporadicamente, principalmente em situações associadas ao estresse como superpopulação em canis, transporte, prenhez, terapia imunossupressora (LEDBETTER et al., 2009b; MALONE et al., 2010) ou doença concomitante que interfiram na queda de imunidade do animal (OKUDA et al., 1993; RONSSE et al., 2004). O vírus é sensível a altas

temperaturas e no ambiente, mas se mantém na natureza devido à latência no hospedeiro (GREENE, 2012).

2.3 Patogênese

2.3.1 Infecção Neonatal Sistêmica

Neonatos adquirem o vírus pela ingestão ou inalação de secreções contaminadas no canal do parto, de outros cães ou fômites. No útero, o feto é infectado através da transmissão transplacentária e o efeito da infecção dependerá do estágio da gestação em que ocorreu a infecção (GREENE, 2012). Mumificação de feto, reabsorção embrionária, aborto e natimorto têm sido relatados (POSTE; KING, 1971; ANVIK, 1991). Neonatos que sobreviveram à infecção adquirida no ambiente uterino provavelmente permanecerão com infecção latente vitalícia (GREENE, 2012). No entanto, a maioria deles desenvolverá a infecção em até nove dias do nascimento (OLIVEIRA et al., 2009; GREENE, 2012).

A primeira replicação ocorre 24 horas após a inoculação em mucosas e células epiteliais. Via macrófagos o vírus alcança a circulação sanguínea e a viremia estará presente de três a quatro dias após a inoculação. Pode ocorrer necrose hemorrágica multifocal progressiva em vários órgãos relacionada à vasculite e trombocitopenia que ocorre durante a infecção. O vírus pode ainda atingir o sistema nervoso central, mas os animais acometidos geralmente vão a óbito antes das manifestações dos sinais neurológicos (GREENE, 2012).

A baixa temperatura corporal (CARMICHAEL et al., 1969), a deficiência do sistema imune (CARMICHAEL; GREENE, 2006) e a influência dos anticorpos maternos (GALOSI, 2007), são fatores predisponentes para o desenvolvimento da infecção neonatal ou resistência da infecção nos primeiros 15 dias de vida.

A temperatura retal dos filhotes (36°C – 37,5°C) é similar à temperatura ideal de replicação do vírus (35°C – 36°C) (CARMICHAEL et al., 1969). Além disso, o filhote não é capaz de regular a temperatura corporal até a 3ª semana

de vida. Filhotes de fêmeas soronegativas poderão desenvolver doença sistêmica multifocal mais grave quando infectados pelo CaHV-1 (GALOSE, 2007). A imunidade adquirida através da ingestão do leite materno pode explicar porque fêmeas naturalmente infectadas poderão obter filhotes saudáveis. Além disso, anticorpos séricos em cadelas prenhes infectadas podem reduzir a viremia e a disseminação da infecção para o feto (GREENE, 2012).

2.3.2 Infecção do Sistema Reprodutivo

Lesões papulovesiculares podem ser encontradas na mucosa vaginal de filhotes maior que três semanas de idade e em fêmeas adultas acometidas pelo CaHV-1 (ANVIK, 1991; MALONE et al., 2010). A localização genital da infecção pode significar transmissão venérea, principalmente aos contactantes (GREENE, 2012).

Geralmente a fêmea que tem filhotes que morreram com infecção pelo CaHV-1 são portadoras assintomáticas (GREENE, 2012). A transmissão transplacentária ocorre no terço médio para o terço final da gestação e resultará em reabsorção embrionária, abortos, mumificação, morte fetal, nascimento prematuro, natimorto ou filhotes fracos (POSTE; KING, 1971; HASHIMOTO et al., 1983).

2.3.3 Infecção Respiratória

O CaHV-1 tem sido isolado de pulmões de cães com cinomose e com conjuntivite aguda (GREENE, 2012). Estudo experimental verificou replicação viral no trato respiratório dos cães infectados e ainda presença de rinite necrosante, pneumonia broncointersticial e necrose alveolar multifocal (KARPAS et al., 1968; THOMPSON et al., 1972; BUONAVOGLIA; MARTELLA 2007).

Cães neonatos que se recuperaram ou cães adultos que tiveram doença subclínica têm episódios de reaparecimento viral na secreção oronasal, devido

à latência viral. Na reativação das infecções latentes, mesmo o animal assintomático, poderá ter o vírus presente nas secreções nasal, oral, ocular e vaginal, contribuindo para a transmissão viral à população canina (GREENE, 2012).

Há relatos do envolvimento do CaHV-1 na traqueobronquite infecciosa canina (tosse dos canis) (FORD, 2006; KAWAKAMI et al., 2010). Kawakami et al. (2010) relataram um surto de traqueobronquite infecciosa canina causada pelo CaHV-1 em cães hospitalizados. O surto foi seguido de morte de vários cães, sendo que muitos pacientes estavam realizando terapia imunossupressora. Ainda nesse relato, o CaHV-1 foi o único patógeno identificado, evidenciando a importância clínica do CaHV-1 como patógeno na traqueobronquite infecciosa canina.

2.3.4 Infecção Ocular

Lesões oculares podem estar presentes na infecção pelo CaHV-1. As lesões são geralmente mais graves em filhotes podendo tornar-se permanente devido à imaturidade dos tecidos (EVERMANN et al., 2011). Quando há reativação do vírus ou quando o cão acometido já é adulto, as lesões são tipicamente restritas à superfície ocular (LEDBETTER 2013).

Na infecção intra-uterina ou neonatal, a disseminação hematogênica do vírus pode resultar em infecção intraocular com manifestações clínicas severas. Inclusões virais intranucleares podem ser detectadas na inflamação aguda da retina. A redução da visão ou cegueira é dependente da severidade das lesões oculares (EVERMANN et al., 2011).

A infecção ocular primária ou recorrente pelo CaHV-1 pode ser subclínica ou associada a diversas desordens oculares como blefarite, ceratite, conjuntivite e úlcera de córnea (LEDBETTER et al., 2006; LEDBETTER et al., 2009a). Em muitos casos a infecção ocular primária pelo CaHV-1 apresenta melhora clínica espontaneamente, mas o animal que se recupera poderá desenvolver infecções recorrentes devido à reativação do vírus latente (EVERMANN et al., 2011). Deve-se salientar que devido à latência, poderá

ocorrer excreção viral sem necessariamente o aparecimento de doença ocular (GREENE, 2012).

Infecção latente do CaHV-1 em gânglio trigeminal tem sido relatada (BURR et al., 1996; MYIOSHI et al., 1999), e este deve ser o sítio de reativação do vírus para a ocorrência de doença ocular (LEDBETTER, 2013). Ledbetter et al. (2009b) observaram excreção viral na reativação da infecção latente com presença de doença ocular clínica recrudescente.

Nos cães adultos a manifestação da infecção ocular é dependente da idade e imunidade do animal, sendo a lesão ocular mais severa e persistente naqueles animais imunossuprimidos (LEDBETTER, 2013). Ledbetter et al. (2013) ressaltaram a importância do CaHV-1 como agente etiológico da conjuntivite canina, já que esta é a manifestação ocular da infecção mais frequente.

2.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos são inespecíficos (ANVIK, 1991). Filhotes são mais susceptíveis principalmente durante a primeira e segunda semana de vida desenvolvendo doença fatal necrosante e hemorrágica (CARMICHAEL et al., 1965; OLIVEIRA et al., 2009). Cães com mais de duas semanas de vida e adultos geralmente são assintomáticos (GREENE, 2012). No entanto, a infecção severa sistêmica pode ocorrer no animal adulto similar a infecção sistêmica neonatal (KAWAKAMI et al., 2010; MALONE et al., 2010; GADSEN et al., 2012). Gadsen et al. (2012) relataram infecção fatal por herpesvírus em um cão adulto de 9 anos de idade sem indicação de ocorrência de imunossupressão. Nesse mesmo relato a cadela apresentava tosse, descarga nasal, hepatomegalia e hipotermia. Os autores ressaltaram a importância do diagnóstico diferencial de infecção pelo CaHV-1 em cães com hepatopatia aguda.

Os neonatos podem apresentar depressão, apatia, desinteresse na amamentação, perda de peso, fezes verde-amareladas, choro persistente e desconforto abdominal durante a palpação (GREENE, 2012). Oliveira et al.

(2009) citaram anorexia, letargia, intensa dispneia e morte em 48 horas após o início dos sinais em duas ninhadas de cães acometidos pelo CaHV-1. Podem ainda apresentar perda da consciência, opistótono e convulsões. Além disso, aqueles que se recuperarem podem ter persistência dos sinais neurológicos como ataxia, cegueira, déficit cerebelar e vestibular (APPEL, 1987).

Alguns animais apresentam vesículas eritematosas nas mucosas (oral e genital) e rinite com secreções mucopurulentas e raramente associadas à hemorragia nasal (GREENE, 2012). Afecções em sistema respiratório como rinite, faringite e traqueobronquite em animais infectados, têm sido relatadas (APPEL et al., 1969; BUONAVOGLIA; MARTELLA 2007; KAWAKAMI et al., 2010).

O vírus se estabelece em gânglios sensoriais oculares causando afecções oculares recorrentes devido à infecção e replicação viral. Conjuntivite é a manifestação ocular mais frequente na infecção pelo CaHV-1 e pode ocorrer de forma isolada ou associada a outras anormalidades de pálpebra e córnea (LEDBETTER, 2013). Segundo Albert et al. (1976), inflamação ocular severa com displasia de retina, catarata e ceratite ocorre em cães expostos ao CaHV-1. Nos animais adultos a infecção pelo CaHV-1 se manifesta com uma diversidade de sinais clínicos como blefarites, conjuntivites e ceratites ulcerativas e não ulcerativas (LEDBETTER et al., 2006; MALONE et al., 2010). Ledbetter et al. (2006) ainda relataram ocorrência de blefaroespasmo, fotofobia e descarga ocular discreta, mucopurulenta ou até mesmo serosanguinolenta com a progressão da infecção (LEDBETTER et al., 2006).

Sinais como balanopostite no macho (FOSTER, 2007), infertilidade, aborto, natimortos, mumificação, morte fetal (HASHIMOTO et al., 1983) e vulvovaginite (MALONE et al., 2010) podem estar presentes nos animais infectados. Embora não exista relato na literatura de relação da infecção pelo CaHV-1 em cadelas com piometra, ressalta-se a importância desta desordem uterina que ocorre comumente em 25% das cadelas não castradas (EGENVALL, 2001). Trata-se da uteropatia mais comumente encontrada em cadelas (BIDLE; MACINTIRE, 2002). Aspectos hormonais podem desencadear

o desenvolvimento da infecção uterina e corroborar para a o aparecimento de infecção secundária (CONCANNON, 2011).

2.5 Diagnóstico

O histórico do animal é importante na suspeita da ocorrência de infecção pelo CaHV-1. Embora os sinais clínicos sejam raros de ocorrer, deve-se avaliar principalmente a presença de pápulas e vesículas em mucosas. As alterações em exames laboratoriais de rotina como hemograma e bioquímica são inespecíficas, mas trombocitopenia e aumento da alanina aminotransferase (ALT) pode ocorrer em neonatos infectados (APPEL, 1987). Gadsen et al. 2012 também observaram aumento de ALT em uma cadela adulta com infecção pelo CaHV-1.

O teste ouro para o diagnóstico do CaHV-1 é o isolamento viral, principalmente em adrenal, rins, pulmões, baço, linfonodos e fígado de filhotes que morrem com infecção sistêmica. Além disso, é possível obter o crescimento viral em cultura de células primárias isoladas de cão (*Madin Darby canine kidney* - MDCK) (APPEL, 1987).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido utilizada com sucesso para o diagnóstico do CaHV-1 (HOLST et al., 2012; GADSDEN et al., 2012; LEDBETTER 2013). A PCR possibilita a multiplicação em milhões de cópias do genoma de qualquer organismo, sendo uma técnica de diagnóstico eficaz de alta especificidade e sensibilidade. A PCR é eficaz na detecção da infecção latente do CaHV-1 em cães assintomáticos (BURR et al., 1996; DECARO et al., 2010).

Segundo Burr et al. (1996) a técnica da PCR é mais sensível em relação a outros testes diagnósticos e evidencia a natureza e a extensão do vírus latente. Em pesquisas, Burr et al. (1996) verificaram sucesso da utilização da PCR para identificar o CaHV-1 em vários tecidos de cães adultos sem exposição ou doença causada pelo CaHV-1. Realização de PCR de amostras biológicas em swabs vaginais, oculares e nasais tem sido utilizados para a detecção do CaHV-1 nas secreções de cães suspeitos (KAWAKAMI et al.,

2010; MALONE et al., 2010; LEDBETTER et al., 2009b; HOST et al., 2012). Além disso, resultado positivo de PCR tem sido obtido de amostras de sangue total evidenciando viremia (MALONE et al., 2010).

A técnica de PCR permite a detecção do DNA viral em vários tecidos e fluidos corporais. Trata-se de uma ferramenta útil para confirmar o diagnóstico clínico além de contribuir na avaliação da eficácia de vacinas e drogas antivirais (DECARO et al., 2010).

Para o diagnóstico do CaHV-1 diferentes testes sorológicos são utilizados, dentre eles a virusneutralização (READING; FIELD, 1998; RONSSE et al., 2002), imunofluorescência indireta (OLIVEIRA et al., 2009), inibição da hemoaglutinação (NEMOTO et al., 1990) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (CARMICHAEL, 1970; RONSSE et al., 2005). No entanto, não são testes padronizados, e variações no nível e prevalência dos resultados positivos têm sido observadas (APPEL, 1987).

A virusneutralização é um teste sorológico de grande especificidade o qual avalia a capacidade de diferentes diluições de soro de prevenir o efeito citopático em células expostas ao CaHV-1 (RONSSE et al., 2002). Ronsse et al. (2002) utilizaram dois testes de virusneutralização, com e sem adição de complemento, e verificaram que a adição do complemento não aumentou a especificidade da soroneutralização. Embora a soropositividade apenas indique exposição ao vírus e não infecção ativa deve-se considerar a persistência da infecção latente no animal soropositivo (APPEL, 1987).

Na necropsia podem ser observados fluidos hemorrágicos em cavidade pleural e peritoneal, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada, petéquias hemorrágicas em vários órgãos e hemorragia multifocal difusa em rim, fígado e pulmão (GREENE, 2012). Na histologia lesões necrosantes em rim, fígado, pulmão, intestino, cérebro, timo e baço são observados (APPEL, 1987). Corpúsculos de inclusão também podem ser visualizados na periferia de tecidos necróticos em hepatócitos, células epiteliais em túbulos renais e células alveolares (OLIVEIRA et al., 2009).

2.6 Controle e Profilaxia

Não há tratamento efetivo para o CaHV-1 e resume-se apenas à terapia de suporte, objetivando evitar infecções secundárias concomitantes. A terapia com soro imune de cadelas que tiveram filhotes que morreram pelo CaHV-1, embora empírico, pode ser realizada. Contudo, o sucesso depende do nível de anticorpos séricos obtidos e deve ser realizada antes do desenvolvimento dos sinais clínicos. Utilização de sucesso na terapia com antiviral (Acyclovir®) tem sido relatado (DE PALMA et al., 2010). Antivirais devem ser utilizados com cautela, pois podem levar a dano residual em sistema nervoso central e miocárdio (APPEL, 1987; GREENE, 2012).

Devido à baixa frequência dos sinais clínicos e fraca imunogenicidade do CaHV-1, não há incentivos para produção de vacinas comerciais. Embora exista a comercialização da vacina em alguns países da Europa, é descrito que estas vacinas aumentam em quatro vezes o título de anticorpos, porém não promovem a proteção por um longo tempo (GREENE, 2012). Para Kawakami et al. (2010) a vacinação de cães adultos pode ter efeito na redução da excreção do vírus de cães infectados e controlar a disseminação a outros susceptíveis.

O manejo, principalmente nos canis de criação, é essencial para controle e profilaxia da infecção pelo CaHV-1. A monitoração e retirada das fêmeas da reprodução quando possuem desordens reprodutivas ou quando estas têm filhotes que desenvolvem a afecção pelo CaHV-1, além da higienização dos canis com desinfetantes e a separação das fêmeas prenhas são medidas eficientes na profilaxia da doença. A elevação da temperatura do ambiente e consequentemente temperatura corporal do filhote, embora não elimine a infecção, pode corroborar para redução da severidade da doença (GREENE, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Animais, local e coleta de amostras biológicas

Foram utilizadas 20 cadelas adultas, em idade reprodutiva, todas com pelo menos um estro, atendidas na rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV/UFU) e procedentes da cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, com sintomatologia ou histórico de desordens do sistema reprodutivo feminino. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU, com o protocolo CEUA/UFU 140/13.

Os animais passaram por avaliação clínica geral e exame específico do sistema genital feminino, de acordo com Feitosa (2008). Além disso, realizou-se um questionário reprodutivo, semelhante ao de Dahlbom et al. (2009). O questionário abordou: número deaios, acasalamentos, ninhadas nascidas, abortos, distocias, natimortos, má formação fetal e mortalidade neonatal.

Após o exame clínico foram coletadas amostras de urina, secreções vaginais e oculares. A urina foi coletada através de cistocentese, sonda uretral ou micção espontânea e 2 ml de urina foram armazenados em eppendorfs a -80 °C. Para a obtenção da secreção vaginal e ocular utilizou-se *swab* estéril de algodão através da fricção na mucosa vaginal e na terceira pálpebra (Figura 1) (MALONE et al., 2010; LEDBETTER et al., 2009b). Cada *swab* foi posteriormente inserido individualmente em tubos eppendorfs, identificados, contendo 1,5 ml de solução PBS pH 7,4 e armazenados a -80°C. Em seguida, o material foi encaminhado ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para posterior realização da técnica de PCR.

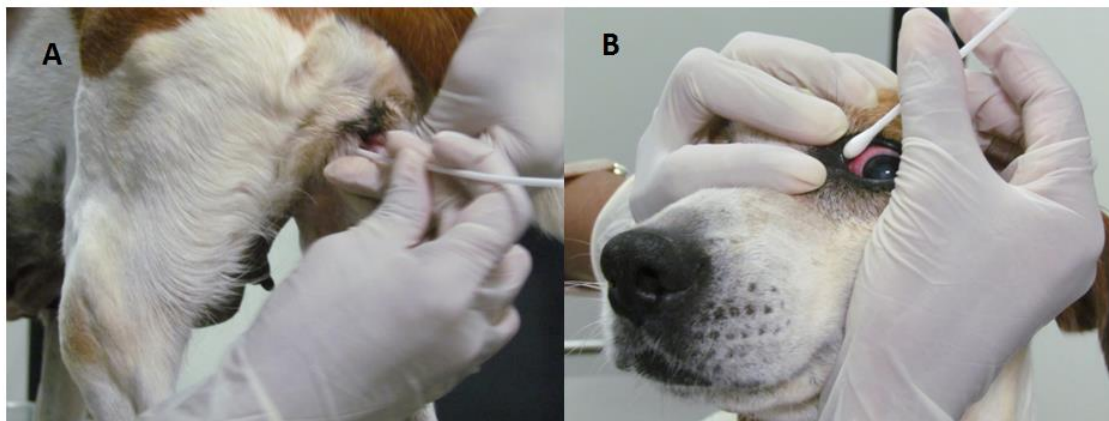


Figura 1. Coleta de amostras. A. Swab vaginal. B. Swab ocular

3.2 Extração de ácidos nucleicos e PCR

O DNA viral nas amostras de urina e swabs ocular e vaginal foram extraídos de acordo com o método de Boom et al. (1990) modificado por Alfieri et al. (2006).

A técnica da PCR para o diagnóstico de CaHV-1 utilizou um *primer forward* (CCTAAACCTACTTCGGATGA) e um *primer reverse* (GGCTTTAAATGAACTT-CTCTGG) (*Invitrogen*[®]) que amplificam um fragmento de 450 pb do gene da glicoproteína B. Os reagentes da PCR são procedentes da *Life Technologies*[®]. As concentrações finais dos reagentes utilizados foram: 2,5 mM de MgCl₂, 500 µM de cada dNTP, 1,25 U de *Taq* polimerase e 10 pmol de cada *primer*, conforme adaptado de Ronsse et al. (2005). Foram utilizados 2,5 µL do material extraído em uma reação com volume final de 25 µL.

A amostra controle positivo foi gentilmente cedidas pelo Dr. Alfieri (Departamento de Virologia – UEL) e água ultrapura livre de nucleases foi utilizada como controle negativo. O DNA viral foi amplificado por desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 49°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 10 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Os produtos amplificados pela PCR foram purificados pelos

kits GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare® , EUA), quantificados em *Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies® , EUA)* e analisados em gel de agarose a 2%.

O sequenciamento das amostras purificadas foi realizado em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), com os *primers sense* e *anti-sense*, para NSP2. A qualidade e edição das sequências obtidas foram realizadas nos programas *Phred* e *CAP3* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências foram analisadas no programa *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para verificar a similaridade de nucleotídeos com os outros genótipos de CaHV-1 já descritos, incluindo sequências de estirpes que estejam depositadas em bases públicas de dados (*Genbank*).

O alinhamento foi realizado no programa *CLUSTAL W* (versão 1.4) e a matriz de identidade obtida no programa *BioEdit* v7.0.8.0. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *neighbor-joining*, modelo *Kimura two-parameter*, com *bootstrap* de 1000 replicações e a distância obtida pelo método de *pairwise distance calculation*, com o modelo de *Kimura two-parameter*, ambas verificadas no programa *MEGA* versão 4.1.

4. RESULTADOS

Foram avaliados 20 animais entre 1 e 14 anos ($6,9 \pm 4,0$) e de diversas raças, sendo 70% (14/20) sem raça definida ou mestiço, 15% (3/20) Poodle, 5% (1/20) Rottweiler, 5% (1/20) Lhasa Apso e 5% (1/20) Pitbull. As cadelas apresentaram as seguintes desordens reprodutivas: 35% (7/20) piometra, 20% (4/20) natimortalidade, 20% (4/20) secreção vaginal, 10% (2/20) distocia, 10% (2/20) aborto, 10% (2/20) mortalidade neonatal, 5% (1/20) lesão papulovesicular em mucosa vaginal e 5% (1/20) má formação fetal. Os dados dos animais avaliados foram, individualmente, apresentados na tabela 2.

Na população canina avaliada, dois animais tiveram resultados positivos na PCR (10%) (Tabela 2). O animal 1, Poodle de 14 anos, apresentou anorexia, caquexia, desidratação e presença de secreção vaginal no exame clínico e foi diagnosticado com piometra e posteriormente submetido à ovariectomia (OSH) onde o diagnóstico foi confirmado pela avaliação macroscópica uterina (aumento de volume uterino e presença de secreção purulenta no lúmen uterino). O animal 2, mestiço de 2 anos, foi encaminhado ao HV/UFU para a realização de castração eletiva. No exame clínico não apresentou nenhuma alteração digna de nota, no entanto tinha histórico de parição com natimortos do primeiro cio do animal.

Tabela 2. Dados biológicos e resultados da PCR para CaHV-1 em amostras de 20 cadelas com desordens reprodutivas, Uberlândia, MG, 2014

ANIMAIS	RAÇA	IDADE	DESORDENS REPRODUTIVAS	RESULTADO DA PCR – CaHV-1		
				Urina	Swab Ocular	Swab Vaginal
1	Poodle	14	Secreção vaginal/ Piometra	+	-	-
2	Mestiço	2	Natimortos	-	+	-
3	Poodle	6	Aborto	-	-	-
4	Mestiço	5	Distocia	-	-	-
5	Mestiço	11	Distocia	-	-	-
6	Lhasa Apso	12	Lesão na mucosa vaginal/ Aborto	-	-	-
7	Mestiço	2	Má formação fetal	-	-	-
8	Mestiço	1	Mortalidade neonatal	-	-	-
9	Mestiço	6	Mortalidade neonatal	-	-	-
10	Poodle	10	Natimortos	-	-	-
11	Mestiço	3	Natimortos	-	-	-
12	Mestiço	7	Natimortos/Piometra	-	-	-
13	Mestiço	5	Piometra	-	-	-
14	Pitbull	9	Piometra	-	-	-
15	Mestiço	11	Piometra	-	-	-
16	Mestiço	3	Piometra	-	-	-
17	Mestiço	8	Piometra	-	-	-
18	Mestiço	8	Secreção vaginal	-	-	-
19	Rotwailer	2	Secreção vaginal	-	-	-
20	Mestiço	13	Secreção vaginal	-	-	-

Nota: +, positivo; -, negativo.

Os animais 1 e 2 apresentaram resultados positivos nas amostras de urina e secreção ocular, respectivamente (Figura 2). Todas as amostras de secreção vaginal foram negativas. No sequenciamento de DNA as amostras positivas (CHV-1 Uberlândia-MG swab ocular e CHV-1 Uberlândia-MG urina) apresentaram similaridade de nucleotídeos com os outros genótipos de CaHV-1 já descritos e depositados em bases públicas de dados (*Genbank*). A árvore filogenética obtida demonstrou 100% de semelhança entre a sequência do DNA viral dos animais neste estudo e outras obtidas no Reino Unido, Austrália e no estado do Paraná, Brasil (Figura 3).

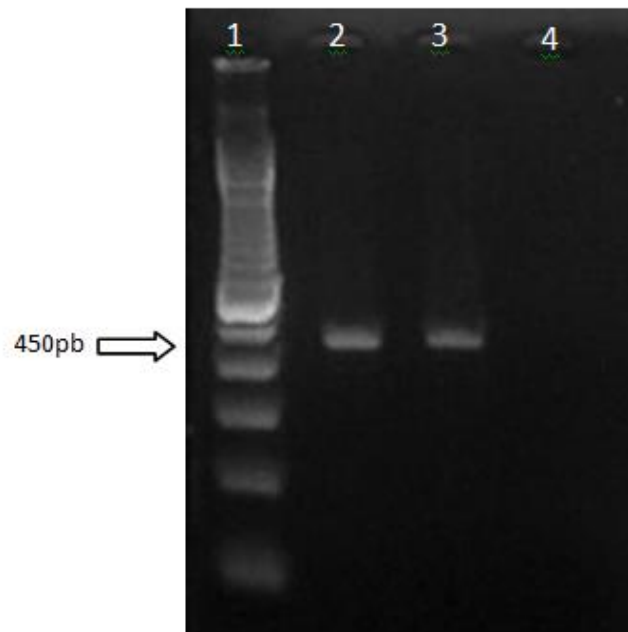


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% de amostras positivas para CaHV-1. 1. Padrão 100pb; 2. Controle positivo; 3. Amostra de urina animal 1; 4. Controle negativo.

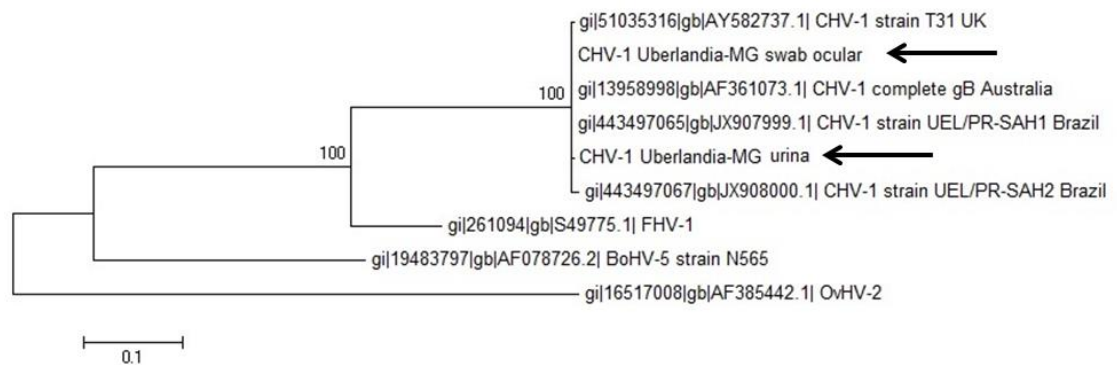


Figura 3. Árvore filogenética baseada em sequências de CaHV-1 depositadas no *GenBank*. As setas indicam as sequências de CaHV-1 determinadas nesta pesquisa.

5. DISCUSSÃO

Na população canina avaliada foi encontrada prevalência de 10% de infecção pelo CaHV-1, através da técnica da PCR realizada nas amostras de urina, secreção ocular e vaginal. Deve-se salientar que a técnica utilizada detecta a presença do vírus no momento de replicação e excreção viral no material avaliado. Além disso, a excreção viral acontece em um curto intervalo de 2 a 6 dias mesmo na primo-infecção (EVERMANN et al., 2011).

A realização da PCR de amostras biológicas em swabs vaginais, oculares e nasais tem sido utilizados para a detecção do CaHV-1 nas excreções de cães suspeitos (KAWAKAMI et al., 2010; MALONE et al., 2010; LEDBETTER et al., 2009b; HOST et al., 2012). No entanto, durante esse estudo, o DNA do CaHV-1 não foi amplificado a partir dos swabs vaginais; resultados semelhantes foram descritos por Ronsse et al. (2005) e Holst et al. (2012).

Os cães positivos na PCR no presente estudo eram adultos e provavelmente portadores de infecções latentes, sendo um animal doente com piometra e outro clinicamente saudável e com histórico de natimortalidade. Cães adultos ou maiores de três semanas de idade, quando infectados pelo CaHV-1, geralmente se tornam portadores assintomáticos (ANVIK, 1991; EVERNANN et al., 2011).

A latência é uma característica típica dos Herpesvírus. Assim, uma vez infectado, o hospedeiro permanece portador do vírus na sua forma latente possibilitando a transmissão viral entre os hospedeiros susceptíveis de forma altamente eficaz. A ausência de replicação viral resulta na ausência de sinais clínicos, caracterizando uma doença subclínica e de difícil detecção. A reativação viral é caracterizada pela retomada da replicação viral, geralmente associada à baixa imunidade e raramente acompanhada de sinais clínicos e lesões no local de replicação (FRANCO et al., 2012).

Latência do vírus foi verificada experimentalmente por Miyoshi et al. (1999) que observaram ausência de sinais clínicos em cães adultos infectados

via intranasal, intravaginal e intravenosa. Esses autores verificaram a presença do DNA viral latente em gânglio trigeminal e lombossacral dos cães independentemente da rota de inoculação viral. Burr et al. (1996) encontraram DNA viral em gânglio lombossacral, tonsilas, glândula salivar e fígado em 9 de 12 cães adultos que foram eutanasiados por vários motivos.

O animal 1 foi diagnosticado com piometra e apresentava excreção do CaHV-1 na urina. A piometra é a uteropatia mais comumente encontrada em cadelas (BIDLE; MACINTIRE, 2002) e ocorre na primeira metade do diestro, onde há aumento da concentração de progesterona endógena (TSUMAGARI et al., 2005) que reduz a resposta imune e favorece uma maior aderência de bactérias ao tecido endometrial (KIDA et al., 2006; ISHIGURO et al., 2007), além de facilitar o aparecimento de infecções oportunistas (CONCANNON, 2011).

Sugere-se que no animal 1 a piometra promoveu imunossupressão que desencadeou reativação do vírus latente. Segundo Greene (2012), em situações que provocam queda de imunidade do animal como estresse, prenhez e doenças concomitantes, o vírus pode ser reativado levando a replicação e excreção viral. Entretanto, a associação entre a piometra e a presença de CaHV-1 não está esclarecida e mais estudos devem ser feitos para entender os efeitos da doença uterina e o vírus.

O animal 2, embora em bom estado geral, estava excretando o vírus na secreção ocular com ausência de doença ocular. Segundo Ledbetter et al. (2012) a excreção ocular subclínica é rara. Deferindo deste estudo, Ledbetter et al. (2009b) verificaram excreção viral via ocular com manifestação de doença ocular em cães adultos com reativação da infecção pelo CaHV-1 latente. No entanto, segundo Greene (2012), a excreção viral ocorre mesmo nas ausências de sinais clínicos. Dessa maneira, ressalta-se a importância de animais assintomáticos na transmissão do CaHV-1 à população canina e manutenção do vírus no ambiente.

Embora clinicamente saudável, o animal 2 tinha histórico de natimortalidade, o que confirma que a infecção pelo CaHV-1 está intimamente

associada a desordens reprodutivas (POSTE; KING, 1971; HASHIMOTO et al., 1983; RONSSE et al., 2005; DAHLBOM et al., 2009).

A infecção pelo CaHV-1, em cães adultos, não deve ser negligenciada, embora os sinais clínicos da doença nestes animais sejam raros. A infecção severa sistêmica em animais adultos tem sido relatada similar à infecção sistêmica neonatal seguida de fatalidade em vários casos (KAWAKAMI et al., 2010; MALONE et al., 2010; GADSEN et al., 2012).

Várias pesquisas recentes utilizaram a sorologia para determinação da prevalência do CaHV-1 (RONSSE et al., 2002; RONSSE et al., 2005; ACAR et al., 2009; DAHLBOM et al., 2009). No entanto, salienta-se que a soropositividade apenas indica exposição viral e não infecção ativa. Além disso, os testes sorológicos para CaHV-1 não são padronizados sendo esperados variações no nível e prevalência dos resultados positivos (FRANCO et al., 2012).

O sequenciamento do produto da PCR neste estudo demonstrou 100% de semelhança com outros obtidos no Reino Unido, Austrália e no estado do Paraná, Brasil. Esta similaridade era esperada na fita de DNA sequenciada, pois o CaHV-1 é considerado um vírus monotípico, sendo o único sorotipo descrito e não há diferenças genotípicas entre os vírus isolados em diversas partes do mundo (APPEL, 1987; REUBEL et al., 2002; FORD, 2006; KAWAKAMI et al., 2010).

A dificuldade e deficiência no diagnóstico da infecção pelo CaHV-1 e a ausência de uma vacina contra o vírus no Brasil contribui para a disseminação viral entre os cães susceptíveis. Diferentemente, em vários países da Europa já existem estudos epidemiológicos com conhecimento da soroprevalência e a utilização de vacina já é realizada em fêmeas prenhas antes da parição (GREENE, 2012).

Este trabalho mostrou que 10% da população canina estudada apresentou infecção ativa do CaHV-1, tornando evidente a circulação do vírus entre os cães na região Sudeste do Brasil. No entanto, pesquisas devem ser realizadas para esclarecer o comportamento epidemiológico do vírus e, dessa

maneira, corroborar para a adoção de medidas profiláticas e diagnósticas mais eficientes.

6. CONCLUSÃO

A detecção do DNA viral nas amostras avaliadas demonstra a presença do CaHV-1 na população canina do município de Uberlândia, Minas Gerais. Trata-se da primeira detecção molecular do agente na região Sudeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ACAR, A.; GUR, S.; DOGAN, I.; AKCA, Y. A serologic investigation of canine herpesvirus type 1 infection in Kangal dogs. **J. Anim. Vet. Adv.**, v.8, p.1377–80, 2009.
- ALBERT, D.M.; LAHAV, M.; CARMICHAEL, L.E.; PERCY, D.H. Canine herpesvirus-induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. **Invest. Ophthalmol.**, v.15, p.267-278, 1976.
- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in brazilian cattle herds, 1998-2002. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.38, p.521-526, 2006.
- ANVIK, J.O. Clinical considerations of canine herpesvirus infection. **Vet. Med.**, 4, p.394–403, 1991.
- APPEL M.G., MENEGUS M., PARSONSON I.M.; CARMICHAEL L.E. Pathogenesis canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5 to 12-week-old pups. **Aust. Vet. J.**, v.30, p.2067-2073, 1969.
- APPEL, M.G. **Canine herpesvirus**. In: APPEL, M.G. Virus infections of carnivores. 1ed. New York: Elsevier, 1987. Cap. 1, p. 5-15.
- ARDANS, A.A. **Herpesviridae**. In: HIRSH, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. Veterinary Microbiology. 2ed. Blackwell, 2004. p.320-332.
- ÁVILA, V.P.F.; ESMERALDINO, A.T.; FALLAVENA, L.C.B.; CÉSARO, C.; RODRIGUES, N.C.; BRAGA, A.C.; CERVA, C. Herpesvirus canino em filhotes da raça Golden Retriever – relato de caso. **Rev. Clin. Vet.**, n.92, p.52-56, 2011.

BIDLE, D., MACINTIRE, D. K. Obstetrical emergencies. Clin. Tech. Small Anim. Pract., v. 15, n. 2, 88-93, 2000. ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Editora Roca, p. 462, 2002.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.495-503, 1990.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Vet. Res.**, v.38, p.355-373, 2007.

BURR, P.D.; CAMPBELL, M.E.M.; NICOLSON, L.; ONIONS, D.E. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.53, p.227–37, 1996.

CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. **Canine herpesvirus**. In: GREENE, C.E., Infectious Diseases of the Dog and Cat. 2ed. W.B. Saunders, Philadelphia: Elsevier, 2006. p.47-53.

CARMICHAEL, L.E. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.156, p.1714–1720, 1970.

CARMICHAEL, L.E.; BARNES, F.D.; PERCY, D.H. Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. **J. Infect. Dis.**, v.120, p.669-678, 1969.

CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A.; KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. **Am. J. Vet. Res.**, v.26, p.803–14, 1965.

CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**. v. 124, n. 3-4, p. 200-210, 2011.

DAHLBOM, M.; JOHNSON, M.; MYLLYS, V.; TAPONEN, J.; ANDERSSON, M. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems, **Reprod. Dom. Anim.**, v.44, p.128–131, 2009.

DECARO, N.F.; AMORISCO, C.; DESARIO, E.; LORUSSO, M.; CAMERO, A. L.; BELLACICCO, R.; SCIARRETTA, M.; LUCENTE, S.; MARTELLA, V.; BUONOVOLIA, C. Development and validation of real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. **J. Virol. Methd.**, v.169, p.176-180, 2010.

DE PALMA, V.E.; AYALA, M.A.; GOBELLO, C.; ECHEVERRIA, M.G.; GALOSI, C.M. An atypical clinical presentation for the first isolation of Canid herpesvirus 1 in Argentina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.62, p.1267–70, 2010.

DHALIWAL, G. K.; WRAY, C., NOAKES, D. E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **Veterinary Record**. v.143, n.24, p.659–661, 1998.

EGENVALL, A.; HAGMANN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P.; LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 15, n. 6, p. 530–538, 2001.

EVERMANN, J.F.; LEDBETTER, E.C.; MAES, R.K. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to Canine Herpesvirus. **Vet. Clin. Sm. Anim.**, v.41, p.1097–1120, 2011.

FEITOSA, F.L.F. **Exame físico geral ou de rotina**. In: FEITOSA, F.L.F. *Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico*. 1ed. São Paulo. Editora Roca, 2008. Cap.4., p.81-82.

FORD, R. B. Canine infectious tracheobronchitis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat, 3ed. St. Louis. Elsevier Inc., 2006. p. 54-61.

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

FOSTER, R.A. **Male reproductive system**. In: McGavin M.D.; Zachary J.F., Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4ed. St Louis. Elsevier, 2007. p.1317-1348.

GADSEN, B.J.; MAES, R.K.; WISE, A.G.; KIUPEL, M.; LAGOHR, I.M. Fatal canid herpesvirus 1 infection in an adult dog. **J. Vet. Diag. Inv.**, v.24, n.4, p.604-607, 2012.

GALOSI, C.M. **Herpesvirus canino 1: Agente etiológico y enfermedad**. Analecta Vet. 2007. v.27, p.5-12.

GREENE, C.E. **Canine herpesvirus infection**. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 4ed. St. Louis: Elsevier, 2012. Cap. 5, p. 48-54.

HASHIMOTO, A.; HIRAI, K.; SUZUKI, Y.; FUJIMOTO, Y. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.610-614, 1983.

HOLST, B.S.; GUSTAVSSOM, M.H.; GRAPPERSON-MATHIS, M.; LILIEHOOK, I.; JOHAMISSON, A.; ISAKSSON, M.; LINDLE, A.; AXNER, E. Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. **Reprod. Dom. Anim.**, v.47, p.362-365, 2012.

ISHIGURO, K.; BABA, E.; TORII, R.; TAMADA, H.; KAWATE, N.; HATOYA, S.; WIJEWARDANA, V.; KUMAGAI, D.; SUGIURA, K.; SAWADA, T.; INABA, T.

Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. **Veterinary Journal**. v. 173, n. 2, p. 325–332, 2007.

KARPAS, A.; GARCIA, F.G.; CALVO, F.; CROSS, R.E. Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.29, p.1251–7, 1968.

KAWAKAMI, K.; OGAWA, H.; MAEDA, K.; IMAI, A.; OHASHI, E.; MATSUNAGA, S.; TOHYA, Y.; OHSHIMA, T.; MOCHIZUKI, M. Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. **J. Clin. Microb.**, v.48, n.4, p.1176–81, 2010.

KIDA, K.; BABA, E.; TORII, R.; KAWATE, N.; HATOYA, S.; WIJEWARDANA, V.; SUGIURA, K.; SAWADA, T.; TAMADA, H.; INABA, T. Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. **Theriogenology**. v.66, n.5, p.1325–1333, 2006.

KRAFT, S.; EVERMANN, J.F.; MCKEIRNAN, A.J.; RIGGS, M. The role of neonatal canine herpesvirus infection in mixed infections in older dogs. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.8, p.688–96, 1986.

LEDBETTER EC, DA SILVA EC, KIM SG, DUBOVI EJ, SCHWARK WS. Frequency of spontaneous canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding in latently infected dogs and canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding induced by topical administration of cyclosporine and systemic administration of corticosteroids. **Am. J. Vet. Res.**, v.73, p.1079–84, 2012.

LEDBETTER, E.C. Canine Herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. **New Zeal. Vet. J.**, p.1-9, 2013.

LEDBETTER, E.C.; KIM, S.G.; DUBOVI, E.J. Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. **Vet. Ophthalm.**, v.12, p.242–7, 2009a.

LEDBETTER, E.C.; KIM, S.G.; DUBOVI, E.J.; BICALHO, R.C. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. **Vet. Microb.**, v.138, p.98–105, 2009b.

LEDBETTER, E.C.; RIIS, R.C.; KERN, T.J.; et al. Corneal ulceration associated with naturally occurring canine herpesvirus-1 infection in two adult dogs. **J. Am. Vet. Med.**, v.229, p.376–384, 2006.

MALONE, E.K.; LEDBETTER, E.C.; RASSNICK, K.M.; KIM, S.G.; RUSSELL, D. Disseminated canine herpesvirus-1 infection in an immunocompromised adult dog. **J. Vet. Int. Med.**, v.24, p.965–68, 2010.

MIYOSHI, M.; ISHII, Y.; TAKIGUCHI, M.; TAKADA, A.; YASUDA, J.; HASHIMOTO, A.; et al. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, p.375–9, 1999.

NEMOTO, K.; HORIMOTO, T.; XUAN, X.; KUSANAGI, K.; TAKUMI, A.; TOHYA, Y.; AZETAKA, M.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. Demonstration of canine herpesvirus-specific haemagglutination. **Jap. J. Vet. Sci.**, v.52, p.395–398, 1990.

OKUDA, Y.; ISHIDA, K.; HASHIMOTO, A.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K.; CARMICHAEL, L.E. Virus reactivation in bitches with medical history of herpesvirus infection. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.551-554, 1993.

OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L.; BEZERRA JÚNIOR P.S.; TEIXEIRA, E.M.; DEZENGRINI, R.; PAVARINI S.P.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Achados

clínicos e patológicos em cães infectados naturalmente por herpesvírus canino. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.8, p.637-642, 2009.

POSTE, G.; KING, N. Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. **Vet. Rec.**, v.88, p.229–33, 1971.

READING, M.J.; FIELD, H.J. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. **Arch. Virol.**, v.143, p.1477–1488, 1998.

REUBEL, G.H.; PEKIN, J.; WEBB-WAGG, K.; HARDY, C.M. Nucleotide sequence of glycoprotein genes B, C, D, G, H and I, the thymidine kinase and protein kinase genes and gene homologue UL24 of an Australian isolate of canine herpesvirus. **Virus Genes**, v.25, p.195–200, 2002.

RIJSEWIJK, F.A.M.; LUITEN, E.J.; DAUS, F.J.; VAN DER HEIJDEN, R.W.; VAN OIRSCHOT, J.T. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in the Netherlands in 1997-1998. **Vet. Microbiol.**, v.65, p.1-7, 1999.

RON SSE, V.; VERSTEGENJ.; THIRY,E.; ONCLIN, K.; AEBERLE', C.; BRUNET, S.; POULET, H. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenol.**, v.64, p.61–74, 2005.

RON SSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; FRÉDÉRIC, F.; POULET H. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). **Theriogenol.**, v.61, p.619-636, 2004.

RON SSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; GUIOT, A.L.; AEBERLÉ, C.; NAUWYNCK, H.J.; POULET, H. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. **Reprod. Domest. Anim.**, v.37, p.299-304, 2002.

THOMPSON, H.; WRIGHT, N.G.; CORNWELL, H.J. Canine herpesvirus respiratory infection. **Res. Vet. Sci.**, v.13, p.123–6, 1972.

TSUMAGARI, S.; ISHINAZAKA, T.; KAMATA, H.; OHBA, S.; TANAKA, S.,
ISHII, M.; MEMON, M. A. Induction of canine pyometra by inoculation of
Escherichia coli into the uterus and its relationship to reproductive features.
Animal Reproduction Science. v. 87, n. 3, p. 301–308, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha clínica e Questionário reprodutivo

1- Identificação do Paciente:

Nome: _____ Raça: _____

Peso: _____ Idade: _____ Sexo: ☐ F ☐ M

Vacinas (V10/V8 /Antirrábia) Vermifugação ☐ Em dia ☐ Atrasado

2- Queixa Principal:

3- Histórico de doenças já ocorridas:

5- Histórico Reprodutivo: FÊMEAS

Nº de acasalamento _____ Último cio _____

Nº ninhadas nascidas _____ ☐ Abortos

Tamanho do canil _____ ☐ Má formação fetal

☐ OSH ☐ Mortalidade neonatal

☐ Distocias

6- Suspeita Clínica: _____

4- Alterações clínicas apresentadas: TR: _____ FC: _____ FR: _____

☐ Anorexia ☐ Lesão genital ☐ Secreção nasal

☐ Fraqueza/ Apatia ☐ Secreção ocular ☐ Crepitação pulmonar

☐ Secreção genital ☐ Conjuntivite ☐ Sensibilidade renal

7- Material Coletado:

☐ Sangue Total ☐ Sangue sem EDTA ☐ Urina (2ml)

☐ Swab ocular ☐ Swab nasal ☐ Swab genital

Densidade urinária _____

APÊNDICE B – Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU)

Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 223/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 140/13**

Projeto Pesquisa: “Levantamento epidemiológico da infecção por Herpesvirus
canino tipo 1 (CHV-1) em cães no município de Uberlândia, Minas Gerais.”.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da
pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 04 de Dezembro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

