



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA DA SILVA

**HERPESVIROSE E ADENOVIROSE CANINA EM
INFECÇÕES SINGULARES OU MISTAS:
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ACHADOS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS**

Londrina
2015

ANA PAULA DA SILVA

**HERPESVIROSE E ADENOVIROSE CANINA EM
INFECÇÕES SINGULARES OU MISTAS:
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ACHADOS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri.

Londrina
2015

B222d SILVA, Ana Paula.

Gerência de redes – protocolo SNMP /Ana Paula Silva – Londrina, 2015.
63 f. : il.

Orientadora: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Gerencia de redes – Teses. 2. SNMP. 3 NMS – Teses. 3. Asunto 3 – Teses. I.
Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Agrárias. III. Herpesvirose e adenovirose canina: diagnóstico molecular e achados
clínico-patológicos associados a sinais clínicos específicos e não-específicos

CDU 641:579

ANA PAULA DA SILVA

**HERPESVIROSE E ADENOVIROSE CANINA EM INFECÇÕES
SINGULARES OU MISTAS:
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ACHADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexande Mendes Amude
Universidade de Cuiabá - UNIC

Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de março de 2015.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Adelir Paulo da Silva, o “rei da gambiarra”, que me ensinou a viver de maneira criativa e minuciosa. A ele que nunca me deu opção de não estudar. A ele que me deu carinho, apoio e amor incondicional em todas as fases e escolhas da minha vida. Ao meu querido pai, o grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos queridos professores Amauri e Alice Alfieri, meus orientadores, mentores e pais científicos, que me receberam de braços abertos e confiaram em minha capacidade, muitas vezes mais do que eu mesma. Obrigada pela cumplicidade, pelos conselhos científicos e pessoais, e por terem me mostrado o meu caminho profissional.

Ao professor Selwyn Arligton Headley, fonte inesgotável de ideias, material biológico e criatividade. O principal incentivo para as “aventuras científicas” deste e de outros trabalhos.

Às “Garotas dos Minúsculos”, as médicas veterinárias Livia Bodnar e Luana de Almeida Freitas, pessoas iluminadas com quem tive a oportunidade de trabalhar durante o mestrado e a residência.

A todos os meus colegas do Laboratório de Virologia Animal, que sempre me ajudaram em minhas pesquisas, dando opiniões, ideias, auxiliando em diversas dúvidas e ajudando na produção de reagentes e formulação de reações. Saibam que a minha pasta roxa estará sempre à disposição!

Aos meus amigos inseparáveis, que seguravam a onda quando as coisas iam mal: Brígida, Victor, Danilo, Edson, Dalton, Dhyego, Juliana, Loana, Carina e Jéssica. Obrigada pelas risadas de doer o rosto, pelas festas malucas para desestressar, pelos filminhos assistidos nos finais de semana, pelas viagens que fizemos juntos, pela paciência nos momentos difíceis. Com absoluta certeza, minha vida em Londrina flui com muito mais leveza com vocês ao meu lado.

E por último mas não menos importante, à minha família. À minha mãe maravilhosa, incrível e linda, Neide, que se mostra cada dia mais forte e preparada para a vida. À minha irmã Milena, um poço de paciência e de sensibilidade, que nos acalma sempre que necessário. Ao meu cunhado Henrique, que faz papel de irmão e de pai desde que o conheci, há mais de uma década. E à princesa Isabela, minha sobrinha, a criança mais inteligente que já conheci. Uma fonte de inspiração sempre que nos falta energia e criatividade para continuar a busca pela ciência.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado; a imaginação abrange o mundo”.

Albert Einstein

SILVA, Ana Paula. **Herpesvirose e adenovirose canina em infecções singulares ou mistas: diagnóstico molecular e achados clínico-patológicos.** 63 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) é um alfa herpesvírus conhecido por causar infecções fatais em filhotes e neonatos, e infecções latentes relacionadas com distúrbios reprodutivos, respiratórias e oculares em cães adultos. As infecções por adenovírus canino tipo 1 (CAAdV-1) são clinicamente conhecidas por causar síndromes hepáticas, além de edema de córnea típico; no entanto, outros quadros podem ser observados, como síndrome hemorrágica e morte abrupta, sendo a enfermidade denominada hepatite infecciosa canina. O adenovírus canino tipo 2 (CAAdV-2) tem sido recuperado consistentemente de cães acometidos com a enfermidade multietiológica designada traqueobronquite infecciosa, causando sinais clínicos respiratórios. As co-infecções de vírus em cães têm sido descritas mundialmente. O vírus da cinomose canina (CDV) e o parvovírus canino (CPV) estão comumente envolvidos em infecções mistas devido a seus efeitos imunossupressores, que facilitam a instalação de outros agentes etiológicos. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de CHV, CAAdV-1 e CAAdV-2, com ou sem a associação dos vírus imunossupressores CDV e CPV por PCR em cães atendidos no setor de Moléstias Infecciosas no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e que vieram a óbito pela gravidade da doença clínica. De janeiro de 2013 a dezembro de 2014, 53 pacientes foram selecionados por terem morrido ou por terem sido eutanasiados devido a grave piora clínica. Estes animais foram necropsiados, e seus órgãos foram avaliados por histopatologia e por PCR para CHV, CAAdV-1, CAAdV-2, CDV e CPV. 28 animais foram positivos na PCR para CHV, CAAdV-1 e/ou CAAdV-2. Os achados de necropsia e histopatologia foram compatíveis às lesões causadas pelos agentes virais avaliados. A presença de CHV, CAAdV-1 e CAAdV-2 foi detectada em 19 (67,9%), 14 (50%) e 6 (21,4%) animais respectivamente, sendo que 19 (67,9%) animais apresentaram co-infecções. Dentre as infecções mistas, 11 (57,9%) foram concomitantes com CDV e 6 (31,6%) com CPV. Possivelmente, a presença dos antígenos juntamente com a baixa imunidade dos animais produziram injúrias que levaram os cães a óbito por falência múltipla de órgãos. O expressivo número de casos positivos para CHV e/ou CAAdV neste estudo mostra a importância dessas viroses para a população canina.

Palavras-chave: herpesvírus canino, adenovírus canino, co-infecções, viroses de cães, diagnóstico inconclusivo

SILVA, Ana Paula. **Canine herpesvirosis and adenovirosis in single and mixed infections: molecular diagnosis and clinicopathological findings**. 2015. 63 pages. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Canid herpesvirus 1 (CHV-1) is an alphaherpesvirus known for causing fatal infections in puppies and neonates, and latent infections related to reproductive, respiratory, and ocular disorders in adult dogs. The infections caused by canine adenovirus type 1 (CAAdV-1) are clinically known for causing hepatic syndromes and typical corneal edema. Other clinical conditions can be found, such as hemorrhagic syndrome and sudden death, and the disease is known as canine infectious hepatitis. Canine adenovirus type 2 (CAAdV-2) has been recovered consistently from dogs that present the multi etiological disease known as canine infectious thacheobronchitis, presenting respiratory signs. Viral co-infections in dogs have been reported worldwide. Canine distemper virus (CDV) and canine parvovirus (CPV) are commonly involved in mixed infections due to their immunosuppressive effects, which make the entrance of other etiological agents easier. The aim of this study was to investigate the presence of CHV, CAAdV-1, and CAAdV-2, with or without the association to the immunosuppressive viruses CDV and CPV by PCR in dogs that were attended at the Infectious Diseases Department of the Veterinary Hospital from Londrina State University (UEL) and that died due to the severity of clinical disease presented. From January 2013 to December 2014, 53 patients were selected because they died or were euthanized for severe clinical worsening. These animals were necropsied, and their organs were analyzed by histopathology and PCR assays specific for CHV, CAAdV-1, CAAdV-2, CDV, and CPV. 28 animals were positive for CHV, CAAdV-1 and/or CAAdV-2 by PCR. The pathological findings were compatible to the injuries normally caused by the viral agents evaluated. The presence of CHV, CAAdV-1, and CAAdV-2 was detected in 19 (67.9%), 14 (50%) e 6 (21.4%) animals respectively; 19 (67.9%) animals presented co-infections. Among the mixed infections, 11 (57.9%) were concomitant to CDV and 6 (21.4%) to CPV. Possibly, the presence of antigens along with the low immunity of the dogs produced injuries that led them to death by multiple organs failure. The expressive number of positive cases to CHV and/or CAAdV in this study shows the importance of these viruses to Brazilian dog population.

Keywords: canid herpesvirus, canine adenovirus, co-infections, viruses of dogs, inconclusive diagnostics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Patogenia das infecções pelo herpesvírus canino	16
Figura 2 – Patogenia das infecções pelo adenovírus canino tipo 1	21
Figura 3 – Patogenia das infecções pelo adenovírus canino tipo 2	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Soroprevalência de herpesvírus canino tipo 1 em estudos realizados globalmente em populações de cães domésticos..... 15

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – CANINE HERPESVIROSIS AND ADENOVIRUS IN SINGLE AND MIXED INFECTIONS: MOLECULAR DIAGNOSIS AND CLINICOPATHOLOGICAL FINDINGS

Table 1 – Primers used for the detection of CHV, CAdV, and CDV in dogs with systemic infections that died from specific and unspecific clinical signs 49

Table 2 – Molecular detection by PCR or RT-PCR of CHV, CAdV-1, and CAdV-2 associated or not with CDV and CPV in 28 cases of dogs that died presenting specific and unspecific clinical signs 49

Table 3 – General information of 18 dogs from two weeks to six months of age that were positive for CHV, CAdV-1, CAdV-2, CDV and/or CPV by PCR and RT-PCR 50

Table 4 – General information of 5 dogs from 10 months to 4 years of age that were positive for CHV, CAdV-1, CAdV-2, CDV and/or CPV by PCR and RT-PCR 51

Table 5 – General information of 5 dogs over 8 years of age that were positive for CHV, CAdV-1, CAdV-2, CDV and/or CPV by PCR and RT-PCR..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> – ferramenta de pesquisa básica para alinhamento local
CAdV	<i>Canine adenovirus</i> – adenovírus canino
CAdV-1	<i>Canine adenovirus type 1</i> – adenovírus canino tipo 1
CAdV-2	<i>Canine adenovirus type 2</i> – adenovírus canino tipo 2
CAdVs	<i>Canine adenoviruses</i> – adenovírus caninos
CCV	<i>Canine coronavirus</i> – coronavírus canino
CDV	<i>Canine distemper virus</i> – vírus da cinomose canina
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CHV	<i>Canine herpesvirus</i> – herpesvírus canino
CHV-1	<i>Canine herpesvirus type 1</i> – herpesvírus canino tipo 1
CPV	<i>Canine parvovirus</i> – parvovírus canino
CPIV	<i>Canine parainfluenza virus</i> – vírus da parainfluenza canina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia pela polimerase
PIB	Produto interno bruto
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> – transcrição reversa seguida por reação em cadeia pela polimerase
SLAM	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i> – molécula sinalizadora da ativação de linfócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	HERPESVÍRUS CANINO (CHV)	14
2.1.1	Etiologia	14
2.1.2	Epidemiologia.....	15
2.1.3	Patogenia e Sinais Clínicos	16
2.1.4	Diagnóstico.....	17
2.1.5	Anatomia Patológica	18
2.1.6	Prevenção.....	19
2.2	ADENOVÍRUS CANINO (CADV).....	19
2.2.1	Etiologia	19
2.2.2	Epidemiologia.....	20
2.2.3	Patogenia e Sinais Clínicos	20
2.2.4	Diagnóstico.....	22
2.2.5	Anatomia Patológica	23
2.2.6	Prevenção.....	24
2.3	INFECÇÕES VIRAIS CONCOMITANTES	25
3	REFERÊNCIAS	27
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – CANINE HERPESVIROSIS AND ADENOVIROSI S IN SINGLE AND MIXED INFECTIONS: MOLECULAR DIAGNOSIS AND CLINICOPATHOLOGICAL FINDINGS.....	34
5.1	INTRODUCTION	35
5.2	MATERIAL AND METHODS	39

5.3	RESULTS	40
5.4	DISCUSSION	41
5.5	REFERENCES	44
6	CONCLUSÃO	52
	APÊNDICES	53
	APÊNDICE A – Lista de reagentes	54
	APÊNDICE B – Soluções e tampões	56
	APÊNDICE C – Protocolos e técnicas	58
	APÊNDICE D – Lista de <i>softwares</i>	63

1 INTRODUÇÃO

1 Os animais de companhia, especialmente cães e gatos, possuem intenso
2 convívio com o ser humano, influenciando no desenvolvimento físico, social e emocional de
3 seus proprietários. A utilização dos *pets* no auxílio à recuperação de pacientes humanos que
4 apresentam doenças clínicas está se tornando cada vez mais comum. O convívio de crianças e
5 idosos hospitalizados com animais demonstra evolução significativa em seus quadros clínicos,
6 auxiliando a recuperação dos pacientes e diminuindo o período de estadia no hospital
7 (KAMINSKI et al, 2002; COLOMBO et al, 2006). Crianças com autismo ou hiperatividade e
8 pacientes que sofrem de depressão têm maior facilidade de convívio social quando em contato
9 com cães e gatos, adquirindo melhor qualidade de vida quando associa-se a terapia com
10 animais aos tratamentos medicamentosos (FOLSE et al, 1994; GRANDGEORGE et al, 2012).

11 Quantitativamente, os gatos se tornaram mais populares que os cães ao
12 longo dos anos: em 2013, haviam 204 milhões de gatos e 173 milhões de cães no mundo. No
13 Brasil, o cão ainda é o animal de companhia preferido: no mesmo ano, a população de cães e
14 gatos chegou a 37,1 milhões e 21,3 milhões respectivamente, colocando o Brasil em segundo
15 lugar no ranking mundial de população de pequenos animais. Em 2013, o setor *pet* faturou R\$
16 15,2 bilhões no Brasil, representando 0,13% do PIB nacional e o segundo maior mercado *pet*
17 do mundo, atrás somente dos Estados Unidos (ABINPET, 2014).

18 A expectativa de vida dos cães no Brasil é mais baixa quando comparada a
19 de países como Dinamarca, Estados Unidos, Inglaterra e Japão; nestes países, a expectativa de
20 vida possivelmente é maior devido aos baixos índices de doenças infecto-contagiosas. No
21 Brasil, alguns estudos demonstraram expectativa de vida de apenas 36 meses para cães
22 (BENTUBO et al, 2007), enquanto que nestes países desenvolvidos a expectativa de vida é
23 de, no mínimo, 99 meses (BRONSON, 1982; HAYASHIDANI, 1988; MICHELL, 1999;
24 PROSCHOWSKY et al, 2003). As doenças infecciosas são a principal causa de mortalidade
25 em animais de companhia jovens no Brasil. A alta incidência de óbitos por agentes
26 infecciosos pode estar relacionada à baixa adesão a programas de vacinação por aspectos
27 sócioeconômicos e por negligência dos proprietários, e pela grande quantidade de cães
28 errantes no Brasil (FIGHERA et al, 2008). Os cães errantes estão intimamente relacionados às
29 infecções transmissíveis e infecciosas por terem maior contato com outros animais,
30 adquirindo e transmitindo doenças infecciosas. Estes cães muitas vezes não são vacinados e,
31 desta forma, são mais vulneráveis às infecções quando comparados aos animais de raça pura,

1 que geralmente são adequadamente vacinados pelos seus proprietários (HEADLEY et al,
2 2012).

3 Dentre as doenças infecciosas, as de etiologia viral são as mais importantes
4 e com maior taxa de mortalidade. Grande parte dos óbitos está relacionada a infecções pelo
5 parvovírus canino (CPV) e pelo vírus da cinomose (CDV), acompanhados ou não de outros
6 agentes virais (TRAPP et al, 2010). O CPV e o CDV comumente estão associados a infecções
7 mistas por causarem efeitos imunossupressores nos hospedeiros infectados. Entretanto, outros
8 agentes infecciosos virais podem estar envolvidos nas co-infecções, como o herpesvírus
9 canino (CHV), os adenovírus caninos tipos 1 e 2 (CAdV-1 e CAdV-2), o coronavírus canino
10 (CCV) e o vírus da parainfluenza canina (CPIV), agravando os sinais clínicos e podendo levar
11 o paciente a óbito pela associação das lesões causadas e pelo agravamento do quadro clínico
12 (DAMIÁN et al, 2005; HEADLEY et al, 2009; TRAPP et al, 2010; HEADLEY et al, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HERPESVÍRUS CANINO (CHV)

2.1.1 Etiologia

1 O herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) é um varicelovírus incluído na família
2 *Herpesviridae*, subfamília *Herpesvirinae*, com hospedeiros restritos aos canídeos domésticos
3 e selvagens. O CHV-1 foi descrito pela primeira vez em 1965 (CARMICHAEL et al, 1965) e,
4 até hoje, apenas um sorotipo foi identificado por comparação antigênica, já que a variação
5 entre isolados de campo é muito pequena (GREENE, 2012a). A estrutura genômica do CHV
6 possui relação genética com outros alfa-herpesvírus, que são citolíticos e causam necrose
7 tecidual e infecção localizada em mucosas ou generalizada em animais imunocomprometidos.
8 A recuperação é associada a uma infecção latente nos gânglios nervosos das mucosas
9 oronasais e genitais, que persiste para o resto da vida do hospedeiro e que pode voltar a causar
10 sinais clínicos em situações de estresse e imunossupressão (FRANCO et al, 2012).

11 Por ser um vírus envelopado, o CHV-1 é rapidamente inativado quando
12 exposto a desinfetantes comuns, solventes lipídicos e temperaturas superiores a 40°C
13 (GREENE, 2012a). Apesar de não ser resistente no ambiente, o vírus permanece na população
14 devido às infecções latentes; cães latentemente infectados representam importante fonte de
15 infecção para os animais susceptíveis. Esta situação é especialmente importante para cães
16 reprodutores, em que as matrizes podem transmitir o vírus para a ninhada através das vias
17 oral, nasal e genital, e para animais que vivem em locais de aglomeração, como abrigos e
18 canis (DECARO et al, 2008).

19 Diferente de outros vírus, a temperatura ideal de replicação do CHV é
20 inferior a 37°C, variando de 34 a 36°C (LUST, CARMICHAEL, 1971). Desta forma, os
21 animais de até quatro semanas de vida apresentam quadros clínicos mais graves, já que
22 possuem dificuldade de manutenção da temperatura corporal e por apresentarem resposta
23 imunológica imatura, facilitando a replicação e a disseminação sistêmica do vírus (GREENE,
24 2012a).

2.1.2 Epidemiologia

1 O CHV é restrito a cães domésticos e canídeos selvagens e acredita-se que
 2 está distribuído mundialmente (LEDBETTER, 2013). Investigações sorológicas realizadas em
 3 diferentes países evidenciam prevalência relativamente elevada de anticorpos contra CHV,
 4 especialmente em locais de aglomeração de animais, como abrigos e canis de cães
 5 reprodutores (Tabela 1).

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

País	Soroprevalência (%)	Animais avaliados	Referência
África do Sul	22	Cães não-vacinados de canis reprodutores sem sinais clínicos reprodutivos	Nöthling et al. (2008)
Argentina	23	Cães não-vacinados e apresentando sinais clínicos reprodutivos	De Palma et al. (2010)
Bélgica	46	Cães não-vacinados sem sinais clínicos e escolhidos aleatoriamente	Ronsse et al. (2002)
Coréia do Sul	37	Cães não-vacinados sem sinais clínicos e escolhidos aleatoriamente	Seo et al. (1994)
Eslováquia	36	Cães não-vacinados e apresentando sinais clínicos reprodutivos	Mojzisova et al. (2011)
Finlândia	82	Cães não-vacinados de canis reprodutores apresentando ou não sinais clínicos reprodutivos	Dahlbom et al. (2009)
Holanda	42	Cães não-vacinados de canis reprodutores sem sinais clínicos	Rijsewijk et al. (1999)
Irã	21	Cães não-vacinados sem sinais clínicos reprodutivos e escolhidos aleatoriamente	Babaei et al. (2010)
Japão	26	Cães não-vacinados em ambiente hospitalar	Kawakami et al. (2010)
Lituânia	15 a 85	Cães não-vacinados de canis reprodutores e ambiente hospitalar sem sinais clínicos reprodutivos	Musayeva et al. (2013)
Noruega	80	Cães não-vacinados de ambiente hospitalar sem sinais clínicos reprodutivos	Krogenaes et al. (2012)
Reino Unido	93 a 94	Cães não-vacinados de canis reprodutores sem sinais clínicos reprodutivos	Reading e Field (1999)
Suécia	100	Fêmeas prenhes não-vacinados sem sinais clínicos reprodutivos	Ström Holst et al. (2012)
Turquia	39 a 72	Cães não-vacinados de canis reprodutores sem sinais clínicos reprodutivos	Acar et al. (2009)

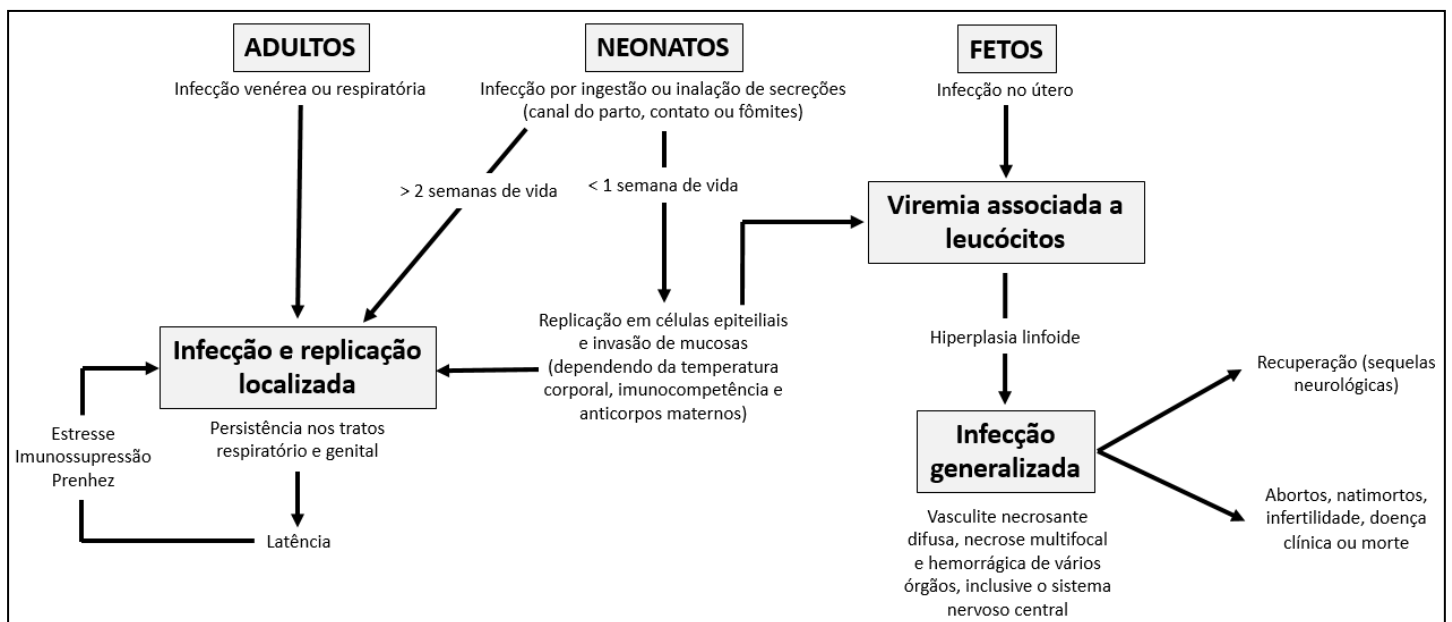
Adaptado de Ledbetter (2013)

1 No Brasil, a presença do CHV foi relatada em alguns estudos nos estados do Rio
 2 Grande do Sul (OLIVEIRA et al, 2009; ÁVILA et al, 2011), São Paulo (KURISSIO, 2013),
 3 Minas Gerais (SANTOS, 2014) e Paraná (HEADLEY et al, 2015). O baixo número de
 4 pesquisas pode negligenciar a circulação e a importância do CHV na população de cães do
 5 Brasil.

6 A dificuldade de diagnóstico e a ausência de vacinas no mercado brasileiro
 7 para proteger os cães contra a infecção por CHV dificulta o controle e a prevenção da doença
 8 e facilita a disseminação do vírus entre os indivíduos susceptíveis.

2.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos

9 O CHV é transmitido ao hospedeiro pelas vias venérea, oronasal ou
 10 transplacentária. A idade dos animais no momento da infecção é crítica para o aparecimento
 11 dos sinais clínicos, assim como seu *status* imunológico, determinando a gravidade da doença
 12 (Figura 1).



Adaptado de Greene (2012a)

Figura 1. Patogenia das infecções pelo herpesvírus canino

13 As infecções neonatais são geralmente adquiridas durante o parto ou logo
 14 após o nascimento; entretanto, as infecções transplacentárias podem acontecer (GREENE,
 15 2012a). Infertilidade, abortamentos e nascimento de filhotes fracos cujas mães não
 16 apresentam sinais clínicos são achados comuns. Os filhotes podem ser infectados pelo vírus e
 17 não apresentar sinais clínicos. Entretanto, a maioria dos filhotes, especialmente aqueles sem

1 imunidade materna, desenvolvem infecções sistêmicas por CHV dentro de uma a duas
2 semanas após o parto, apresentando doença generalizada fatal, hemorrágica e necrosante. Os
3 sinais clínicos incluem vocalização, anorexia, dispneia, dor abdominal, incoordenação,
4 secreção nasal serosa ou hemorrágica, petéquias nas mucosas, fezes amolecidas e baixa
5 temperatura retal. Morte por quadro clínico agudo pode acontecer em ninhadas de até uma
6 semana de idade, e os índices de mortalidade podem chegar a 100% (CARMICHAEL, 1970;
7 DECARO et al, 2008).

8 Em animais com mais de um mês de vida, os sinais clínicos costumam ser
9 brandos ou inaparentes e localizados nos tratos respiratório e/ou genital. Os sinais clínicos
10 respiratórios incluem rinite, faringite e traqueobronquite, dependendo do *status* imunológico
11 do paciente (GREENE, 2012a).

12 As infecções genitais são visíveis e se manifestam como lesões vesiculares,
13 hiperemia vaginal ou prepucial e ocasionalmente petéquias na mucosa genital, tanto na primo-
14 infecção como nas infecções recorrentes. Nas fêmeas adultas, a infecção pelo CHV é mais
15 importante devido ao risco de transmissão aos filhotes do que pela transmissão venérea para o
16 macho ou por risco a sua saúde. Nas fêmeas prenhas, não se nota desconforto ou secreção
17 vaginal, mesmo quando há abortamento (CARMICHAEL, 1970).

18 O desenvolvimento de úlcera de córnea pela primo-infecção por CHV
19 acontece quando a superfície do olho é a porta de entrada no vírus. As infecções primárias
20 tipicamente se apresentam bilaterais, enquanto que as recorrentes podem ser uni ou bilaterais.
21 A gravidade e os tipos de lesão podem não ser simétricas quando o quadro clínico aparece nos
22 dois olhos do paciente. Quando o paciente é imunocompetente, as lesões normalmente são
23 brandas e auto-limitantes; em animais com baixa imunidade pode-se encontrar
24 blefaroespasmos, fotofobia, prurido, secreção ocular, conjuntivite e úlceras de córnea
25 (LEDBETTER et al, 2006).

2.1.4 Diagnóstico

26 O isolamento viral pode ser realizado a partir de amostras de órgãos de
27 filhotes que morreram de quadros agudos da doença. Os órgãos com maior quantidade de
28 vírus são adrenais, rins, pulmão, baço, linfonodos e fígado. Em adultos, amostras de *swabs*
29 das mucosas oral, nasal e genital podem ser utilizados como amostras biológicas. O CHV
30 cresce em culturas de células de origem canina, e sua temperatura ideal de crescimento é de
31 34 a 36°C (GREENE, 2012a).

1 Uma das formas de detecção do DNA do genoma viral é pela técnica de
2 PCR, a forma mais confiável de diagnóstico direto, especialmente para a detecção de
3 infecções latentes (BURR et al, 1996).

4 Testes sorológicos como soroneutralização, ELISA e inibição da
5 hemaglutinação já foram desenvolvidos. Entretanto, a soropositividade do paciente indica
6 apenas a exposição ao vírus, sem que ele esteja necessariamente causando uma infecção ativa
7 (GREENE, 2012a).

2.1.5 Anatomia Patológica

8 As lesões macroscópicas encontradas em animais jovens infectados
9 consistem predominantemente de necrose focal e hemorragia que podem ser encontradas em
10 todos os órgãos. As lesões de rim aparecem como áreas vermelhas circunscritas de
11 hemorragia subcapsular sobre área necrótica pálida. Os pulmões encontram-se edematosos e
12 com focos necróticos e hemorrágicos nos lobos. É possível encontrar fluido espumoso e
13 hemorrágico nos brônquios e traqueia. Hemorragia e necrose focal pode ser vista em timo,
14 coração, fígado, intestino, bexiga e adrenais. O baço usualmente encontra-se aumentado e
15 linfadenite é um achado comum. Há presença de fluido serosanguinolento nas cavidades
16 abdominal e torácica. Em animais adultos, as infecções pelo CHV podem ocasionar lesões no
17 trato respiratório, mas a presença de infecções mistas podem apresentar papel importante no
18 aparecimento destas injúrias (APPEL, 1987a, GREENE, 2012a).

19 Na histopatologia, lesões necrosantes estão presentes na maior parte dos
20 órgãos, incluindo rins, fígado, pulmão, intestino, cérebro, timo, baço e, em menor extensão,
21 estômago, pâncreas, omento, retina e miocárdio. As lesões mais graves encontram-se nos rins,
22 com destruição dos túbulos renais e alterações degenerativas. No parênquima hepático, há
23 áreas de necrose focal e hemorragia com perda estrutural. Nos pulmões, há presença de
24 pneumonia necrosante com lesões alveolares seguida de exsudação fibrinosa massiva nos
25 espaços alveolares. No intestino, áreas de necrose focal são limitadas às criptas, que podem
26 levar a hemorragia. No sistema nervoso central, as meninges encontram-se congestionadas e com
27 infiltrados de linfócitos e macrófagos, e o cerebelo apresenta necrose cortical focal e
28 ocasionalmente hemorragia. Nos órgãos linfáticos, há cariorrexia e depleção de linfócitos
29 associada a hemorragia profusa. Na maior parte dos casos, as lesões necróticas não são
30 acompanhadas por invasão de células inflamatórias. A presença de corpúsculos de inclusão
31 basofílicos pode ser encontrada em células parenquimatosas em áreas necróticas de rim,

1 fígado e pulmão, entretanto são difíceis de ser encontradas (APPEL, 1987a, DECARO et al,
2 2008).

2.1.6 Prevenção

3 Como o CHV infecta fetos e neonatos, a imunização ativa deve ser realizada
4 na mãe, já que a imunidade passiva aos filhotes reduz a mortalidade dos cães expostos ou
5 afetados pelo vírus. A vacinação de fêmeas adultas não interfere no seu desempenho
6 reprodutivo e causa a soroconversão, produzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes que
7 são passados aos filhotes durante a gestação e amamentação (POULET et al, 2001).

8 Na Europa, é disponibilizada uma vacina comercial de subunidade, que deve
9 ser administrada nas fêmeas durante o cio ou nas fases iniciais da gestação com reforço na
10 sexta semana (FRANCO et al, 2012). No Brasil, não há vacina comercial disponível contra o
11 CHV, dificultando o controle e a profilaxia da doença.

2.2 ADENOVÍRUS CANINO (CAdV)

2.2.1 Etiologia

12 Os adenovírus caninos (CAdVs) são membros do gênero *Mastadenovirus*,
13 família *Adenoviridae*. Estes vírus são divididos em dois tipos distintos, o tipo 1 (CAdV-1) e o
14 tipo 2 (CAdV-2), que são intimamente relacionados antigenicamente e geneticamente
15 (DAVISON et al, 2003).

16 O CAdV-1 se replica nas células do endotélio vascular e nos hepatócitos,
17 causando a enfermidade denominada hepatite infecciosa canina por produzir lesões necro-
18 hemorrágicas agudas, especialmente em animais jovens. A infecção pelo CAdV-2 é
19 caracterizada por sinais clínicos respiratórios de baixa gravidade, e está associado a uma
20 doença multicausal denominada traqueobronquite infecciosa canina ou tosse dos canis,
21 juntamente com outros agentes etiológicos como *Bordetella bronchiseptica*, CPIV, reovírus
22 canino, *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma spp* (MORAES, COSTA, 2012a).

23 O primeiro relato de hepatite infecciosa canina foi em 1930, mas somente
24 uma década depois o CAdV-1 foi isolado e atenuado por passagens em células caninas para a
25 produção de vacinas (CABASSO et al, 1958). O CAdV-2 foi isolado em 1961 a partir de

1 amostras de cães que apresentavam laringotraqueíte. Inicialmente, ele foi considerado uma
2 estirpe atenuada de CAdV-1; mais tarde, foi renomeado CAdV-2 (MARUSYK, 1972).

3 Por possuírem genoma de DNA fita dupla e por não apresentarem envelope
4 lipídico, os adenovírus são resistentes a condições ambientais e a solventes orgânicos, porém
5 podem ser inativados pelo calor e por desinfetantes comuns (MORAES, COSTA, 2012a).

2.2.2 Epidemiologia

6 Cães, raposas e coiotes são altamente susceptíveis aos CAdVs, mas
7 infecções em outros mamíferos já foram relatadas (GREENE, 2012b). A infecção pelo
8 CAdV-1 já foi descrita em diversos países, e por isso acredita-se que possui distribuição
9 mundial. A utilização massiva de vacinas e as infecções naturais por CAdV têm reduzido a
10 ocorrência de casos em várias partes do mundo (DECARO et al, 2007).

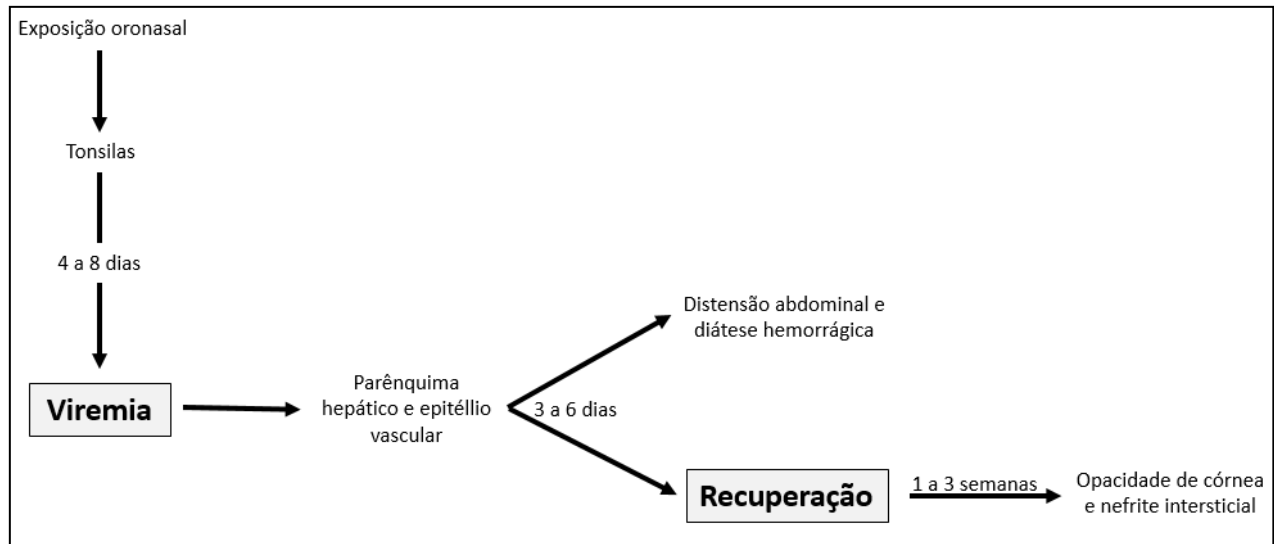
11 Existem poucos relatos de diagnóstico das infecções por CAdV no Brasil
12 (DEZENGRINI et al, 2007; INKELMANN et al, 2007; GABRIEL et al, 2008; OLIVEIRA et
13 al, 2011; HEADLEY et al, 2013; SILVA et al, 2014). O número reduzido de estudos é devido
14 à dificuldade de diagnóstico clínico e à ausência de diagnóstico confirmatório das doenças
15 causadas pelos dois vírus.

2.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

16 Os animais jovens de até 6 meses de idade são os principais acometidos
17 pelas infecções por CAdV. Após a exposição oronasal, o vírus se localiza nas tonsilas e se
18 propaga aos linfonodos regionais produzindo viremia, que dura de 4 a 8 dias após a infecção.
19 A viremia resulta em rápida disseminação do vírus para outros tecidos e secreções corporais,
20 incluindo saliva, urina e fezes.

21 O principal alvo do CAdV-1 são as células do parênquima hepático e do
22 endotélio vascular de diversos tecidos (GREENE, 2012b). O primeiro sinal clínico da hepatite
23 infecciosa canina é a febre superior a 40°C. Após o primeiro pico febril, alguns cães podem se
24 recuperar da infecção. O segundo pico de hipertermia geralmente está associado com quadros
25 mais graves da doença, acompanhado de depressão, perda do apetite, taquicardia, taquipneia,
26 vômitos e diarreia. Dor e distensão abdominal resultam do acúmulo de fluido
27 serosanguinolento e aumento do tamanho do fígado. Diátese hemorrágica é frequente, e é
28 vista como epistaxe e congestão e hemorragia de mucosas e pele. Quadros clínicos

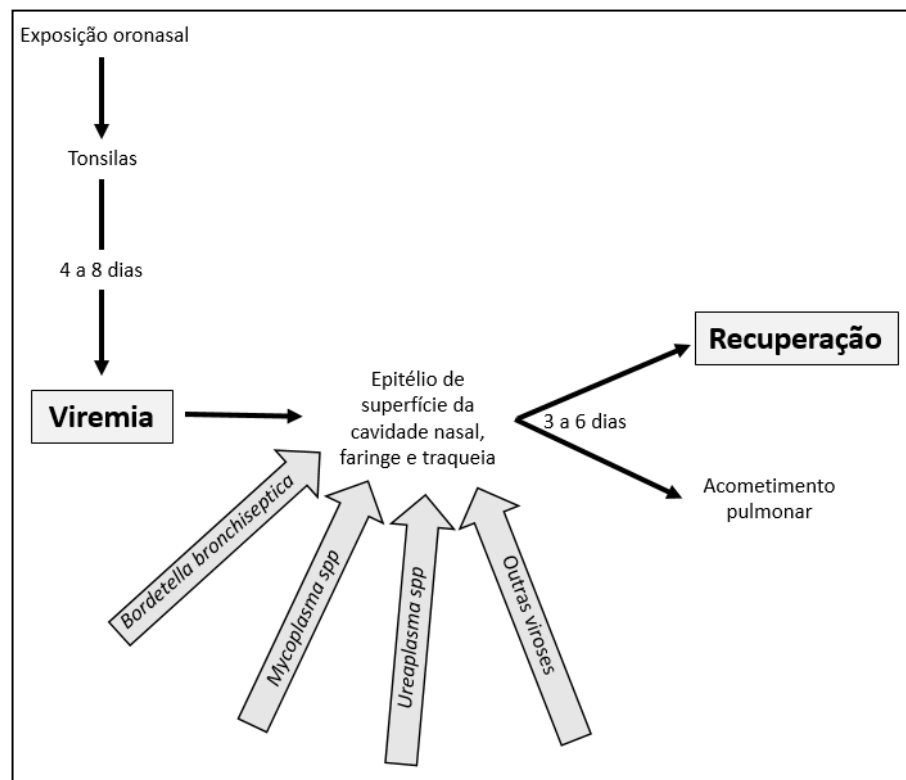
1 respiratório e nervoso podem acontecer em casos graves devido às lesões vasculares
 2 (DECARO et al, 2008). Opacidade de córnea e nefrite intersticial crônica podem acontecer
 3 uma a três semanas após a recuperação, devido a deposição de imunocomplexos (WRIGHT,
 4 1976; MORAES, COSTA, 2012a) (Figura 2).



Elaborado pelo autor

Figura 2. Patogênese das infecções pelo adenovírus canino tipo 1

5 Nas infecções por CA_{AdV}-2, o epitélio de superfície da cavidade nasal,
 6 faringe e traqueia são os principais acometidos. Em geral, as infecções são auto-limitantes e
 7 em 3 a 6 dias pós-infecção a replicação viral diminui acentuadamente graças ao aumento de
 8 anticorpos locais. Em casos mais graves, o pulmão pode ser acometido (FORD, 2012). A
 9 traqueobronquite infecciosa canina é muito comum em populações de cães que vivem em
 10 abrigos e canis. A gravidade das lesões da traqueobronquite infecciosa canina está relacionada
 11 com a infecção do CA_{AdV}-2 em associação com outros vírus e bactérias. Desta forma, é difícil
 12 definir as manifestações clínicas da doença, já que há sinergismo entre agentes etiológicos. Na
 13 maioria das vezes, observa-se tosse seca. Nas formas complicadas, mais comuns em cães
 14 imunocomprometidos, há tosse que pode evoluir para broncopneumonia e, em casos mais
 15 graves, morte (DECARO et al, 2008). (Figura 3).



Elaborado pelo autor

Figura 3. Patogênese das infecções pelo adenovírus canino tipo 2

2.2.4 Diagnóstico

1 Os sinais clínicos podem ser bastante agudos nos casos de hepatite
 2 infecciosa canina. Os sinais clínicos respiratórios relacionados à tosse dos canis geralmente
 3 aparecem após contato com outros animais. Desta forma, a anamnese e o histórico do paciente
 4 auxilia no diagnóstico clínico das infecções pelo CAAdV-1 e CAAdV-2 (FORD, 2012).

5 O isolamento viral em células permissivas pode ser realizado a partir de
 6 fragmentos de órgãos e secreções dos animais suspeitos de adenovirose. Entretanto, o fígado
 7 possui elevada quantidade de arginase, que inibe o crescimento viral em culturas celulares
 8 (CARMICHAEL, 1972). Como não é indicado para tentativa de isolamento viral, o fígado é o
 9 órgão mais importante para avaliação de lesões e pesquisa de corpúsculos de inclusão na
 10 histopatologia. A imunofluorescência é capaz de detectar a partícula viral mas, assim como o
 11 isolamento viral e a histopatologia, não é capaz de diferenciar os dois tipos de vírus
 12 (DECARO et al, 2008). A PCR é uma importante alternativa para diagnóstico, já que
 13 consegue diferenciar o CAAdV-1 do CAAdV-2 em uma mesma reação (HU et al, 2001).

2.2.5 Anatomia Patológica

1 Petéquias e equimoses cutâneas são comuns em cães com hepatite
2 infecciosa canina, assim como icterícia e edema de subcutâneo. Coagulação sanguínea no
3 coração e em vasos sanguíneos é comum devido à hipercoagulabilidade causada pela infecção
4 por CAdV-1. Ascite e exsudato sanguinolento estão presentes na cavidade abdominal. O
5 fígado encontra-se icterico ou avermelhado e congesto, apresentando padrão lobular por
6 necrose centro-lobular das células parenquimatosas. A vesícula biliar espessada e edemaciada
7 é típica dos cães que apresentam hepatite infecciosa. O aumento do baço pode ser visualizado
8 com a presença excessiva de sangue. Os órgãos linfoides em geral apresentam edema e
9 congestão, usualmente com a presença de hemorragia. O sistema gastrointestinal apresenta
10 petéquias em mucosas que variam de acordo com a gravidade da infecção. Os rins tornam-se
11 congestos e há lesões focais de necrose isquêmica e microtrombos no córtex renal. Há uveíte
12 anterior e edema de córnea devido à deposição de complexos formados pela interação entre
13 antígenos e anticorpos, e estas lesões são mais frequentemente encontradas em cães que se
14 recuperaram da doença. Broncopneumonia catarral associada a congestão e edema são
15 descritas em pulmões. No sistema nervoso central, pode-se encontrar encefalite não-
16 supurativa com hemorragia e congestão nas meninges (APPEL, 1987b; MORAES, COSTA,
17 2012a).

18 Como o CAdV-1 possui afinidade por células hepáticas e reticulo-
19 endoteliais, os estudos histopatológicos podem apresentar corpúsculos de inclusão em
20 hepatócitos, células de Kupffer, células endoteliais dos glomérulos renais e no endotélio
21 vascular em diversos órgãos. Nas células infectadas, há aumento de volume nuclear com
22 marginalização da cromatina. As lesões hepáticas são as principais nos casos de hepatite
23 infecciosa canina, visualizada por necrose centrolobular com dilatação do sinusóide. Nefrose
24 é comum e focos de necrose podem ser encontrados em vários órgãos. Reações inflamatórias
25 com infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares podem ser visualizadas
26 principalmente no fígado e rim, especialmente próximo a locais de necrose. Nefrite intersticial
27 e uveíte são lesões encontradas com frequência em animais que se recuperaram de hepatite
28 infecciosa (APPEL, 1987b; DECARO et al, 2008).

29 As lesões macroscópicas encontradas em animais infectados pelo CAdV-2
30 geralmente são restritas ao sistema respiratório e aos órgãos linfoides. Áreas consolidadas e
31 avermelhadas podem ser vistas nos lobos pulmonares frontais. As tonsilas tornam-se
32 aumentadas e a mucosa nasal torna-se eritematosa (APPEL, 1987c; FORD, 2012).

1 Os achados histopatológicos encontrados nas infecções por CAdV-2
2 envolvem rinite, tonsilite, traqueíte, bronquite e pneumonia intersticial com proliferação de
3 epitélio bronquiolar. Corpúsculos de inclusão são frequentemente encontrados no epitélio
4 pulmonar degenerado. Nos casos crônicos, há estenose dos bronquíolos por fibroblastos,
5 colágeno, linfócitos e macrófagos (APPEL, 1987c; DECARO et al, 2008).

2.2.6 Prevenção

6 Como o CAdV-2 produz imunidade cruzada contra infecções por CAdV-1,
7 a vacinação anual com vacinas polivalentes que possuem CAdV-2 é suficiente para produzir
8 imunidade por mais de 3 anos contra os dois vírus (GILL et al, 2004). Por ser estruturalmente
9 menor, mais patogênico e devido ao risco de sequelas pós-infecção como uveíte e nefrite, o
10 CAdV-1 não é utilizado nas vacinas comercialmente disponíveis (FORD, 2012).

11 As falhas vacinais são raras em vacinas de CAdV, já que os vírus são
12 geneticamente estáveis. Desta forma, a infecção de cães vacinados é mais facilmente
13 explicada pela interferência dos anticorpos maternos no momento da vacinação do que pela
14 emergência de novas estirpes que se diferenciam dos protótipos vacinais (DECARO et al,
15 2007).

16 As vacinas específicas para a traqueobronquite infecciosa canina protegem
17 contra *Bordetella bronchiseptica* e geralmente são intranasais para estimular a imunidade
18 celular local. Elas não são capazes de proteger o animal com muita eficiência, já que a doença
19 possui uma variedade muito grande de agentes etiológicos. Assim, as vacinas intranasais não
20 conseguem evitar o surgimento de surtos em locais de aglomeração de animais, mas sim de
21 diminuir sua gravidade (FORD, 2012).

22 A vacinação massiva dos cães reduziu drasticamente a incidência das
23 infecções por CAdV em diversos países. Entretanto, o grande número de cães não-vacinados
24 no Brasil favorece o surgimento das adenovirose (HEADLEY et al, 2013) e também de
25 outras viroses como cinomose, parvovirose, coronavirose, entre outras. A re-emergência das
26 infecções por CAdVs em alguns países desenvolvidos é resultado do comércio paralelo
27 internacional de filhotes com status sanitário incerto e não-vacinados (DECARO et al, 2007).

2.3 INFECÇÕES VIRAIS CONCOMITANTES

1 As co-infecções de vírus em cães têm sido descritas mundialmente. O vírus
2 da cinomose canina (CDV) e o parvovírus (CPV) comumente estão envolvidos nestas
3 infecções concomitantes devido a seus efeitos imunossupressores (DAMIÁN et al, 2005;
4 CHVALA et al, 2007; GABRIEL et al, 2008; HEADLEY et al, 2009; HEADLEY et al, 2013,
5 SILVA et al, 2014).

6 O CDV pertence ao gênero *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae* e
7 causa manifestações sistêmicas, respiratórias e neurológicas em uma ampla gama de
8 hospedeiros mamíferos. Embora a ocorrência da doença seja reduzida em cães domésticos de
9 países desenvolvidos devido a massiva vacinação (GREENE, VANDEVELDE, 2012), a
10 cinomose canina é endêmica no Brasil, sendo considerada a maior causa de mortalidade para
11 cães de todas as idades (HEADLEY et al, 2012).

12 A capacidade imunossupressora do CDV é um dos fatores que influenciam
13 na gravidade dos sinais clínicos do paciente. As células do sistema imunológico possuem em
14 sua superfície uma membrana glicoproteica que serve como receptor para morbilivírus
15 denominada SLAM (molécula sinalizadora de ativação de linfócitos). As cepas virulentas de
16 CDV se ligam aos receptores SLAM das células imunológicas através das proteínas F (fusão)
17 e H (hemaglutinina), permitindo rápida disseminação em tecidos linfoides e dificultando a
18 resposta imunológica mediada por linfócitos T e B, produzindo linfopenia e atrofia de órgãos
19 linfoides (VON MESSLING et al, 2006).

20 As infecções por CPV são caracterizadas por doença gastrointestinal
21 hemorrágica aguda e muitas vezes fatal, acometendo cães entre 6 semanas e 6 meses de idade
22 (GREENE, DECARO, 2012). A replicação viral necessita de funções celulares que ocorrem
23 em células de rápida multiplicação celular (fase de síntese do ciclo mitótico), como intestino,
24 tecidos embrionários, sistema linfático e medula óssea. Desta forma, o vírus causa
25 pancitopenia e aplasia medular aguda por infectar células progenitoras e proliferativas da
26 medula óssea, ocasionando grave imunossupressão e predispondo o hospedeiro a outras
27 infecções (MORAES, COSTA, 2012b).

28 O CDV e o CPV facilitam a infecção do hospedeiro por outros agentes
29 infecciosos. A susceptibilidade do hospedeiro a outros micro-organismos determina a piora
30 clínica do paciente e pode levá-lo a óbito, tornando-se, desta forma, difícil relacionar os
31 agentes etiológicos detectados às lesões encontradas e à causa de morte do animal. Em
32 diversas situações, em função da diversidade de sinais clínicos, a presença do agente

- 1 infeccioso não comprova o estabelecimento das manifestações clínicas, e, nos casos das co-
- 2 infecções, é importante levar isso em consideração antes de determinar qual foi a real causa
- 3 de morte do paciente.

3 REFERÊNCIAS

- ACAR, A.; GUR, S.; DOGAN, I.; AKCA, Y. A serologic investigation of canine herpesvirus type 1 infection in Kangal dogs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, p. 1377-1380, 2009.
- Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET). Notícias: População de pets cresce 5% ao ano e Brasil é o quarto no ranking mundial. 2014. Disponível em: < <http://abinpet.org.br/imprensa/noticias/abinpet-divulgadados-mercado-pet-2013/>>. Acesso em 18 nov, 2014.
- APPEL, M.J. Canine herpesvirus. In: APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores, volume 1**. 1st ed. New York: Elsevier, 1987a. 5-15.
- APPEL, M.J. Canine adenovirus type 1 (infectious canine hepatitis virus). In: APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores, volume 1**. 1st ed. New York: Elsevier, 1987b. 29-43.
- APPEL, M.J. Canine adenovirus type 2 (infectious laryngotracheitis virus). In: APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores, volume 1**. 1st ed. New York: Elsevier, 1987c. 45-51.
- 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. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 92, p. 52-56, 2011.
- BABAEI, H.; AKHTARDANESH, B.; GHANBARPOUN, R.; NAMJOO, A. Serological evidence of canine herpesvirus-1 in dogs of Kerman city, southeast of Iran. **Transboundary Emerging Diseases**, Zurich, v. 57, p. 348-351, 2010.
- BENTUBO, H.D.L.; TOMAZ, M.A.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Life expectation and causes of death in dogs in the metropolitan area of Sao Paulo (Brazil). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.
- BRONSON, R.T. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 2057-2059, 1982.
- BURR, P.D.; CAMPBELL, M.E.; NICOLSON, L.; ONIONS, D.E. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 52, p. 227-237, 1996.
- CABASSO, V.J.; STEBBINS, M.R.; AVAMPATO, J.M. A bivalent live virus vaccine against canine distemper (CD) and infectious canine hepatitis (ICH). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 99, p. 46–51, 1958.
- CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A.; KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 26, p. 803–814, 1965.

CARMICHAEL, L.E. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 156, p. 1714–1721, 1970.

CARMICHAEL, L.E. Identification of a canine adenovirus (infectious canine hepatitis virus) inhibitor in dog liver extracts as arginase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 6, p. 348–354, 1972.

CARMICHAEL, L.E.; MEDIC, B.L.S. Small-plaque variant of canine of canine herpesvirus with reduced pathogenicity for newborn pups. **Infection and Immunity**, Washington, v. 20, n. 108–114, 1978.

CHVALA, S.; BENETKA, V.; MÖSTL, K.; ZEUGSWETTER, F.; SPERGSE, J.; WEISSENBÖCK, H. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 44, p. 508–512, 2007.

COLOMBO, G.; BUONO, M.D.; SMANIA, K.; RAVIOLA, R.; DE LEO, D. Pet therapy and institutionalized elderly: a study on 144 cognitively unimpaired subjects. **Archive of Gerontology and Geriatrics**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 207–216, 2006.

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. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, p. 128–131, 2009.

DAMIÁN, M.; MORALES, E.; SALAS, G.; TRIGO, F.J. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, p. 289–293, 2005.

DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 2895–2908, 2003.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, D.; COLAIANNI, M.L.; LORUSSO, A.; MARI, V.; BUONAVOGLIA, C. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. **Research in Veterinary Science**, London, v. 83, p. 269–273, 2007.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Canine adenoviruses and herpesvirus. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 38, p. 799–814, 2008.

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. **Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Zootechny**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1267–1270, 2010.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Seroprevalence of parvovirus, adenovirus, coronavirus and canine distemper virus infections in dogs of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p.183–189, 2007.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; BRUM, J. S.; GRACA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FOLSE, E.B.; MINDER, C.C.; AYCOCK, M.J.; SANTANA, R.T. Animal-assisted therapy and depression in adult college students. **Anthrozoos: a Multidisciplinary Journal of the Interactions of People & Animals**, London, v. 7, n. 3, p. 188-194, 1994.

FORD, R.B. Canine infectious respiratory disease. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. p. 55-65.

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

GABRIEL, A.L.; MASUDA, E.K.; RAMOS, A.T.; INKELMANN, M.A.; AZAMBUJA, E.; GRAÇA, D.L. Canine adenovirus type-2 and canine distemper virus pulmonary co-infection in two Chow-Chow puppies with *Candida* sp esophagitis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 47-51, 2008.

GILL, M.; SRINIVAS, J.; MOROZOV, I.; SMITH, J.; ANDERSON, C.; GLOVER, S.; CHAMP, D.; CHU, H.J. Three-year duration of immunity for canine distemper, adenovirus, and parvovirus after vaccination with a multivalent canine vaccine. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Newtown, v. 2, p. 227–234, 2004.

GRANDGEORGE, M.; TORDJMAN, S.; LAZARTIGUES, A.; LEMONNIER, E.; DELEAU, M.; HAUSBERGER, M. Does pet arrival trigger prosocial behavior in individuals with autism? **PLoS ONE**, Boston, v. 7, n. 8, e41739, 2012.

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

GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012b. p. 42–48.

GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. p. 25–42.

GREENE, C.E.; DECARO, N. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. p. 67–80.

HAYASHIDANI, H.; OMI, Y.; OGAWA, M.; FUKUTOMI, K. Epidemiological studies on the expectation of life for dogs computed from animal cemetery records. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 1003-1008, 1998.

HEADLEY, S.A.; SHIROTA, K.; BABA, T.; IKEDA, T.; SUKURA, A. Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 46, p. 151–154, 2009.

HEADLEY, S.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.F.; BRACARENSE, A.F.R.L.; ALFIERI, A.A. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1945-1978, 2012.

HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A.; FRITZEN, J. T. T.; GARCIA, J. L.; WEISSENBOCK, H.; SILVA, A. P.; BODNAR, L.; OKANO, W.; ALFIERI, A. F. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 25, n. 1, p. 129-135, 2013.

HEADLEY, S.A.; BODNAR, L.; SILVA, A.P.; ALFIERI, A.F.; GOMES, L.A.; OKANO, W.; ALFIERI, A.A. Canine distemper virus with concomitant infections due to canine herpesvirus-1, canine parvovirus, and canine adenovirus in puppies from Southern Brazil. **Jacobs Journal of Microbiology and Pathology**, Austin, v. 1, n. 2, e-number 015, 2015.

HU, R.L.; HUANG, G.; QIU, W.; ZHONG, Z.H.; XIA, X.Z.; YIN, Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 25, p. 77-84, 2001.

INKELMANN, M.A.; ROZZA, D.B.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D.; GRAÇA, D.L.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS C.S.L. Hepatite infecciosa canina: 62 casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 325-332, 2007.

KAMINSKI, M.; PELLINO, T.; WISH, J. Play and pets: the physical and emotional impact of child-life and pet therapy on hospitalized children. **Children's Health Care**, Hillsdale, v. 31, n. 4, p. 321-335, 2002.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, p. 1176-1181, 2010.

KROGENAES, A.; ROOTWELT, V.; SJOBERG, E.K.; AKSELSEN, B.; SKAR, T.M.; MYHRE, S.S.; RENSTROM, L.H.; KLINGEBORN, B.; LUND, A. A serologic study of canine herpesvirus infection in the Norwegian adult dog population. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, p. 153-158, 2012.

KURISSIO, J.K. **Isolamento viral e diagnóstico molecular de herpesvírus canino**. 2013. 72 p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2013.

LEDBETTER, E.C.; RIIS, R.C.; KERN, T.J.; HALEY, N.J.; SCHATZBERG, S.J. Corneal ulceration associated with naturally occurring canine herpesvirus-1 infection in two adult dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 229, p. 376-384, 2006.

LEDBETTER, E.C. Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 61, n. 4, p. 193-201, 2013.

LUST, G.; CARMICHAEL, L.E. Suppressed synthesis of viral DNA, protein and mature virions during replication of canine herpesvirus at elevated temperature. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 124, p. 572–580, 1971.

MARUSYK, R.G. Comparison of the immunological properties of two canine adenoviruses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 18, p. 817-323, 1972.

MICHELL, A.R. Longevity of british breeds of dogs and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, London, v. 145, n. 27, p. 625-629, 1999.

MOJZISOVA, J.; SMRKO, P.; GOLDOVA, M.; BECAROVA, L. Occurrence of antibodies against canine herpesvirus in Slovakia and evaluation of nonspecific immune parameters in positive dogs. In: **Southern European Veterinary Conference (SEVC)**, 2011. Barcelona. *Anais...* Barcelona: SEVEC, 2011. p. 18.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. *Adenoviridae*. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária: virologia viral e doenças víricas**. 2nd ed. Santa Maria: UFSM, 2012a. p. 481-502.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. *Parvoviridae*. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária: virologia viral e doenças víricas**. 2nd ed. Santa Maria: UFSM, 2012b. p. 439-462.

MUSAYEVA, K.; SENGAUT, J.; PETKEVICIUS, S.; MALAKAUSKAS, A.; GERULIS, G.; SALOMSKAS, A. Seroprevalence of canine herpesvirus in Lithuanian dog population. **Veterinary Medicine and Zootechnics**, Kaunas, v. 61, n. 83, p. 48-52, 2013.

NÖTHLING, J.O.; HÜSSY, D.; SRTECKLER, D.; ACKERMANN, M. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 3, p. 276-282, 2008.

OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; TEIXEIRA, E.M.; DEZENGRINI, R.; PAVARINI, S.P.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 636-642, 2009.

OLIVEIRA, E.C.; ALMEIDA, P.R.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P.; WATANABE, T.T.N.; DRIEMEIER, D. Infectious canine hepatitis in naturally infected dogs: pathological findings and immunohistochemical diagnosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 158-164, 2011.

POULET, H.; GUIGAL, P.M.; SOULIER, M.; LEROY, V.; FAYET, G.; MINKE, J.; CHAPPUIS MERIAL, G. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. **Veterinary Record**, London, v. 148, p. 691-695, 2001.

PROSCHOWSKY, H.F.; RUGBJERG, H.; ERSBOLL, A.K. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 63-74, 2003.

READING, M.J.; FIELD, H.J. Detection of high levels of canine herpesvirus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralization test. **Research in Veterinary Science**, London, v. 66, p. 273-275, 1999.

RIJSEWIJK, F.A.; LUITEN, E.J.; DAUS, F.J.; VAN DER HEIDJEN, R.W.; VAN OIRSCHOT, J.T. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 1-7, 1999.

RONASSE, V.; VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; GUIOT, A.L.; AEBERLE C.; NAUWYNCKS, H.J.; POULET, H. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, p. 299-304, 2002.

SANTOS, T.R. **Detecção molecular do herpesvírus canino tipo 1 em cadelas com histórico de desordens reprodutivas no sudeste do Brasil**. 2014. 41 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2014.

SEO, I.B.; SEONG, W.W.; LIM, C.H. Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. **Korean Journal Veterinary Research**, Seoul, v. 34, n. 3, p. 647-652, 1994.

SILVA, A.P.; BODNAR, L.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Molecular detection of canine distemper virus (CDV), canine adenovirus A type 1 and 2 (CAV-1 and CAV-2), and canine parvovirus type 2 (CPV-2) in the urine of naturally infected dogs. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 3231-3235, 2014.

STRÖM HOLST, B.; HAGBERG GUSTAVSOON, H.; GRAPPERON-MATHIS, M.; LILLIEHÖÖK, I.; JAHANNISSON, A.; ISAKSSON, M.; LINDHE, A.; AXNÉR, E. Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 362-365, 2012.

TRAPP, S.M.; IACUZIO, A.I.; BARCA JUNIOR, F.A.; KEMPER, B.; SILVA, L.C.; OKANO, W.; TANAKA, N.M.; GRECCO, F.C.A.R.; CUNHA FILHO, L.F.C.; STERZA, F.A.M.. Causes of death and reasons for euthanasia in a hospital population of dogs and cats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 395-402, 2010.

VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, p. 6084-6092, 2006.

WRIGHT, N.G. Canine adenovirus: its role in renal and ocular disease: a review. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 17, p. 25-33, 1976.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

1 Investigar a presença de CHV, CAdV-1 e CAdV-2 por PCR em fragmentos
2 de órgãos de cães atendidos no setor de Moléstias Infecciosas e que vieram a óbito pela
3 gravidade da doença clínica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4 • Utilizar a técnica de PCR para verificar a presença de CHV, CAdV-1 e
5 CAdV-2;
- 6 • Verificar a ocorrência de infecções concomitantes com vírus
7 imunossupressores e suas implicações na manifestação clínica do
8 paciente;
- 9 • Comparar o histórico, sinais clínicos e achados patológicos apresentados
10 pelos animais do estudo e que foram positivos para os agentes virais
11 pesquisados com a apresentação clínica clássica das enfermidades
12 estudadas;
- 13 • Comparar os achados patológicos encontrados em cada animal com a
14 presença dos agentes virais pesquisados.

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

HERPESVIROSE E ADENOVIROSE CANINA EM INFECÇÕES SINGULARES OU MISTAS: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ACHADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

CANINE HERPESVIROSIS AND ADENOVIRUS IN SINGLE AND MIXED INFECTIONS: MOLECULAR DIAGNOSIS AND CLINICOPATHOLOGICAL FINDINGS

RESUMO

1 O herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) é um alfa herpesvírus conhecido por causar infecções
2 fatais em filhotes e neonatos, e infecções latentes relacionadas com desordens reprodutivas,
3 respiratórias e oculares em cães adultos. As infecções por adenovírus canino tipo 1 (CAAdV-1)
4 são clinicamente conhecidas por causar síndromes hepáticas, além de edema de córnea típico;
5 no entanto, outros quadros podem ser observados, como síndrome hemorrágica e morte
6 abrupta, sendo a enfermidade denominada hepatite infecciosa canina. O adenovírus canino
7 tipo 2 (CAAdV-2) tem sido recuperado consistentemente de cães acometidos com a
8 enfermidade multietiológica designada traqueobronquite infecciosa, causando sinais clínicos
9 respiratórios. As co-infecções de vírus em cães têm sido descritas mundialmente. O vírus da
10 cinomose canina (CDV) e o parvovírus canino (CPV) estão comumente envolvidos em
11 infecções mistas devido a seus efeitos imunossupressores, que facilitam a instalação de outros
12 agentes etiológicos. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de CHV, CAAdV-2 e
13 CAAdV-2, com ou sem a associação dos vírus imunossupressores CDV e CPV por PCR em
14 cães atendidos no setor de Moléstias Infecciosas no Hospital Veterinário da Universidade
15 Estadual de Londrina (UEL) e que vieram a óbito pela gravidade da doença clínica. De
16 janeiro de 2013 a dezembro de 2014, 53 pacientes foram selecionados por terem morrido ou
17 por terem sido eutanasiados devido a grave piora clínica. Estes animais foram necropsiados, e
18 seus órgãos foram avaliados por histopatologia e por PCR para CHV, CAAdV-1, CAAdV-2,
19 CDV e CPV. 28 animais foram positivos na PCR para CHV, CAAdV-1 e/ou CAAdV-2. Os
20 achados de necropsia e histopatologia foram compatíveis às lesões causadas pelos agentes
21 virais avaliados. A presença de CHV, CAAdV-1 e CAAdV-2 foi detectada em 19 (67,9%), 14
22 (50%) e 6 (21,4%) animais respectivamente, sendo que 19 (67,9%) animais apresentaram co-
23 infecções. Dentre as infecções mistas, 11 (57,9%) foram concomitantes com CDV e 6
24 (31,6%) com CPV. Possivelmente, a presença dos antígenos juntamente com a baixa
25 imunidade dos animais produziram injúrias que levaram os cães a óbito por falência múltipla
26 de órgãos. O expressivo número de casos positivos para CHV e/ou CAAdV neste estudo mostra
27 a importância dessas viroses para a população canina.

Palavras-chave: herpesvírus canino, adenovírus canino, co-infecções, viroses de cães, diagnóstico inconclusivo

ABSTRACT

1 Canid herpesvirus 1 (CHV-1) is an alphaherpesvirus known for causing fatal infections in
2 puppies and neonates, and latent infections related to reproductive, respiratory, and ocular
3 disorders in adult dogs. The infections caused by canine adenovirus type 1 (CAAdV-1) are
4 clinically known for causing hepatic syndromes and typical corneal edema. Other clinical
5 conditions can be found, such as hemorrhagic syndrome and sudden death, and the disease is
6 known as canine infectious hepatitis. Canine adenovirus type 2 (CAAdV-2) has been recovered
7 consistently from dogs that present the multi etiological disease known as canine infectious
8 thacheobronchitis, presenting respiratory signs. Viral co-infections in dogs have been reported
9 worldwide. Canine distemper virus (CDV) and canine parvovirus (CPV) are commonly
10 involved in mixed infections due to their immunosuppressive effects, which make the entrance
11 of other etiological agents easier. The aim of this study was to investigate the presence of
12 CHV, CAAdV-1, and CAAdV-2, with or without the association to the immunosuppressive
13 viruses CDV and CPV by PCR in dogs that were attended at the Infectious Diseases
14 Department of the Veterinary Hospital from Londrina State University (UEL) and that died
15 due to the severity of clinical disease presented. From January 2013 to December 2014, 53
16 patients were selected because they died or were euthanized for severe clinical worsening.
17 These animals were necropsied, and their organs were analyzed by histopathology and PCR
18 assays specific for CHV, CAAdV-1, CAAdV-2, CDV, and CPV. 28 animals were positive for
19 CHV, CAAdV-1 and/or CAAdV-2 by PCR. The pathological findings were compatible to the
20 injuries normally caused by the viral agents evaluated. The presence of CHV, CAAdV-1, and
21 CAAdV-2 was detected in 19 (67.9%), 14 (50%) e 6 (21.4%) animals respectively; 19 (67.9%)
22 animals presented co-infections. Among the mixed infections, 11 (57.9%) were concomitant
23 to CDV and 6 (21.4%) to CPV. Possibly, the presence of antigens along with the low
24 immunity of the dogs produced injuries that led them to death by multiple organs failure. The
25 expressive number of positive cases to CHV and/or CAAdV in this study shows the importance
26 of these viruses to Brazilian dog population.

Keywords: canid herpesvirus, canine adenovirus, co-infections, viruses of dogs, inconclusive diagnostics

5.1 INTRODUCTION

27 Canid herpesvirus 1 (CHV-1) is a varicellovirus included in the
28 *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily, with a host range restricted to domestic
29 and wild canids. CHV-1 was first described in 1965 as the agent responsible for causing a
30 fatal hemorrhagic viral disease in newborn puppies (CARMICHAEL et al, 1965). To date,
31 only one serotype has been identified, as defined by antigenic comparison of various isolates,
32 and antigenic variation among field isolates is too small (GREENE, 2012a). The genome
33 structure of CHV shows a close genetic relationship to other alphaherpesviruses, such as
34 feline herpesvirus 1 (FHV-1), phocid herpesvirus 1, and equid herpesviruses 1 and 4

1 (FRANCO et al, 2012). As it is an enveloped virus, CHV-1 is rapidly inactivated when
2 exposed to common disinfectants, lipid solvents, and temperatures greater than 40°C.
3 Although it is not resistant to the environment, the virus remains in nature due to a latent
4 infection in the nerve ganglia of the host (GREENE, 2012a). Latently infected dogs represent
5 a source of infection for susceptible animals, and this is of particular concern in breeding dogs
6 that can ensure CHV transmission through oral, nasal, and genital tract, and to animals that
7 live in kennels and shelters (DECARO et al, 2008).

8 The pattern and severity of the disease associated with CHV-1 infection is
9 host age-dependent. Puppies that are 1-4 weeks old have hemorrhagic and necrotizing disease.
10 In the absence of passive immunity, the disease is usually acute and fatal (CARMICHAEL et
11 al, 1965). Hypothermia in puppies explains the high rate of viral replication in these animals,
12 since the virus is temperature sensitive and has great replication at temperatures below 37°C
13 (LUST, CARMICHAEL, 1971). Infection of puppies older than 4 weeks of age and adult
14 dogs is often asymptomatic or mild, presenting respiratory or genital disease. Pregnant
15 females may abort or give birth to asymptomatic puppies that harbor and spread viruses to
16 other animals (GREENE, 2012a). CHV can also be detected in conjunctival or corneal swab
17 specimens from adult dogs, with or without clinical signs (LEDBETTER, 2013).

18 The pathological findings in infected young animals consist predominantly
19 of focal necrosis and hemorrhage that can be found in all organs. Kidney lesions appear as
20 circumscribed red areas of subcapsular hemorrhage on top of a pale necrotic area. The lungs
21 are edematous and there are necrotic and hemorrhagic foci. The spleen is usually enlarged and
22 lymphadenitis is a common finding. There is presence of serosanguinous fluid in the
23 abdominal and thoracic cavities (APPEL, 1987a; DECARO et al, 2008; GREENE, 2012a).
24 Histologically, necrotizing lesions are present in most organs, including kidney, liver, lung,
25 intestine, brain, thymus, and spleen. The most severe injuries are found in kidney, with
26 destruction of renal tubules and degenerative alterations. In hepatic parenchyma, there are
27 areas of focal necrosis and hemorrhage with structural loss. In the lungs, there is presence of
28 necrotizing pneumonia with alveolar lesions followed by massive fibrinous exudation in
29 alveolar spaces. In the central nervous system, the meninges are congested and infiltrated with
30 lymphocytes and macrophages. In most cases, the necrotic lesions are not accompanied by the
31 invasion of inflammatory cells. The presence of basophilic inclusion bodies can be found in
32 parenchymal cells in necrotic areas of the kidney, liver and lung. However, they are difficult
33 to find (APPEL, 1987a).

1 Naturally acquired infections with CHV-1 are reported globally and CHV-1
2 is considered endemic in many regions of the world (READING, FIELD, 1999; DAHLBOM
3 et al, 2009; KROGENAES et al, 2012; STROM HOLST et al, 2012; YESILBAG et al, 2012).
4 However, only few studies have reported the occurrence of CHV-1 in Brazil (OLIVEIRA et
5 al, 2009; ÁVILA et al, 2011; KURISSIO, 2013; SANTOS, 2014, HEADLEY et al, 2015).
6 The difficulty of diagnosis and lack of vaccines to protect dogs against CHV-1 infection in
7 Brazil preclude the control and prevention of the disease and make the spread of the virus
8 easier among susceptible canid individuals.

9 Canine adenoviruses (CAAdVs) are members of the genus *Mastadenovirus*,
10 family *Adenoviridae*. These viruses are divided in two distinct types, type 1 (CAAdV-1) and
11 type 2 (CAAdV-2), that are related antigenically and genetically (DAVIDSON et al, 2003;
12 GREENE, 2012b). Dogs, red foxes, wolves, and coyotes are highly susceptible to CAAdVs, but
13 infection in other mammalian species have also been described (GREENE, 2012b).

14 CAAdV-1 replicates in vascular endothelial cells and hepatocytes, causing
15 infectious canine hepatitis by producing acute necrohemorrhagic lesions, especially in young
16 animals. Transmission occurs through animal-to-animal contact or indirectly through
17 exposure to secretions such as saliva, feces, urine or respiratory secretions. Clinical signs
18 include fever, depression, loss of appetite, tachycardia, hyperventilation, vomiting, and
19 diarrhea. The enlargement of the liver may cause abdominal distention and diathesis,
20 commonly seen as epistaxis, congestion, or hemorrhage of mucous membranes (DECARO et
21 al, 2008; GREENE, 2012b). Corneal opacity and interstitial nephritis may occur one to three
22 weeks after recovery due to deposition of immune complexes by type III hypersensitivity
23 (WRIGHT, 1976).

24 In pathology, petechiae are common findings in dogs with canine infectious
25 hepatitis, as well as jaundice and subcutaneous edema. Blood clotting in the heart and blood
26 vessels is common due to the defect of hemostasis caused by the infection with CAAdV-1.
27 Ascites and exudates may be present in the abdominal cavity. The liver may be jaundiced or
28 red and congested, with lobular pattern due to centrilobular necrosis. The thickened and
29 swollen gallbladder is typical of dogs that have infectious hepatitis. Enlargement of the spleen
30 can be seen with the excessive presence of blood. The lymphoid organs in general exhibit
31 edema and congestion, usually with the presence of hemorrhage. The kidneys become
32 congested and gray focal lesions in the renal cortex can be seen. These lesions are frequently
33 found in dogs who recovered from the disease. Catarrhal pneumonia associated with
34 congestion and edema is described in lungs (APPEL, 1987b; DECARO et al, 2008; GREENE,

2012b). Histopathological studies may show intranuclear inclusion bodies in hepatocytes, Kupffer cells, endothelial cells, renal glomeruli, and vascular endothelium in several organs. Liver damage is the main injury in dogs affected by infectious canine hepatitis, demonstrated by centrilobular necrosis with dilatation of sinusoids. Nephrosis is common and foci of necrosis can be found in most organs. Inflammatory responses with mononuclear and polymorphonuclear cells can be visualized mainly in liver and kidney, especially near necrotic sites. Interstitial nephritis and uveitis are lesions found frequently in animals that recovered from infectious hepatitis (APPEL, 1987b).

Along with other etiological agents such as *Bordetella bronchiseptica* and *Mycoplasma spp*, CAAdV-2 has been recovered from dogs that suffered from the clinical entity known as canine infectious respiratory disease, kennel cough, or canine infectious tracheobronchitis (FORD, 2012). This complex cause an acute and highly contagious respiratory disease, affecting larynx, bronchi, and lower respiratory tract. Respiratory signs appear because of bronchial epithelial cells damage, causing a self-limiting cough. In puppies or immunocompromised dogs, the involvement of secondary bacterial infections may overlap viral infection and complicate the respiratory signs (DECARO et al, 2008).

Gross lesions found in animals infected by CAAdV-2 are usually restricted to respiratory system and lymphoid organs. Consolidated and reddened areas can be seen in the frontal lung lobes. The tonsils become enlarged and nasal mucosa becomes erythematous. The histopathological findings in CAAdV-2 infections involve rhinitis, tonsillitis, tracheitis, bronchitis and interstitial pneumonia with bronchial epithelium proliferation. Intranuclear inclusion bodies are often found degenerated pulmonary epithelium (APPEL, 1987c).

As CAAdV-2 is capable of producing cross-immunity against CAAdV-1, the annual vaccination with polyvalent vaccines that have CAAdV-2 is enough to provide immunity for more than three years (GILL et al, 2004). As these viruses are genetically stable, immunization failures are rare for CAAdV vaccines (DECARO et al, 2007). However, the large amount of Brazilian non-vaccinated dogs enables the incidence of CAAdV infections. There are few reports of the presence of CAAdV infections in Brazil (DEZENGRINI et al, 2007; INKELMANN et al, 2007; GABRIEL et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2011; HEADLEY et al, 2013; SILVA et al, 2014). The low number of reports is due to difficulties in clinical diagnosis and the absence of confirmatory diagnosis of the diseases caused by both viruses.

Co-infections of canine viruses have been reported worldwide, with canine distemper virus (CDV) and canine parvovirus (CPV) being normally involved in these concomitant infections because of their immunosuppressive effects (DAMIÁN et al, 2005;

1 CHVALA et al, 2007; GABRIEL et al, 2008; HEADLEY et al, 2009; HEADLEY et al, 2013,
2 SILVA et al, 2014).

3 The aim of this study was to evaluate the prevalence of CHV-1, CAAdV-1,
4 and CAAdV-2 with or without concomitant infection by CDV and CPV. Additionally, the
5 clinicopathological findings from these dogs were presented and discussed.

5.2 MATERIAL AND METHODS

6 From January 2013 to December 2014 dogs from all ages and sex admitted
7 at the Infectious Diseases Ambulatory of Companion Animals Department of Londrina State
8 University (UEL) were followed up. Dogs that died with infectious disease, despite medical
9 treatment, or that were euthanized due to poor prognosis by severe clinical disease, were
10 included in this investigation.

11 Fifty-three dogs presented clinical deterioration despite treatment. Of these
12 dogs, 22 died and 31 were euthanized on humanitarian issues according to technical standards
13 established by Brazilian Federal Council of Veterinary Medicine (CFMV, 2012). Twenty-one
14 dogs were pure breed and 32 were mongrels; most of them lacked vaccination history.
15 Clinical signs before death included appetite loss, lethargy, fever, and decumbency. There
16 were animals presenting neurological signs, concomitant diseases (such as tumors and
17 worms), or presented acute signs and died before clinical evaluation by the veterinarian
18 (Tables 3, 4, and 5).

19 The animals were submitted for routine pathological evaluation to the
20 Laboratory of Veterinary Pathology, UEL. Liver, spleen, lung, cerebellum, intestine, lymph
21 nodes, tonsils, kidney, heart, and intestine fragments were fixed by immersion in 10%
22 buffered formalin solution and routinely processed for histopathological evaluation.

23 Selected tissue samples were used for the molecular diagnosis of CHV,
24 CAAdV-1, CAAdV-2, CDV, and CPV. Initially, the fragments were processed for extraction of
25 DNA and RNA as described by BOOM et al (1999) modified by ALFIERI et al (2006).
26 Positive controls consisted from previously described occurrences (CAAdV-1, CAAdV-2, CDV,
27 and CHV) (HEADLEY et al, 2013; HEADLEY et al, 2015), and aliquots from commercial
28 vaccines (CPV). Nuclease-free water (InvitrogenTM Life Technology) was used as negative
29 control.

30 The detection of CHV was performed by using a PCR assay designed to
31 amplify a 450 bp fragment of the glycoprotein B gene of viral DNA (RONSSE et al, 2005) in

1 liver, lung, cerebellum, spleen, tonsil, and lymph node extractions. The amplification of
2 CAdV-1 and -2 was performed from liver, lung, spleen, and tonsil extractions by using a PCR
3 assay designed to amplify the 508 bp and 1,030 bp fragments of the E gene of CAdV-1 and -2
4 respectively (HU et al, 2001). Cerebellum, liver, spleen, lung, tonsil and lymph node RNA
5 samples were processed for RT-PCR assay targeting a 287 bp fragment of the N gene of CDV
6 (FRISK et al, 1999). To detect CPV, a PCR reaction targeting a 583 bp fragment of the VP2
7 gene was performed (HONG et al, 2007). The primer sequences are shown on Table 1. All
8 obtained PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, stained with
9 ethidium bromide, and examined under ultraviolet light. Two positive products of each virus
10 were purified and submitted for direct sequencing using the respective forward and reverse
11 primers. The partial nucleotide sequences obtained were initially compared with those
12 deposited in GenBank to confirm the diagnosis by using BLAST
13 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

14 The animals that were negative to all viruses tested or that were positive for
15 CDV and/or CPV without coinfections with CHV and/or CAdV were eliminated from the
16 study. Therefore, 28 from the 53 animals were kept in the study group for presenting
17 molecular diagnosis of CHV, CAdV-1, and/or CAdV-2 infection.

5.3 RESULTS

18 Of the 53 cases analyzed by PCR, 25 (47.2%) were eliminated from the
19 study. There were 15 (28.3%) animals excluded for resulting negative for all surveyed
20 viruses; 5 (9.4%) and 4 (7.6%) animals excluded for being positive for single infections of
21 CDV and CPV respectively; and one (1.9%) animal excluded for presenting CDV and CPV
22 co-infection. Therefore, the group of animals designated for this study presented 9 (17%)
23 cases of single infections by CHV, and 19 (35.8%) mixed infections that are shown on Table
24 2, totalizing 28 (52.8%) animals.

25 From these 28 cases, 12 (42.9%) were males and 16 (57.1%) were females.
26 The age of the dogs ranged from 2 weeks to 13 years old. Only 10 dogs were mongrels or
27 mixed breed dogs (35.7%); 18 dogs were pure breed (64.3%). Five (17.9%) dogs presented
28 acute clinical manifestations and died. The overview of the dogs and clinical data are shown
29 in Tables 3, 4, and 5. The presence of CHV, CAdV-1, and CAdV-2 was detected in 19
30 (67.9%), 14 (50%), and 6 (21.4%) animals respectively. Among the 19 co-infections, 11
31 (57.9%) were concomitant to CDV and 6 (31.6%) to CPV (Table 2).

1 The pathological findings visualized in necropsy and histopathology
2 corresponded to the expected injuries according to what is described in the literature for each
3 virus evaluated (APPEL, 1987; DECARO et al, 2008; GREENE, 2012). The lesions found in
4 the cases of mixed infections match with the expected lesions, despite the difficulty of
5 establishing which injuries were caused by each viral agent. All of the 6 animals that were
6 positive for CPV showed enteric disorders, such as hemorrhagic diarrhea, Peyer's patches
7 alterations, and local lymph nodes depletion. The pathological findings of each case analyzed
8 are shown in Tables 3, 4, and 5.

9 Two positive PCR products for each virus evaluated were sequenced and
10 compared to other sequences deposited previously in GenBank, confirming the presence of
11 the viruses in the studied animals.

5.4 DISCUSSION

12 The large number of cases that were positive for CHV, CAAdV-1, and/or
13 CAAdV-2 in this study shows the importance of these viruses to dog population in Brazil. From
14 the 53 cases of death associated to unspecific clinical signs, 28 (52.8%) were positive for at
15 least one of CHV, CAAdV-1, and CAAdV-2. The molecular detection of these viruses has been
16 poorly reported in Brazil (KURISSIO, 2013; HEADLEY et al, 2013; SANTOS, 2014; SILVA
17 et al, 2014, HEADLEY et al, 2015). The low number of studies may neglect the circulation
18 and importance of these viruses to Brazilian canine population.

19 As there is no vaccination against CHV in Brazil, the high rate of detection
20 found in this (67.9%) and other studies (KURISSIO, 2013; SANTOS, 2014; HEADLEY et al,
21 2015) should be an alert to breeding dogs and kennels owners as well as dog agglomeration
22 sites such as veterinary clinics, hospitals, and shelters. These environments are of great
23 importance for the maintenance of the virus in the population due to the presence of animals
24 with latent infections that can spread the virus to susceptible dogs (DECARO et al, 2008).

25 The wide range of clinical signs and lesions found in 19 (67.9%) of the 28
26 cases analyzed and that were positive for CHV could be explained by the fact that primo-
27 infections, especially in neonates and young animals, may be severe, and the presence of the
28 virus is probably the cause of death for these animals. When adults or elderly dogs are
29 infected for the first time or when the infection is reactivated, the presence of the virus might
30 be a casual finding, as the infection is normally asymptomatic. As PCR is a highly sensitive
31 diagnostic assay, it is expected to detect the viral genome in dogs that have latent infections

1 even before the presentation of clinical signs (GREENE et al, 2012a). Thereby, the
2 importance of CHV infections, even when they are not associated to clinical presentations, is
3 the maintenance of the virus in breeding kennels that have the purpose of commercialization
4 of puppies. These animals have an important role in the epidemiology of herpesvirosis, as
5 they move to different locations and spread the virus to other environments and to other
6 susceptible dogs. The detection of CHV, even without the presentation of typical clinical
7 signs, can explain previous losses due to reproduction failures in breeding kennels and helps
8 designing the sanitary profile of a breeding animal. Since there is no vaccination against CHV
9 in Brazil, it is important to remove the positive dogs from breeding stock and castrate them to
10 prevent the birth of new infected puppies.

11 From the 9 animals that presented single infections of CHV, one (11.1%)
12 was neonate and presented acute death. Normally, CHV infection in neonates is associated
13 with acute and fatal illness (GREENE, 2012a), as it was observed in this case. Five (55.6%)
14 animals were aged from 1 month to 1 year old, and all of them presented pulmonary lesions
15 that might have led them to clinical worsening. The 3 (33.3%) dogs older than 2 years of age
16 presented clinical manifestations compatible with other diseases, such as secondary bacterial
17 infections and malignant tumors. The concomitant diseases may have contributed to these
18 patients' immunosuppression, and the presence of CHV may have occurred by the fact that
19 the virus has the capability of latency, reappearing systemically in low immunity situations.
20 There by, it is difficult to determine whether the lesions found in these animals were caused
21 by CHV infection or if the virus was detected occasionally.

22 The difficulty to perform the clinical diagnosis of infectious canine hepatitis
23 makes the disease overlooked by veterinarians in cases of CAAdV-1 infection, especially in
24 young animals. The acute course of the disease and its nonspecific clinical signs may be
25 confused with other diseases such as parvovirosis, canine distemper, worms, or protozoa
26 infections (GREENE, 2012b). As one of the agents of kennel cough, CAAdV-2 is commonly
27 unnoticed for causing mild and self-limited clinical signs. However, depending on
28 concomitant infections and immune status of the host, the lesions may be converted into
29 severe and the patient can become susceptible to other infections (FORD, 2012).

30 From the 28 cases analyzed, 15 (53.6%) were positive for at least one of the
31 adenoviruses, and only 3 (20%) dogs were older than 6 months of age. One of the cases was
32 of an 8-year-old dog that had lymphoma with nodules in liver and kidney. The other case, also
33 an 8-year-old dog, presented a history of renal disease. The third case was of a 13-year-old
34 dog that was additionally positive for CDV and CPV, demonstrating in all three situations a

1 significant immunosuppression. As seen in other studies, dogs affected by adenovirus are
2 generally young, but the involvement of dogs that are more than one year old is also
3 described, usually by lack of vaccination or immunological failure (DECARO et al, 2007;
4 INKELMANN et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2011; GREENE, 2012b). As these animals have
5 no historical of immunizations, these elderly animals might have lacked a vaccine booster,
6 which made them susceptible to these infections. Furthermore, CAdV-1 is capable of
7 producing latent infections that could be reactivated under immunosuppression (GREENE,
8 2012b). Despite the fact that all CAdV-1 infections were associated with other viral
9 infections, all animals presented damage in liver that ranged from mild to severe. All animals
10 positive for CAdV-1 also presented pulmonary lesions. This can be explained by the fact that
11 from the 14 cases of CAdV-1, 12 (85.7%) had mixed infections with viruses that cause
12 respiratory injury (CHV, CAdV-2, and/or CDV). The other two (14.3%) dogs were very
13 young and were co-infected with CPV. These animals may have suffered a generalized
14 infection for presenting a weak immune response, or because they had some other infection
15 that was not investigated in this study. Moreover, the virus can be detected in dogs that were
16 recently vaccinated, as the live attenuated vaccine replicates in the host to induce immune
17 response.

18 Considering the 6 cases of CAdV-2, 5 (83.3%) presented co-infection to
19 CAdV-1 and all of them presented lesions in the upper respiratory tract and lungs. The only
20 patient that presented CAdV-2 without the participation of CAdV-1 was a 13-year-old dog
21 that exhibited hemorrhagic diarrhea, vomit, and seizures. He was also positive to CDV and
22 CPV, and the detection of CAdV-2 may have been incidental.

23 Although CAdV-2 is present in attenuated vaccines commercialized in
24 Brazil, and knowing that CAdV-2 produces cross-immunity to CAdV-1 infections (DECARO
25 et al, 2008), the circulation of CAdVs persists high because of the number of young dogs that
26 remain unvaccinated or that are vaccinated inappropriately. Factors as improper storage of the
27 vaccines, application methods, interval between applications, animal stress, and health
28 conditions at the moment of the vaccination should be considered (GREENE, LEVY, 2012).

29 In the present study, the presence of CDV and CPV in single infections was
30 not evaluated. However, the presence of CDV was detected in 11 (57.9%) of the 19 mixed-
31 infections. The immunosuppressive effects of CDV result in the destruction of signaling
32 lymphocytic activation molecule (SLAM) cells, turning the host susceptible to other
33 infections and worsening the patient's condition (BEINEKE et al, 2009). CPV was identified
34 in 6 (31.6%) co-infections, and all of the animals presented pathological findings that are

1 consistent with infectious gastroenteritis. As CPV has a preference for tissues with high
 2 replication rate, it usually affects bone marrow cells, also causing immunosuppression
 3 (GREENE, DECARO, 2012). In fact, concomitant diseases are overall able to depress host
 4 immunity, leaving it increasingly likely to suffer injury and acquire secondary infections that
 5 make their condition even worse (HEADLEY et al, 2013).

6 The presence of antigens along with weak immunity led to injury that
 7 caused death by multiple organ failure. As most of the cases presented mixed infections, and
 8 as it is difficult to know what stage of infection the host is, it is not possible to determine the
 9 origin of each lesion found.

10 The high frequency of CHV, CA₁V-1, and CA₂V-2 infection observed in
 11 this study demonstrates the importance of including these viruses in the laboratory diagnosis
 12 for cases that present clinical disease. The large number of mixed infections gives the
 13 prospect to achieve broader etiological studies with the simultaneous detection of several
 14 microorganisms, particularly in situations where the clinical diagnosis is inconclusive.

5.5 REFERENCES

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrheic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 38, p. 521-526, 2006.

APPEL, M.J. Canine herpesvirus. In: APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores, volume 1**. 1st ed. New York: Elsevier, 1987a. 5-15.

APPEL, M.J. Canine adenovirus type 1 (infectious canine hepatitis virus). In: APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores, volume 1**. 1st ed. New York: Elsevier, 1987b. 29-43.

APPEL, M.J. Canine adenovirus type 2 (infectious laryngotracheitis virus). In: APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores, volume 1**. 1st ed. New York: Elsevier, 1987c. 45-51.

ÁVILA, V.P.F.; ESMERALDINO, A.T.; FALLAVENA, L.C.B.; CÉSARO, C.; RODRIGUES, N.C.; BRAGA, A.C.; CERVA, C. Herpesvírus canino em filhotes da raça Golden Retriever – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 92, p. 52-56, 2011.

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 127, p. 1-18, 2009.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 495-503, 1990.

CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A.; KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.26, p.803–814, 1965.

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. 2012. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf>. Acesso em 26 jan, 2015.

CHVALA, S.; BENETKA, V.; MÖSTL, K.; ZEUGSWETTER, F.; SPERGSER, J.; WEISSENBOCK, H. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 44, p. 508–512, 2007.

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. **Reproduction in Domestic Animals**, Zuchthygiene, v. 44, p. 128–31, 2009.

DAMIÁN, M.; MORALES, E.; SALAS, G.; TRIGO, F.J. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, p. 289–293, 2005.

DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 2895–2908, 2003.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, D.; COLAIANNI, M.L.; LORUSSO, A.; MARI, V.; BUONAVOGLIA, C. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. **Research in Veterinary Science**, London, v. 83, p. 269–273, 2007.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Canine adenoviruses and herpesvirus. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 38, p. 799-814, 2008.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Seroprevalence of parvovirus, adenovirus, coronavirus and canine distemper virus infections in dogs of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p.183-189, 2007.

FORD, R.B. Canine infectious respiratory disease. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. p. 55–65.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; VARELA, A.P.M. *Herpesviridae*. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2nd ed. Santa Maria: UFSM, 2012. p. 503-570.

FRISK, A. L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.

GABRIEL, A.L.; MASUDA, E.K.; RAMOS, A.T.; INKELMANN, M.A.; AZAMBUJA, E.; GRAÇA, D.L. Canine adenovirus type-2 and canine distemper virus pulmonary co-infection in two Chow-Chow puppies with *Candida* sp esophagitis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 47-51, 2008.

GILL, M.; SRINIVAS, J.; MOROZOV, I.; SMITH, J.; ANDERSON, C.; GLOVER, S.; CHAMP, D.; CHU, H.J. Three-year duration of immunity for canine distemper, adenovirus, and parvovirus after vaccination with a multivalent canine vaccine. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Newtown, v. 2, p. 227–234, 2004.

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

GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012b. p. 42–48.

GREENE, C.E.; LEVY, J.K. Immunoprophylaxis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. p. 1163-1205.

GREENE C.E.; DECARO, N. Canine viral enteritis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. p. 67-80.

HEADLEY, S.A.; SHIROTA, K.; BABA, T.; IKEDA, T.; SUKURA, A. Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 46, p. 151–154, 2009.

HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A.; FRITZEN, J. T. T.; GARCIA, J. L.; WEISSENBOCK, H.; SILVA, A. P.; BODNAR, L.; OKANO, W.; ALFIERI, A. F. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 25, n. 1, p. 129-135, 2013.

HEADLEY, S.A.; BODNAR, L.; SILVA, A.P.; ALFIERI, A.F.; GOMES, L.A.; OKANO, W.; ALFIERI, A.A. Canine distemper virus with concomitant infections due to canine herpesvirus-1, canine parvovirus, and canine adenovirus in puppies from Southern Brazil. **Jacobs Journal of Microbiology and Pathology**, Austin, v. 1, n. 2, e-number 015, 2015.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, M. C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J. T. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 5, p. 535-539, 2007.

HU, R.L.; HUANG, G.; QIU, W.; ZHONG, Z.H.; XIA, X.Z.; YIN, Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 25, p. 77–84, 2001.

INKELMANN, M.A.; ROZZA, D.B.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D.; GRAÇA, D.L.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS C.S.L. Hepatite infecciosa canina: 62 casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 325-332, 2007.

KROGENAES, A.; ROOTWELT, V.; LARSEN, S.; SJOBERG, E.K.; AKSELSEN, B.; SKAR, T.M.; MYHRE, S.S.; RENSTROM, L.H.; KLINGEBORN, B.; LUND, A. A serologic study of canine herpesvirus-1 infection in the Norwegian adult dog population. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, p. 153–158, 2012.

KURISSIO, J.K. **Isolamento viral e diagnóstico molecular de herpesvírus canino**. 2013. 72 p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2013.

LEDBETTER, E.C. Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 61, n. 4, p. 193-201, 2013.

LUST, G.; CARMICHAEL, L.E. Suppressed synthesis of viral DNA, protein and mature virions during replication of canine herpesvirus at elevated temperature. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 124, p. 572–580, 1971.

OLIVEIRA, E.C.; SONNE, L.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; TEIXEIRA, E.M.; DEZENGRINI, R.; PAVARINI, S.P.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 636-642, 2009.

OLIVEIRA, E.C.; ALMEIDA, P.R.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P.; WATANABE, T.T.N.; DRIEMEIER, D. Infectious canine hepatitis in naturally infected dogs: pathological findings and immunohistochemical diagnosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 158-164, 2011.

READING, M.J.; FIELD, H.J. Detection of high levels of canine herpesvirus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. **Research in Veterinary Science**, London, v. 66, p. 273–275, 1999.

RONSSSE, V.; VERSTEGEN, J.; THIRY, E.; ONCLIN, K.; AEBERLÉ, C.; BRUNET, S.; POULET, H. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 61–74, 2005.

SANTOS, T.R. **Deteção molecular do herpesvírus canino tipo 1 em cadelas com histórico de desordens reprodutivas no sudeste do Brasil**. 2014. 41 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2014.

SILVA, A.P.; BODNAR, L.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Molecular detection of canine distemper virus (CDV), canine adenovirus A type 1 and 2 (CAV-1 and CAV-2), and canine parvovirus type 2 (CPV-2) in the urine of naturally infected dogs. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 3231-3235, 2014.

STROM HOLST, B.; HAGBERG GUSTAVSOON, H.; GRAPPERON-MATHIS, M.; LILLIEHÖÖK, I.; JAHANNISSON, A.; ISAKSSON, M.; LINDHE, A.; AXNÉR, E. Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 362–365, 2012.

WRIGHT, N.G. Canine adenovirus: its role in renal and ocular disease: a review. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 17, p. 25–33, 1976.

YESILBAG, K.; YALCIN, E.; TUNCER, P.; YILMAZ, Z. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. **Research in Veterinary Science**, London, v. 92, p. 36–39, 2012.

Table 1. Primers used for the detection of canid herpesvirus (CHV), canine adenovirus (CAdV), canine distemper virus (CDV), and canine parvovirus (CPV) in dogs with systemic infections that died from specific and unspecific clinical signs

Virus	Primer	Sequence (5'-3')	Target gene	Amplicon size (bp)	References
CHV	pUp (F)	CCTAAACCTACTTCGGATGA	Glycoprotein B	450	Ronsse et al, 2005
	pDown (R)	GGCTTTAAATGAACTTCTCTGG			
CAdV-1 and CAdV-2	HA1 (F)	CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC	E3	508 and 1,030	Hu et al, 2001
	HA2 (R)	CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT			
CDV	p1 (F)	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	N	287	Frisk et al, 1999
	p2 (R)	CAAGATAACCATGTACGGTGC			
CPV	555for (F) 555rev (R)	CAGGAAGATATCCAGAAGGA GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA	VP2	583	Hong et al, 2007

F (forward); R (reverse). Elaborated by the author.

Table 2. Molecular detection by PCR or RT-PCR of canid herpesvirus (CHV), canine adenovirus type 1 (CAdV-1), and type 2 (CAdV-2) associated or not with canine distemper virus (CDV), and canine parvovirus (CPV) in 28 cases of dogs that died by severe clinical worsening

Virus/Mixed infections	Number of cases
CHV	9
CHV + CAdV-1	2
CHV + CDV	3
CHV + CPV	1
CAdV-1 + CAdV-2	1
CAdV-1 + CDV	3
CAdV-1 + CPV	2
CHV + CAdV-1 + CAdV-2	1
CHV + CAdV-1 + CDV	2
CAdV-1 + CAdV-2 + CDV	1
CAdV-1 + CAdV-2 + CPV	1
CAdV-2 + CDV + CPV	1
CHV + CAdV-1 + CAdV-2 + CDV + CPV	1
TOTAL	28

Elaborated by the author.

Table 3. General information of 18 dogs from two weeks to six months of age that were positive for canid herpesvirus (CHV), canine adenovirus types 1 and 2 (CAAdV-1 and CAAdV-2), canine distemper virus (CDV) and/or canine parvovirus (CPV) by PCR and RT-PCR

Viral infections	Age	Gender Breed	History and clinical signs	Pathological findings
CHV	2 weeks	Male Border Collie	Acute and fatal clinical signs	Pneumonia and pulmonary edema, liver degeneration, acute nephritis, and tonsil hyperplasia
	1 month	Male Mongrel	Presented apathy, loss of appetite, started crying and died the next day	Pulmonary congestion, edema and hemorrhage, splenomegaly, necrotizing hepatitis
	2 months	Female Shih Tzu	Acute and fatal clinical signs	Discrete interstitial pneumonia, pulmonary hemorrhage, and mild enteritis and hepatitis
	3 months	Female Yorkshire	Diarrhea with the presence of worms for one day. Death after administration of vermifuge	Marked diffuse liver fatty degeneration, interstitial pneumonia, occipital with moderate dysplasia, hydrocephalus
CHV CAAdV-1	2 months	Female Shih Tzu	Skin lesions with alopecia and crusts for 17 days. Was under treatment with ketoconazole. Vomit, diarrhea, and pale mucous membranes two days before death. Presented blue eye	Focally extensive pulmonary congestion and edema, moderate hepatic degeneration, moderate focal tubular necrosis in kidneys, severe and diffuse gastroenteritis, lymphoid depletion, moderate multifocal alopecia with crusts
CHV CDV	5 months	Male Mongrel	Apathy and anorexia for 1 day. Increased abdominal volume	Severe and diffuse liver degeneration, pulmonary edema, multifocal petechiae in liver, heart and tonsil, moderate kidney degeneration
CHV CPV	2 months	Female Shih Tzu	Severe hemorrhagic diarrhea	Fibrinous enteritis with significant increase in Peyer's patches, pulmonary congestion, and mild liver degeneration
CAAdV-1 CAAdV-2	3 months	Male Mongrel	Apathy, tiredness, and abdominal distention for one month	Marked hemoperitoneum, hydrothorax, and hydropericardium, hepatomegaly with liver rupture, splenomegaly, moderate interstitial pneumonia, and dilated right cardiomegaly
CAAdV-1 CDV	3 months	Female Mongrel	Anorexia, diarrhea, vomit, icteric mucous membranes, and abdominal pain on palpation for 3 days	Hemoperitoneum, pulmonary congestion, edema and hemorrhage, diaphragm and kidney hemorrhage, splenomegaly, hemorrhagic gastroenteritis, hepatitis
	3 months	Female German Spitz	Acute and fatal clinical signs	Necrotizing bronchitis/bronchiolitis, cerebellar focal and mild spongiosis, moderate liver degeneration, acute tubular necrosis in kidneys, necrosis in spleen and mesenteric lymph node, moderate tonsil hyperplasia
CAAdV-1 CPV	1 month	Female Mongrel	Dark diarrhea and anemia the day before death	Mononuclear meningoencephalitis, myocarditis, severe tonsil and mesenteric lymph node necrosis, mild liver degeneration, and interstitial pneumonia
	2 months	Female Shih Tzu	Diarrhea, vomiting, lethargy and anorexia 2 days. Three young concomitants also showed clinical signs	Moderate fibrinous enteritis, mild liver degeneration, interstitial pneumonia, pulmonary emphysema, and thymic lymphoid hyperplasia
CHV CAAdV-1 CAAdV-2	2 months	Female Chihuahua	Acute and fatal clinical signs	Hepatic and pulmonary congestion and renal hemorrhage
CHV CAAdV-1 CDV	3 weeks	Male Mongrel	Acute and fatal clinical signs. Presented generalized jaundice	Acute and generalized jaundice, hepatic necrosis, diffuse hemorrhagic enteritis, depletion of Peyer's patches, mild interstitial pneumonia and renal hypoplasia
	2 months	Male Labrador Retriever	Diarrhea and seizures for one day. Presented ocular discharge, pale mucous membranes, bilateral otitis, abdominal pustules, muscle tremors, and lateral recumbency	Hydroperitoneum, hydrothorax and hydropericardium, pulmonary edema and focally extensive suppurative and interstitial bronchopneumonia, splenomegaly and splenic depletion, hepatomegaly, hepatic degeneration and necrosis, mild gastritis, acute nephritis and petechiae in bladder
CAAdV-1 CAAdV-2 CDV	3 months	Female German Spitz	Vomit and hemorrhagic diarrhea for one day. Pale mucous membranes and discrete serous ocular discharge	Pneumonia and pulmonary edema, mild colitis, liver degeneration, meningitis
CAAdV-1 CAAdV-2 CPV	6 months	Female Shih Tzu	Presented diarrhea and apathy and died the next day	Red pulmonary hepatization, mild liver degeneration, splenic, kidney, and meningeal congestion, moderate hemorrhagic enteritis
CHV CAAdV-1 CAAdV-2 CDV CPV	4 months	Female Fila Brasileiro	Hemorrhagic diarrhea for 2 days	Severe and diffuse liver degeneration, focally extensive pulmonary congestion and edema, depletion in Peyer's patches, hemorrhagic diarrhea

Table 4. General information of 5 dogs from 10 months to 4 years of age that were positive for canid herpesvirus (CHV), canine adenovirus types 1 and 2 (CAvV-1 and CAvV-2), canine distemper virus (CDV) and/or canine parvovirus (CPV) by PCR and RT-PCR

Viral infections	Age	Gender Breed	History and clinical signs	Pathological findings
CHV	10 months	Female Pinscher	Lateral recumbency, neurological clinical signs, and dyspnea for 3 days, icteric mucous membranes	Moderate multifocal pulmonary congestion with tracheal edema, hydropericardium, liver with jaundice and lobular pattern with gallbladder edema, stomach and intestinal mucous membranes with mild edema
	1 year	Male Mongrel	Tiredness, red spots on the skin, lethargy	Widespread bleeding, diphtheria membrane in tonsils, mild liver degeneration, and severe bronchitis
	2 years	Female Mongrel	Apathy and pelural effusion for 7 days. Presented ocular alterations	Hydroperitoneum, pulmonary edema and congestion, severe hepatic necrosis, kidney hemorrhage, petechiae in bladder, conjunctivitis
	4 years	Male Mongrel	Skin lesions for 3 months, untreated. Presented ocular discharge	Hemorrhagic encephalitis, necrotizing hepatitis, stomach contents in trachea and aspiration pneumonia
CHV CDV	3 years	Male White Swiss Shepherd	Neurological clinical signs after anesthesia to clean perianal fistulae	Cerebellar spongiosis, mild pulmonary edema, liver degeneration

Elaborated by the authors

Table 5. General information of 5 dogs over 8 years of age that were positive for canid herpesvirus (CHV), canine adenovirus types 1 and 2 (CAvV-1 and CAvV-2), canine distemper virus (CDV) and/or canine parvovirus (CPV) by PCR and RT-PCR

Viral infections	Age	Gender Breed	History and clinical signs	Pathological findings
CHV	12 years	Female Mongrel	Presented nodules attached to muscle with slow and progressive evolution in mammary gland for 8 years	Nodules of unknown origin.
CHV CAvV-1	8 years	Male Lhasa Apso	Cough and dyspnea for 2 days, pale oral and ocular mucous membranes, icteric gingival and penile mucous membranes. Clinical history of kidney disease	Chronic interstitial pneumonia, necrohemorrhagic multifocal hepatitis, multifocal moderate lymphoplasmacytic nephritis
CHV CDV	9 years	Male American Staffordshire Terrier	Presented malignant hemorrhagic nodules with rapid evolution near penis, abdomen, limbs, and neck for 2 years	Mild focal pulmonary congestion, liver degeneration, and malignant nodules of unknown origin
CAvV-1 CDV	8 years	Female Pinscher	Dry cough and dyspnea for 7 days. Presented pleural effusion and pancreatic nodule on x-ray	Moderate diffuse pulmonary congestion, mild endocardiosis, lymphadenomegaly, lymphoma with metastasis in liver and kidneys, ovarian hemorrhage
CAvV-2 CDV CPV	13 years	Male Yorkshire	Hemorrhagic diarrhea, vomiting, and seizures	Liver necrosis, bronchopneumonia, diffuse hemorrhagic enteritis

Elaborated by the authors

6 CONCLUSÃO

1 A técnica de PCR detectou CHV, CAdV-1 e CAdV-2 em amostras de cães
2 que apresentavam diagnóstico clínico inconclusivo. A presença destes vírus na população
3 canina foi confirmada através do sequenciamento dos fragmentos genômicos.

4 Os achados patológicos encontrados nos animais do presente estudo
5 correspondem às lesões típicas descritas na literatura pelas infecções por CHV, CAdV-1 e
6 CAdV-2. Apesar de os animais não apresentarem diagnóstico clínico conclusivo antes de irem
7 a óbito, o histórico dos pacientes condiz com as infecções virais encontradas e com os
8 achados de patologia.

9 A presença dos vírus imunossupressores CDV e CPV foi detectada em 11 e 6
10 animais respectivamente. A participação destes vírus nas co-infecções deixou os animais
11 acometidos mais susceptíveis a outras doenças infecciosas.

12 Os 19 casos de infecções mistas (CHV, CAdV-1, CAdV-2, CDV e CPV)
13 mostraram a importância destas associações virais, que agravaram os sinais clínicos dos
14 pacientes, conduzindo-os a um quadro fatal.

15 A ocorrência de 9 casos (4 filhotes e 5 adultos/idosos) de herpesvirose em
16 infecção singular confirma a circulação deste vírus na população canina e sua importância em
17 casos de primo-infecção e nos casos de reativação das infecções latentes.

18 A herpesvirose canina deve ser considerada como diagnóstico diferencial
19 durante atendimento clínico, já que o baixo número de estudos sobre o assunto e a ausência de
20 vacina no Brasil podem estabelecer uma falsa percepção de que a doença é pouco prevalente
21 no país.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Lista de reagentes

1. Acetona P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
2. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
3. Ácido etilenodiaminotetraácido sal dissódico (EDTA) P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{NA}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen®)
4. Agarose (Gibco BRL®)
5. Água dietil pirocarbonato (DEPC) (Invitrogen Life Technologies®)
6. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear®)
7. Azul de bromofenol (Sigma®)
8. Brometo de etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma®)
9. Buffer PCR 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies®)
10. Cloreto de potássio (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
11. Cloreto de sódio (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
12. Conjunto dNTP 100 mM, 4 x 250 mL; 25 mmol de cada (100 mM das soluções dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen Life Technologies®)
13. Dodecil sulfato de sódio (SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NAO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (BDH)
14. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies®)
15. Fosfato de sódio dibásico anidro (NA_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth®)
16. Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
17. Hidroximetil amino metano TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
18. Isotiocianato de guanidina (Invitrogen Life Technologies®)
19. Kit de purificação *Purelink Quick Gel Extraction* (Invitrogen Life technologies®)
20. Kit de quantificação *Quant-iT™* (Invitrogen Life technologies®)
21. Kit de sequenciamento *BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®)
22. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Invitrogen Life Technologies®)
23. Padrão molecular DNA 123 bp (Invitrogen Life Technologies®)
24. Polimerase recombinante Platinum Taq DNA (500 unidades) (Invitrogen Life Technologies®)
25. Proteinase K (Gibco BRL®)

26. Sacarose/sucrose P.A. ($C_{12}H_{22}O_{11}$) P.M. 342.31 (Reagen®)
27. Sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (SIGMA®)
28. Transcriptase reversa M-MLV (200 unidades) (Invitrogen Life Technologies®)
29. Triton x-100 (J.T. Baker®)

APÊNDICE B

Soluções e tampões

PBS (pH 7,2)

- 2 g NaCl
- 0,05 g KCl
- 0,355 g Na_2HPO_4
- 0,068 g KH_2PO_4
- Água bidestilada qsp. 250 mL

Tampão de corrida TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x (pH 8,4)

- 0,89 M TRIS
- 0,89 M ácido bórico
- 0,02 M EDTA 0,2 M pH 8,0
- Água bidestilada qsp. 1 L

Tampão de amostra

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose-sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 45%

SDS 10%

- 5 g SDS
- Água bidestilada qsp. 50 mL

Sílica hidratada

- 60 g de sílica (SIGMA®)
- Adicionar 500 mL de água bidestilada
- Homogeneizar e deixar em repouso por 24 horas
- Desprezar 430 mL do sobrenadante por sucção
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Permanecer em repouso durante 5 horas
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 μL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)

- Aliquotar e autoclavar

Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

- 25 mL fenol saturado
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

Solução L6

- 120 g de isotiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton x 100

Solução L2

- 120 g de isotiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

APÊNDICE C

Protocolos e técnicas

Extração de ácidos nucleicos pelo método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico/sílica/isotiocianato de guanidina

1. Macerar os 100 µg do órgão em microtubo de 1,5 mL
2. Adicionar 500 µL de PBS
3. Homogeneizar em vórtex
4. Centrifugar a 1000 rpm por 5 min
5. Recolher o sobrenadante e guardar o macerado a -80°C
6. Adicionar 10 µL de proteinase K
7. Adicionar 50 µL de SDS 10%
8. Homogeneizar em vórtex
9. Incubar a 56°C por 30 min
10. Centrifugar a 13000 rpm por 30 s
11. Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico
12. Homogeneizar em vórtex
13. Incubar a 56°C por 20 min
14. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min
15. Recolher o sobrenadante e descartar o restante em recipiente específico
16. Adicionar 25 µL de sílica hidratada
17. Adicionar 500 µL de solução L6
18. Homogeneizar em vórtex
19. Agitar durante 30 min em temperatura ambiente
20. Centrifugar a 13000 rpm durante 30 s
21. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
22. Adicionar 500 µL de solução L2
23. Homogeneizar em vórtex
24. Centrifugar a 13000 rpm durante 30 s
25. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
26. Repetir as etapas 22 a 25
27. Adicionar 1 mL de etanol 70%
28. Homogeneizar em vórtex

29. Centrifugar a 13000 rpm durante 30 s
30. Desprezar sobrenadante
31. Repetir as etapas 27 a 30
32. Adicionar 1 mL de acetona PA
33. Homogeneizar em vórtex
34. Centrifugar a 13000 rpm durante 30 s
35. Desprezar sobrenadante
36. Secar o *pellet* em termobloco a 56°C
37. Adicionar 50 µL de água Milli-Q autoclavada
38. Homogeneizar em vórtex
39. Incubar em termobloco a 56°C por 15 min
40. Homogeneizar em vórtex
41. Centrifugar a 13000 rpm durante 4 min
42. Recolher sobrenadante e guardar a 4°C para uso imediato ou -20°C para armazenamento

PCR para glicoproteína B de CHV

- 1x PCR buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 2,5 mM MgCl₂
- 1,6 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 2,5 µL de cDNA
- Água q.s.p. 25 µL

Programa: 94°C/3 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 49°C/30 s (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/10 min (extensão final).

PCR para gene E de CadV

- 1x PCR buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3,1 mM MgCl₂
- 1,6 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 2,5 µL de cDNA
- Água q.s.p. 25 µL

Programa: 94°C/3 min (desnaturação inicial); 32 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 58°C/1 min (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/5 min (extensão final).

PCR para VP2 de CPV

- 1x PCR buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3,1 mM MgCl₂
- 0,8 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 3 µL de cDNA
- Água q.s.p. 25 µL

Programa: 94°C/10 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C/30 s (desnaturação), 50°C/1 min (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/10 min (extensão final).

RT-PCR para gene N de CDV

Desnaturação

- 9 µL do RNA extraído
- 20 pmol do primer *forward*

Programa: 70°C por 10 min e banho de gelo por 5 min

Transcrição reversa

- 1x RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 1,3 mM de cada dNTP
- 0,1 M de DTT
- 50 unidades de transcriptase reversa M-MLV

Programa: 37°C/50 min; 70°C/15 min.

PCR

- 1x PCR buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3 mM MgCl₂
- 0,8 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 5 µL de cDNA

- Água q.s.p. 50 µL

Programa: 94°C/1 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de 94°C/1 min (desnaturação), 59,5°C/1 min (anelamento) e 72°C/1 min (extensão); 72°C/5 min (extensão final).

Gel de agarose a 2%

- 1 g de agarose

- 50 mL buffer TBE

- 25 µL de brometo de etídio

Purificação de produto de PCR excisado do gel

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL
2. Adicionar 10 µL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel
3. Incubar o microtubo a 60°C por 15 min, homogeneizando a cada 3 min
4. Centrifugar a 14000 rpm por 30 s
5. Transferir 600 µL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um microtubo coletor com coluna
6. Incubar a temperatura ambiente por 1 min
7. Centrifugar a 14000 rpm por 2 min
8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo microtubo
9. Adicionar 500 µL do *Wash buufer type 1* na coluna com microtubo coletor
10. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer type 6*
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min
14. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min
15. Estocar o DNA purificado em -20°C

Quantificação de produto de PCR

1. Preparar a solução *Quant-iT™ Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT™* no *Quant-iT™ Buffer* (1:200)
2. Homogeneizar em vórtex

3. No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 2 μL do DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 0
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 100
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2 a 3 s
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
8. Realizar a leitura utilizando fluorômetro *QubitTM* (Invitrogen Life TechnologiesTM)
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

APÊNDICE DLista de *softwares*

- Eletroferogram quality analysis – Phred e CAP3

(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>)

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

- MEGA package software version 6

(<http://www.megasoftware.net/mega.php>)