

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE  
PARVOVÍRUS CANINO**

**Autor: Jéssica dos Reis Antunes**

**Porto Alegre**

**2013**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE  
PARVOVÍRUS CANINO**

**Autor: Jéssica dos Reis Antunes**

**Trabalho apresentado como  
requisito parcial para graduação  
em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal**  
**Co-orientadora: M.V. Msc. Luciane Dubina Pinto**

**Porto Alegre**  
**2013**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul por fornecer uma formação de qualidade através de um ensino gratuito.

À Luciane Dubina Pinto, minha co-orientadora, pela amizade, pela compreensão, pela eterna paciência e ajuda, assim como por todo o conhecimento que me foi oferecido.

Ao Professor Cláudio Wageck Canal, pela oportunidade, orientação e confiança depositada em mim.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS, por toda experiência e aprendizagem desenvolvidos, em especial à Renata da Fontoura Budaszewski.

A todos os meus amigos, em especial minha amiga Djasmini, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo.

Ao meu irmão, Jonathan, que sempre me ajuda nos trabalhos, e nos momentos de diversão.

A todas as pessoas que contribuíram de uma forma ou de outra para a minha conquista.

Aos meus pais, Jorge e Rosane, pelo amor, carinho e confiança que sempre me dedicaram; pelo apoio na busca e, principalmente, realização dos meus sonhos, assim como, pela oportunidade de realização profissional.

## RESUMO

As doenças gastrentéricas compõem grande parte da casuística da clínica médica de pequenos animais, cujos sinais clínicos típicos são vômito e diarreia. As enterites virais são uma das causas mais comuns, acometendo cães jovens. Estes vírus possuem frequências elevadas e grande resistência no meio ambiente, além de apresentarem altas taxas de morbidade e mortalidade. O parvovírus canino (CPV) é uma das principais causas de diarreia e mortalidade em cães jovens. Em 1978, surgiu o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) do gênero *Parvovirus*, que sofreu, posteriormente, alterações genéticas que originaram os tipos CPV-2a e CPV-2b, e ainda, recentemente, uma terceira variante denominada CPV-2c. A principal forma de controlar a doença é através da vacinação, contudo, a circulação de diferentes tipos antigênicos pode comprometer a sua eficiência. O presente trabalho teve a finalidade de identificar os tipos antigênicos predominantes (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c) que circulam em cães de distintas regiões do Brasil, e realizar seu diagnóstico diferencial de CAV-1, CCoV e CRV. Para isto, foram analisadas 144 amostras coletadas em 20 municípios do Rio Grande do Sul e de outros Estados da Federação, no período entre abril de 2009 e julho de 2010. As amostras coletadas foram fezes ou suabes retais de cães que apresentavam ou não gastroenterite hemorrágica (GEH), com idade entre um mês e um ano, de ambos os sexos, raças distintas e com histórico ou não de vacinação. Para detecção do CPV-2 e CAV, foi realizada extração do DNA total através de kit comercial a base de sílica e amplificação por PCR, seguida de eletroforese em gel de agarose 2%. Para a detecção de CCoV e CRV foi realizada extração de RNA por TRIzol® LS, a transcrição reversa para obtenção do cDNA (DNA complementar), amplificação por PCR e eletroforese em gel de agarose 2%. O produto da PCR do CPV-2 foi sequenciado e comparado com sequências disponíveis em bancos de dados de genes. Os resultados demonstraram 29,2 % de positividade para CPV-2. De todos os cães analisados, 38,8 % apresentavam GEH e, entre os positivos, 71,4 % possuíam este sintoma. Dos 42 positivos na PCR, 78,6 % foram do tipo 2c, 19 % do tipo 2b e 2,4 % do tipo 2a. Os resultados do diagnóstico diferencial demonstraram que vários animais possuíam coinfeções, de dois ou mais agentes. Conclui-se que CPV-2 foi o mais importante agente etiológico de GEH em cães, e que a identificação dos tipos de CPV-2 no Brasil é importante para que ocorra o monitoramento de sua disseminação e surtos da doença, contribuindo, para sua epidemiologia.

Palavras chaves: enterite, parvovírus canino, diagnóstico diferencial, detecção, caracterização.

## ABSTRACT

Gastroenteric diseases make up much of the series of small animal internal medicine, whose typical clinical signs are vomiting and diarrhea. The viral enteritis is a common cause affecting young dogs. These viruses have high frequency and high resistance in the environment, in addition to having high rates of morbidity and mortality. Canine parvovirus (CPV) is a leading cause of diarrhea and mortality in young dogs. In 1978 came the canine parvovirus type 2 (CPV-2) of the genus Parvovirus, who suffered later genetic changes that led to the types CPV-2a and CPV-2b, and, recently, a third variant called CPV-2c. The main way to control the disease is through vaccination, however, the movement of different antigenic types may compromise its effectiveness. This study aimed to identify the predominant antigenic types (CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c) that circulate in dogs from different regions of Brazil, and perform differential diagnosis of CAV-1, CCoV and CRV. For this, we analyzed 144 samples collected in 20 municipalities of Rio Grande do Sul and other Brazilian states in the period between April 2009 and July 2010. The samples were collected feces or rectal swabs from dogs that had not gastroenteritis or hemorrhagic (GEH), aged between one month and one year, of both sexes, different races and with a history of vaccination or not. For detection of CPV-2 and CAV was performed by extraction of total DNA from commercial kit based on silica and PCR amplification followed by electrophoresis on 2% agarose gel. For detection of CCoV and CRV, RNA extraction was performed by TRIzol<sup>®</sup> LS reverse transcription to obtain a cDNA (complementary DNA), PCR amplification and electrophoresis on 2 % agarose gel. The PCR product of CPV-2 was sequenced and compared with sequences available in gene databases. The results showed 29.2 % positivity for CPV-2. Of all the dogs examined, 38.8 % had GEH and, among positive, 71.4 % had this symptom. Of the 42 positive PCR, 78.6 % were type 2c, 19 % type 2b and 2.4 % of type 2a. The results demonstrated that differential diagnosis of various animals had co-infections of two or more agents. It is concluded that CPV-2 was the most important etiological agent of GEH in dogs, and that the identification of the types of CPV-2 in Brazil is important for monitoring the occurrence of its spread and outbreaks of disease, contributing to its epidemiology.

**Keywords:** enteritis, canine parvovirus, differential diagnosis, detection, characterization.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 – Visualização dos produtos da PCR. .... 36

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Resultados da detecção do parvovírus tipo 2 em amostras de fezes caninas.....	36
Tabela 2 – Resultados da caracterização do parvovírus tipo 2 em amostras de fezes caninas.	37
Tabela 3 – Resultados da detecção dos vírus para diagnóstico diferencial .....	40
Tabela 4 – Resultados das coinfeções .....	40

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ALT	Alanina aminotransferase
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
CAV-1	Adenovírus canino tipo 1
CAV-2	Adenovírus canino tipo 2
CCoV	Coronavírus canino
CID	Coagulação intravascular disseminada
CnMV	Vírus minuto canino
CPV	Parvovírus canino
CPV-2	Parvovírus canino tipo 2
CPV-2a	Parvovírus canino tipo 2a
CPV-2b	Parvovírus canino tipo 2b
CPV-2c	Parvovírus canino tipo 2c
CRV	Rotavírus canino
CRFK	Linhagem de células de rim de felino
dATP	Desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	Desoxicidina trifosfatada
dGTP	Desoxiguanosina trifosfatada
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio Imuno Enzimático
FPLV	Vírus da panleucopenia felina
g	Gramas
GEH	Gastroenterite hemorrágica
Glu	Ácido glutâmico
HA	Hemaglutinação
HCl	Ácido clorídrico
HI	Inibição da Hemaglutinação
HIC	Hepatite Infeciosa Canina



ICQ	Imunocitoquímica
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ICH	Imunohistoquímica
IFA	Imunofluorescência
IM	Intramuscular
IPX	Imunoperoxidase
IV	Intravenoso
Kb	Quilobases
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
ME	Microscopia Eletrônica
mEq	Miliequivalente
MEV	Vírus da enterite dos visons
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Nm	Nanómetro
ORFs	<i>Open reading frames</i>
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PB	Pares de base
PBS	Tampão salino de fosfato ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Pós-infecção
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase
SC	Subcutâneo
TFR	<i>Canine transferrin receptor</i>
U	Unidade
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VP2	Proteína viral 2

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Parvovírus canino</b>	<b>13</b>
2.1.1	Etiologia	13
2.1.2	Epidemiologia	14
2.1.3	Patogenia	15
2.1.4	Sinais Clínicos	16
2.1.5	Lesões	18
2.1.6	Diagnóstico	18
2.1.7	Tratamento	20
2.1.8	Prevenção e Controle	22
<b>2.2</b>	<b>Adenovírus canino tipo 1</b>	<b>23</b>
2.2.1	Etiologia	23
2.2.2	Epidemiologia	24
2.2.3	Patogenia	24
2.2.4	Sinais Clínicos	24
2.2.5	Lesões	25
2.2.6	Diagnóstico	25
2.2.7	Tratamento	26
2.2.8	Prevenção e Controle	26
<b>2.3</b>	<b>Coronavírus canino</b>	<b>26</b>
2.3.1	Etiologia	26
2.3.2	Epidemiologia	27
2.3.3	Patogenia	27
2.3.4	Sinais Clínicos	28
2.3.5	Lesões	28
2.3.6	Diagnóstico	29
2.3.7	Tratamento	29
2.3.8	Prevenção e Controle	29
<b>2.4</b>	<b>Rotavírus canino</b>	<b>30</b>
2.4.1	Etiologia	30
2.4.2	Epidemiologia	31

2.4.3 Patogenia.....	31
2.4.4 Sinais Clínicos.....	31
2.4.5 Lesões.....	32
2.4.6 Diagnóstico.....	32
2.4.7 Tratamento.....	32
2.4.8 Prevenção e Controle.....	33
<b>3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS</b>	
<b>    CANINO TIPO 2 NO BRASIL.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Amostras.....	34
3.1.2 Extração do DNA.....	34
3.1.3 Amplificação do DNA.....	34
3.1.4 Sequenciamento do DNA.....	35
<b>3.2 Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>39</b>
4.1.1 Amostras.....	39
4.1.2 Extração do DNA.....	39
4.1.3 Extração do RNA.....	39
4.1.4 Amplificação do DNA.....	39
4.1.5 Amplificação do RNA.....	40
<b>4.2 Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
REFERÊNCIAS.....	44

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças gastroentéricas compõem grande parte da casuística da clínica médica de pequenos animais, cujos sinais clínicos são evidenciados através de vômitos e diarreias (BURROWS; BATT; SHERDING, 1997). As enterites virais são consideradas uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em cães com menos de seis meses de idade (TAMS, 2005). Sabe-se que estes vírus realizam uma ação destrutiva no epitélio entérico, pois o rotavírus, o parvovírus e o coronavírus são enterotrópicos, sendo que o rotavírus e o coronavírus invadem o ápice e a porção medial das vilosidades, respectivamente, enquanto que o parvovírus promove a destruição total das criptas e das vilosidades intestinais (MURPHY et al., 1999).

A parvovirose é uma doença infectocontagiosa muito diagnosticada em cães domésticos (APPEL et al., 1979; MORAES; COSTA, 2007), possuindo uma elevada frequência aliada à grande resistência ao meio ambiente, se destacando, dentre as demais, por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade (OTTO et al., 2001). O CPV foi primeiramente isolado em 1978 e, desde então, deu origem a novos tipos antigênicos que se difundiram na população de cães (APPEL et al., 1979; MORAES; COSTA, 2007). Com o tempo, o vírus original foi sendo substituído pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b, e mais recentemente, pela CPV-2c (DECARO, 2008).

Assim como outros vírus entéricos, o parvovírus é transmitido pela eliminação fecal, sendo a via de contaminação oronasal. A ocorrência de surtos de enterite pelo parvovírus canino em canis sugere que o transporte por pessoas ou fômites contribui para a disseminação da infecção. Acredita-se que a disseminação da doença se dá muito mais pela persistência do vírus no meio ambiente do que pelos portadores assintomáticos. A eliminação ativa do vírus nas fezes parece estar limitada às primeiras duas semanas pós-infecção, entretanto, existem evidências que alguns cães podem eliminar o vírus periodicamente por mais de um ano (McCAW; HOSKINS, 2006). Nas populações suscetíveis, alguns animais adultos fazem soroconversão sem manifestar sinais, indicando que é comum a infecção branda ou inaparente, enquanto que a enterite pode se disseminar rapidamente pelos animais mais jovens (HOSKINS, 2004). O parvovírus canino é um patógeno de grande importância em medicina veterinária e propriedades únicas o tornam um agente emergente e reemergente em todo o mundo (BUONAVOGLIA et al., 2001; DECARO et al., 2007a).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Parvovírus Canino

#### 2.1.1 Etiologia

O CPV pertence à família *Parvoviridae* e caracteriza-se por ser um vírus pequeno (20 a 25 nm), esférico, sem envelope, com capsídeo icosaédrico composto por 60 capsômeros, possuindo uma molécula de DNA linear de fita simples como genoma. Os parvovírus possuem somente quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes (*open reading frames* – ORFs) sobrepostas no genoma de cinco quilobases (kb). Este apresenta de seis a dez sequências palindrômicas que possibilitam a formação de estruturas em forma de grampo nas regiões terminais, sendo essenciais para a replicação do genoma viral e para sua encapsidação. A sua predileção por células na fase S do ciclo celular faz com que afetem, preferencialmente, órgãos que apresentam células em multiplicação, como, por exemplo, os da medula óssea, embrionárias e das criptas intestinais (MORAES; COSTA, 2007). São extremamente resistentes no ambiente, sendo estáveis na presença de pH entre 3,0 e 9,0, à inativação à temperatura de 56 °C por 60 minutos, podendo manter sua infectividade durante meses em determinadas condições, sendo relativamente resistentes aos desinfetantes, pois são vírus não envelopados (MARULAPPA; KAPIL, 2009).

A parvovirose canina foi descrita no final da década de 1970, disseminando-se com muita rapidez por vários países (APPEL et al., 1979; GAGNON; POVEY, 1979). O parvovírus que circulava na população de cães, até aquele momento, era o vírus minuto dos cães (CnMV) (GREENWOOD et al., 1995), pertencente ao gênero *Bocavirus*. O CnMV foi descoberto em 1970 como um vírus apatogênico, porém estudos recentes demonstraram que pode causar reabsorção fetal e abortamento em cadelas (POLLOCK; COYNE, 1993; PARRISH, 1994). Em 1978, surgiu o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) do gênero *Parvovirus*, que sofreu, posteriormente, alterações genéticas que originaram os tipos CPV-2a e CPV-2b. As diferenças entre esses dois tipos são mínimas, o que confere uma boa proteção cruzada (MORAIS; COSTA, 2007). No Brasil, foram relatados casos de infecção pelo CPV-2 a partir de 1980 (HAGIWARA, 1980; DURIGON et al., 1987; MOOJEN et al., 1992).

De acordo com as pesquisas efetuadas ao longo dos anos, observou-se que o CPV-2 apresentava características antigênicas e genéticas semelhantes às do vírus da panleucopenia felina (FPLV) e as do vírus da enterite dos visons (MEV) (LENGHAUS; STUDDERT, 1980;

McMASTER et al., 1981; TRUYEN; PARRISH, 1992; GREENWOOD et al., 1995). A origem do CPV-2 tem como hipótese mais provável que o vírus da FPLV (vírus da panleucopenia felina), que difere do CPV em dois aminoácidos da proteína VP2, sofreu estas mutações que permitiram a utilização do receptor da transferrina (TfR) presente em células de cães, estabelecendo o CPV como um novo patógeno dessa espécie (PARRISH, 1999; TRUYEN, 1999; MORAIS; COSTA, 2007). A proteína VP2, além de ser o sítio de ligação ao receptor, confere ao vírus a propriedade hemaglutinante e contém os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (LOPEZ de TURIZO et al., 1991). Com o tempo, o CPV-2 foi sendo substituído, na população canina, pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b (PRATELLI et al., 2001).

O CPV-2 é diferenciado dos outros pelo uso de anticorpos monoclonais específicos, sendo que sua replicação pode ocorrer em células felinas *in vitro*, mas não *in vivo* (TRUYEN, 2006; PARRISH, 1992). Em contraste, as novas variantes antigênicas replicam-se em gatos e, em infecções experimentais, podem induzir doença clínica (TRUYEN et al., 1996). Uma terceira variante do CPV, cuja primeira denominação foi mutante Glu-426 e subsequentemente renomeada para CPV-2c, foi detectada na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001). A cepa 2c diferencia-se da 2a e 2b por apresentar na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo, uma substituição dos aminoácidos Asn e Asp pelo Glu (HONG et al., 2007).

A nova variante foi detectada em muitos países como no Vietnã (NAKAMURA et al., 2004), Espanha (DECARO et al., 2006b), Uruguai (PÉREZ et al., 2007) e Brasil (STRECK et al., 2009).

### 2.1.2 Epidemiologia

Desde sua descoberta, a parvovirose gerou altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo sua gravidade inicialmente atribuída à falta de imunidade natural da população canina contra o vírus. A vacinação e a resistência natural contra a doença deveriam conferir maior proteção aos cães, entretanto, a alta incidência da infecção se mantém em animais com idade entre seis semanas e seis meses (MORAIS; COSTA, 2007). Os filhotes são mais propensos ao desenvolvimento da gastroenterite hemorrágica pelo CPV, porém cães de qualquer idade, gênero ou raça podem ser acometidos (PARRISH, 1999; McCANDLISH, 2001; MORAIS; COSTA, 2007). Algumas raças de cães de médio e grande porte, como Doberman, Labrador, Pastor Alemão, Pit Bull e Rottweiler, podem ser mais suscetíveis e vir a desenvolver uma

doença mais grave quando infectados (NELSON; COUTO, 2006; MORAIS; COSTA, 2007). Nas populações suscetíveis, alguns animais adultos fazem soroconversão sem manifestar sinais, indicando que é comum a infecção branda ou inaparente, enquanto que a enterite pode se disseminar rapidamente pelos animais mais jovens (HOSKINS, 2004).

A estabilidade do CPV no ambiente do canil e a excreção de grandes quantidades de vírus por animais doentes podem expor filhotes suscetíveis a doses infecciosas maciças do agente. Esta janela de susceptibilidade imunológica coincide com o desmame nos filhotes, que ocorre na faixa etária de seis a oito semanas de idade (MARULAPPA; KAPIL, 2009). Antes das seis semanas de idade, normalmente, os filhotes encontram-se protegidos contra a infecção através dos anticorpos maternos. O vírus é extremamente resistente, sobrevivendo nas fezes, em temperatura ambiente, por mais de um ano e em solo contaminado por cinco meses (GORDON; ANGRICK, 1986). A baixa dose de vírus necessária para o estabelecimento de uma infecção e a facilidade na transferência mecânica do vírus são fatores importantes para a disseminação da infecção. Além disso, o CPV-2 é resistente a muitos detergentes e desinfetantes. O período de incubação do CPV-2 é de 7 a 14 dias, embora com as variantes CPV-2a e CPV-2b este pode ser tão curto como 4 a 6 dias (GREENE, 2006). Os vírus são excretados pelas fezes, vômito, urina, saliva e sangue, e pode ser detectado no intestino e nas fezes de animais infectados em qualquer estágio da doença. As variantes antigênicas do CPV-2 demonstraram ser eliminadas nas fezes em títulos mais elevados que os observados para o tipo CPV-2 original (DESARIO et al., 2005).

### 2.1.3 Patogenia

Estudos de infecção experimental em filhotes de cães mostraram que a infecção natural ocorre pela via oral, com replicação inicial do vírus nos tecidos linfóides da orofaringe dois dias após infecção (PI). A seguir, uma intensa viremia é observada em até cinco dias PI, disseminando o vírus para outros tecidos: medula óssea, tecido linfóide e intestino delgado (MACARTNEY et al., 1984a; McCANDLISH, 2001). Como facilitadores da transmissão viral, há também a participação do homem, roedores e insetos (HOSKINS, 1997). A infecção, portanto, ocorre por exposição oronasal às fezes, fômites ou ambientes contaminados (MORAES; COSTA, 2007). Porém, a infecção experimental também pode ser produzida por várias vias, incluindo oral, nasal ou oronasal e pela inoculação IM, IV ou SC. A excreção do vírus nas fezes inicia no terceiro ou quarto dia após a infecção, sendo excretado em grandes quantidades por até 20 dias e seu término está, provavelmente, relacionado com o

desenvolvimento de imunidade (MORAES; COSTA, 2007). Entretanto, existem evidências que alguns cães podem eliminar o vírus periodicamente por mais de um ano.

Pereira et al. (2000) identificaram, em amostras de fezes caninas, os tipos de CPV presentes em várias regiões do Brasil. As amostras foram coletadas de cães com sintomatologia para parvovirose nos anos de 1980-1986 e 1990-1995 e testadas através da PCR. A cepa predominante na década de 80 foi CPV-2a e na década de 90 CPV-2b.

A terceira variante CPV-2c, foi descoberta na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001), apresentando um alto fator de disseminação entre a população canina, daquele país (DECARO et al., 2006), e em outros países europeus, como também na Ásia (NAKAMURA et al., 2004) e nas Américas (HONG et al., 2007; KAPIL et al., 2007; PÉREZ et al., 2007; STRECK et al., 2009).

Embora os primeiros relatos mostrassem uma baixa patogenicidade do CPV-2c, dados experimentais e observações a campo indicaram, atualmente, um curso clínico mais grave e maiores taxas de mortalidade, bem como a capacidade de infectar e causar doença em cães adultos, mesmo adequadamente vacinados (DECARO et al., 2008).

As vacinas comerciais atualmente no mercado são constituídas por cepas 2 e 2b, não existindo nenhuma vacina com o tipo 2c (MARULAPPA; KAPIL, 2009). Contudo, as pesquisas divergem sobre a proteção dessas vacinas frente ao desafio com o tipo 2c (BUONAVOGLIA et al., 2001; NAKAMURA et al., 2004; HONG et al., 2007; KAPIL et al., 2007; PÉREZ et al., 2007).

#### 2.1.4 Sinais clínicos

Duas síndromes clínicas são descritas em cães acometidos por CPV: a miocardite e a gastroenterite hemorrágica (GEH). A miocardite pode ocorrer em cães recém-nascidos que tiveram infecção intrauterina ou em suas primeiras semanas de vida. Esses animais apresentam morte súbita ou sintomas inespecíficos, desenvolvendo sinais de insuficiência cardíaca. A miocardite ocorreu, com maior frequência, quando foram relatados os primeiros surtos de parvovirose no final dos anos 1970. Com o aumento da prevalência de anticorpos caninos contra o CPV, nos dias atuais, essa manifestação é considerada muito rara. A evolução clínica após a exposição ao CPV depende, em grande parte, do grau de imunidade materna, virulência da cepa viral, dose infectante do vírus e da defesa imunológica do hospedeiro (HOMEM et al., 1999; TAMS, 2005; NELSON; COUTO, 2006).



A principal manifestação da parvovirose canina é a gastroenterite (MORAES; COSTA, 2007). A diarreia apresenta-se de diferentes formas, onde são identificadas fezes de cor amarelada, hemorrágicas ou com estrias de sangue, ocorrendo, em alguns casos, ausência deste. A consistência pode variar de pastosa a levemente fluida, caracterizando-se por apresentar um odor desagradável (APPEL et al., 1979; McCANDLISH, 2001). A perda do epitélio intestinal permite a penetração de bactérias e outros agentes na circulação sanguínea, podendo contribuir para o agravamento dos sinais clínicos. O vômito é, normalmente, um achado predominante e pode ser grave o suficiente para causar esofagite. A apresentação típica da GEH ocorre, geralmente, em cães jovens não vacinados, apresentando uma acentuada desidratação com a progressão dos sinais clínicos (CARMICHAEL, 2005; DECARO et al., 2005; KOCATURK et al., 2010).

Animais infectados demonstram, no hemograma, leucopenia, neutropenia e linfopenia, podendo ocorrer leucocitose na fase de recuperação. A anemia é justificada pela perda de sangue intestinal e o hematócrito elevado é resultante da desidratação (DECARO et al., 2005; MORAES; COSTA, 2007; KOCATURK et al., 2010). Os níveis de ureia e creatinina aumentados são consequência da oligúria e azotemia pré-renal (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). A hipoalbuminemia e anormalidades eletrolíticas como hiponatremia, hipocalemia e hipocloremia são vistas em 25-33 % dos cães. A enzima alanina aminotransferase (ALT) encontra-se elevada em aproximadamente 25 % dos cães e anormalidades acidobásicas podem ser vistas em cães severamente afetados, geralmente sugestivos de acidose metabólica (STROMBECK; GUILFORD, 1991). Alterações na temperatura retal, como hipertermia, podem ser observadas em decorrência da própria infecção viral ou bacteriana, porém, devido à evolução rápida da doença alguns cães apresentam hipotermia, septicemia e coagulação intravascular disseminada (CID), sinais terminais em pacientes em choque endotóxico (HOSKINS, 2004; KOCATURK, et al., 2010). Os sinais clínicos de choque inicialmente são: pulso normal ou fraco, palidez das mucosas, tempo de preenchimento capilar aumentado, hipotensão, nível de consciência reduzido e temperatura corporal baixa. Os animais não tratados adequadamente nesse estágio evoluem para um nível terminal, apresentando bradicardia, mucosas pálidas e cianóticas, hipotensão grave, anúria, estupor ou coma. Nessa situação, a parada cardíaca e respiratória são eminentes, levando os animais a óbito (MORAES; COSTA, 2007).

A recuperação da doença pode ser surpreendentemente rápida, mas pode levar de sete a dez dias ou mais nos animais gravemente afetados, o que exige tratamento intensivo (McCANDLISH, 2001).

### 2.1.5 Lesões

As lesões no intestino causadas pelo CPV-2 são variáveis e inespecíficas, apresentando-se mais acentuadas na parte distal do duodeno, posteriormente atingindo o jejuno, ocorrendo o aumento e depressão das placas de Peyer (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; OLIVEIRA et al., 2009). As lesões variam de leves a graves, com as alças intestinais apresentando a camada serosa de aspecto hemorrágico, coberta ou não por fibrina. A congestão da subserosa e o edema na camada mucosa espessam a parede intestinal (OLIVEIRA et al., 2009). O lúmen intestinal pode apresentar-se vazio ou com conteúdo fluido hemorrágico ou de coloração amarela. Os linfonodos mesentéricos encontram-se aumentados e edemaciados com hemorragia multifocal em petéquias no córtex (HAGIWARA, 1980; APPEL; PARRISH, 1987; OLIVEIRA et al., 2009).

Oliveira et al. (2009) relataram que, durante a necropsia de filhotes de cães, além das lesões citadas anteriormente, também foram encontrados atrofia do timo e esplenomegalia. Na medula óssea, pode-se observar necrose e depleção das células germinativas e células maduras das séries mielóide e eritróide, seguida de hipoplasia regenerativa durante a fase de recuperação (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; OLIVEIRA et al., 2009).

### 2.1.6 Diagnóstico

Uma infecção por CPV-2 deve ser colocada como um dos diagnósticos diferenciais na presença de um cão com diarreia hemorrágica e com menos de dois anos de idade, sem vacinas. Contudo, existem infecções bacterianas que provocam a mesma sintomatologia que a descrita para a infecção por CPV-2. Como se trata de uma doença de caráter infectocontagioso, o diagnóstico rápido e precoce da parvovirose canina torna-se essencial para evitar a disseminação da doença (VIEIRA et al., 2008). O diagnóstico presuntivo, na rotina clínica, geralmente é feito pelo histórico, sinais clínicos e hemograma (MORAES; COSTA, 2007). O início agudo dos sinais clínicos em um cão não vacinado previamente é consistente com infecção por parvovírus (TAMS, 2005). Nelson e Couto (2006) ainda relatam que o diagnóstico geralmente é estabelecido por tentativa, sendo a neutropenia uma alteração do hemograma sugestiva de parvovirose, mas não sensível ou específica o suficiente para fechar diagnóstico, pois esta pode ocorrer devido à outra infecção grave. O diagnóstico definitivo de parvovirose exige a identificação do vírus por testes específicos (MORAES; COSTA, 2007).

A detecção das partículas virais nas fezes de pacientes suspeitos pode ser realizada por intermédio de Microscopia Eletrônica, Hemaglutinação Direta, Isolamento Viral em Cultivo Celular ou ELISA. Estes métodos são os mais sensíveis e específicos para o diagnóstico, porém dependem do período de eliminação do antígeno fecal. Os testes sorológicos indiretos, como Inibição da Hemaglutinação, Soroneutralização, ELISA indireto e Imunofluorescência Indireta também podem ser utilizados para diagnóstico de infecção passada, ou mesmo para o acompanhamento da condição imunológica do animal após vacinação. Concentrações séricas elevadas de IgM podem ser observadas ainda na primeira semana de infecção natural ou mesmo após vacinação recente com vírus atenuado. Já na segunda semana, as concentrações séricas de IgG apresentam aumento, sendo a classe de imunoglobulina predominante em ambos os casos (HOSKINS, 2004).

O isolamento viral a partir de fezes ou de tecidos pode ser realizado em células de origem canina, como as MDCK e A-72, e/ou em células CRFK de origem felina (MORAES; COSTA, 2007). O isolamento em cultivo celular é considerado o teste padrão, mas a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada, principalmente pela alta especificidade e sensibilidade deste teste (STROTTMANN et al., 2008). A detecção do material genético viral, pela PCR, em amostras de fezes é sem dúvida o método atual de escolha, uma vez que contribui para excluir muitos falso-positivos e falso-negativos (DE MARI et al., 2003). Estudos anteriores demonstram que a PCR é mais específica e sensível para a detecção de CPV em fezes de cães, quando comparada com HA, ELISA e Isolamento Viral (MOCHIZUKI; HARASAWA; NAKATAN, 1993). Uma técnica muito utilizada é a da imunoperoxidase (IPX), que pode ser aplicada em monocamadas celulares, esfregaços ou diretamente em tecidos, sendo denominada de imunocitoquímica (ICQ) ou imunohistoquímica (IHC), respectivamente. Esses métodos detectam as proteínas virais após a multiplicação do vírus em cultivos celulares ou em tecidos, confirmando a presença do agente que, em alguns casos, apresenta pouca citopatologia ou a não produção do efeito citopático (MORAES; COSTA, 2007).

O diagnóstico *post-mortem* dos cães acometidos pela parvovirose canina é realizado com base nos achados macroscópicos observado na necropsia, e nas lesões histológicas características (HOSKINS, 1997). Na necropsia observa-se a mucosa intestinal congesta, hemorrágica e frequentemente recoberta por uma pseudomembrana, a medula óssea pode apresentar-se liquefeita e hiperêmica. A histopatologia intestinal revela necrose epitelial, colapso das vilosidades e aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria (MORAES; COSTA, 2007).

As alterações microscópicas nem sempre são comprovadas pela histologia. Os achados histopatológicos podem ser inespecíficos ou são prejudicados por autólise, principalmente no intestino delgado onde alterações *post-mortem* se apresentam precocemente (SVARA et al., 2003). Desta forma, métodos de diagnóstico auxiliares são necessários para a confirmação da parvovirose canina.

Cavalli et al. (2008) concluíram que as vacinas atuais devem conter todas as variantes do CPV ou as cepas presentes no ambiente dos cães. As vacinas com um só tipo de cepa não protegem satisfatoriamente contra as outras.

Segundo estudos, a prevalência de anticorpos observada para CPV, no Rio Grande do Sul, foi de 68 % e no Estado do Rio de Janeiro, com o uso da técnica da PCR, encontraram 97 % de positividade, sendo a cepa CPV-2b a mais observada em ambos os estudos (COSTA et al., 2005; DEZENGRINI et al., 2007).

#### 2.1.7 Tratamento

O tratamento das gastroenterites infecciosas é inespecífico e de suporte. Os principais objetivos terapêuticos consistem em restaurar o equilíbrio hídrico e eletrolítico, poupar o sistema digestório, utilizando agentes antieméticos e antimicrobianos (HOSKINS, 2004). Os agentes antimicrobianos são indicados para prevenir e controlar as septicemias bacterianas. É recomendado o uso de antibióticos parenterais em casos de enterites, devido ao intenso comprometimento da mucosa intestinal e conseqüente perda da barreira de proteção, não havendo, no entanto, protocolo fixo (HOSKINS, 2004). A utilização de antimicrobianos de amplo espectro é necessária contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas (TAMS, 2005). Nestas condições, antibióticos orais não são recomendados, pois podem alterar a microbiota intestinal em favor de patógenos entéricos, além de promover a difusão e a resistência de microrganismos enteropatogênicos como a *Salmonella* sp. (POLLOCK; CARMICHAEL, 1979). A adição de aminoglicosídeo ou quinolona é indicada para o tratamento de pacientes gravemente septicêmicos. Contudo, aminoglicosídeos podem causar insuficiência renal aguda e devem ser utilizados somente após reidratação do paciente. O uso em dias alternados pode minimizar seus efeitos renais e maximizar sua ação antimicrobiana, promovendo picos do antibiótico na circulação com baixas concentrações no restante do tempo. Mas, mesmo assim, altas doses não podem ser utilizadas em cães desidratados e a urinálise deve ser realizada para monitoramento da função renal (TAMS, 2005).

Em alguns cães acometidos pela infecção a fluidoterapia subcutânea pode ser realizada, porém, em animais com infecções moderadas e severas a fluidoterapia deve ser pelas vias intravenosa ou intramedular (NELSON; COUTO, 2006).

Nos pacientes com sinais de septicemia avançada à administração em curto prazo de uma mistura de glicose-insulina-potássio (3 g de glicose/unidade de insulina regular/0,5 mEq de cloreto de potássio/Kg, infundida durante 4 a 5 horas) pode ser justificada. Se possível, a mensuração diária de eletrólitos séricos e da glicemia pelo menos duas vezes ao dia, são recomendadas (TAMS, 2005). A hipoproteïnemia frequentemente se desenvolve de forma rápida, em pacientes com diarreia e lesão intestinal graves (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Foi demonstrado experimentalmente que a flunixin meglumine, anti-inflamatório não-esteroidal, aumenta a sobrevivência e é recomendada no tratamento de pacientes com septicemia em razão da enterite por parvovírus. Em virtude do potencial desse medicamento de lesionar a mucosa gástrica, somente uma dose diária deve ser administrada para o manejo emergencial da septicemia em cães (TAMS, 2005).

O vômito grave e incontrolável complica o tratamento e pode requerer a administração de antieméticos (NELSON; COUTO, 2006).

A alimentação e a água são retiradas pelo menos 48 a 72 horas do tratamento e, geralmente, não são reinstituídos até que o vômito e a diarreia tenham cessado. Pequenas quantidades de água (ou água com eletrólitos) são oferecidas durante um período de 24 horas e, se bem toleradas, são seguidas de pequenas porções de comida sólida, facilmente digerível e suave nos vários dias seguintes (TAMS, 2005). Se for necessária, a nutrição parenteral total pode ser utilizada para a manutenção da vida do paciente, que não é capaz de se alimentar por via oral (NELSON; COUTO, 2006).

Para Tams (2005), a imunoterapia passiva com soro ou plasma de cães hiperimunes pode diminuir a morbidade da parvovirose. A administração de anticorpos antiparvovírus pode diminuir a viremia. O uso de plasma fresco tem a vantagem adicional de potencializar a opsonização de bactérias por fibronectina. No primeiro dia da hospitalização, 1 mL/Kg de soro ou plasma hiperimune deve ser administrado por via intravenosa, subcutaneamente ou por via intramuscular. Doadores vacinados ou sobreviventes de uma infecção por parvovírus são excelentes. As hemácias não devem ser administradas, a menos que sejam necessárias.

A intussuscepção intestinal é a seqüela mais séria que pode se desenvolver durante o tratamento de uma gastroenterite viral. Deve ser realizada palpação abdominal cuidadosa para se detectar a presença de uma massa abdominal. Os vômitos persistentes, depois da recuperação clínica aparente, devem suscitar uma busca cuidadosa. As radiografias, ultra-

sonografias e estudos contrastados podem ser necessários para diagnosticar uma intussuscepção (NELSON; COUTO, 2006). Outras complicações potenciais incluem embolização bacteriana, abscedação metastática (articulações, subcutânea, rins) e infecções pelo cateter intravenoso. Esses devem ser mantidos de forma estéril sob uma bandagem que os cubra completamente e devem ser mudadas para uma veia diferente a cada 72 horas (até cinco dias para cateteres de veia jugular) (TAMS, 2005).

#### 2.1.8 Prevenção e Controle

Cães com parvovirose devem ser isolados e receber tratamento em um local específico. A limpeza e desinfecção de boxes e utensílios podem ser feitas com formol a 5 %, hipoclorito de sódio a 0,175 % ou calor a 60 °C por 30 minutos (MORAES; COSTA, 2007).

Na tentativa de prevenir a disseminação da doença, é importante lembrar que o parvovírus persiste por um longo período de tempo no ambiente, tornando difícil o seu controle. Em cães assintomáticos, pode-se detectar a presença do vírus nas fezes, sendo que a imunidade passiva, que em alguns filhotes persiste por 18 semanas de idade, pode inativar o vírus vacinal (NELSON; COUTO, 2006).

A maneira mais efetiva de prevenção da parvovirose é a vacinação sistêmica de filhotes, que devem receber a primeira dose com seis a oito semanas de idade, com duas doses de reforço a cada quatro semanas. Uma quarta dose pode ser efetuada, principalmente para aqueles animais considerados sob-risco em geral. Recomenda-se o isolamento dos animais até completarem a fase de imunização, sempre observando a desinfecção do local (McCANDLISH, 2001; NELSON; COUTO, 2006; MORAES; COSTA, 2007). A revacinação anual é, geralmente, recomendada para o parvovírus, embora possa ser realizada a cada três anos (NELSON; COUTO, 2006; HORZINEK, 2010).

McCandlish (2001) cita que as vacinas com vírus vivo modificado e inativado da panleucopenia felina, foram utilizadas para proteger cães contra o CPV devido aos antígenos comuns que estimulam proteção cruzada, porém o baixo nível de proteção conferido tornou-as sem utilidade.

Segundo Martella et al. (2005), as vacinas contendo a cepa 2 estão sendo substituídas por vacinas que possuem a cepa 2b, com vírus vivo atenuado. O maior problema da imunização de filhotes é o alto título de anticorpos maternos que interferem na resposta vacinal. Porém, estes anticorpos decaem entre duas a cinco semanas de vida, fazendo que

esses cães fiquem suscetíveis à infecção. A aplicação intranasal da vacina com vírus vivo atenuado 2b tem o mesmo efeito quando comparada a via parenteral.

Em animais, imunizados com vacinas contendo essas cepas e desafiados com amostras de campo 2c e 2b, apresentaram uma proteção eficiente quando comparados ao grupo controle, evidenciando a proteção vacinal (LARSON; SCHULTZ, 2008; SPIBEY et al., 2008). No entanto, outros pesquisadores colocam em discussão se as mutações genóticas sofridas durante esses anos, pelo parvovírus canino, têm alterado a capacidade das vacinas em proteger adequadamente contra a doença (DECARO et al., 2007; DECARO et al., 2008). Embora o significado dessa variabilidade antigênica ainda seja investigado, acredita-se que tenha importância principalmente quando os filhotes, com imunidade passiva materna, são desafiados com vírus antigenicamente diferente, ou seja, um determinado título de anticorpos é suficientemente alto para proteger contra o desafio com o vírus homólogo, mas não o suficiente para evitar uma infecção por uma cepa heteróloga, podendo causar doença nesses cães (TRUYEN, 2006).

## **2.2 Adenovírus canino tipo 1**

### **2.2.1 Etiologia**

A Hepatite Infecciosa Canina (HIC) é causada pelo adenovírus canino tipo 1 (CAV-1), sendo reconhecido como causa de necrose hepática aguda em cães. A incidência da doença clínica causada por CAV-1 é baixa, devido à eficácia dos procedimentos de vacinação (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Entretanto, em populações humanas em condições socioeconômicas baixas, a imunização dos animais de estimação não é uma prática frequente, ocorrendo uma frequência maior da infecção. A maioria das infecções pela HIC são inaparentes ou acompanhadas de sinais respiratórios leves. Essa virose acomete principalmente animais não vacinados com idade inferior a seis meses. Apresentando-se geralmente de forma aguda, e os animais que sobrevivem a essa fase possuem um prognóstico favorável (MORAES; COSTA, 2012).

A HIC é causada pelo adenovírus como tipo 1 (CAV-1), que pertence ao gênero *Mastadenovirus*. Esse vírus é antigenicamente relacionado com o CAV-2, agente associado com a traqueobronquite infecciosa ou tosse dos cães. A extensão da reatividade antigênica cruzada pode ser evidenciada pela utilização do CAV-2 em formulações de vacinas para ambas as enfermidades. Essa relação antigênica também pode interferir no diagnóstico, e a

diferenciação entre estes dois agentes requer a utilização de anticorpos monoclonais ou técnicas moleculares (HU et al., 2001).

### 2.2.2 Epidemiologia

É altamente resistente à inativação permitindo consequentemente a disseminação através de fômites e ectoparasitas. O vírus é excretado nas excreções e secreções dos cães infectados. Os animais susceptíveis adquirem a infecção pelo contato direto, pela via oronasal ou conjuntival; ou indireto, a partir de fômites contaminados. Ele também é eliminado por pelo menos 6 a 9 meses na urina após a recuperação (BIRCHARD; SHERDING, 2003). Além dos cães domésticos, as raposas e outros canídeos silvestres são susceptíveis à infecção pelo CAV-1, e sendo considerados potenciais reservatórios do vírus (MORAES; COSTA, 2012).

### 2.2.3 Patogenia

O vírus replica inicialmente nas tonsilas e nas placas de Peyer, disseminando-se para os linfonodos regionais e, eventualmente, atinge a circulação sanguínea. A fase de viremia ocorre entre o quarto e o oitavo dia após a infecção e resulta na disseminação do vírus para vários órgãos como o fígado, os rins, o baço e os pulmões. As células parenquimatosas e as células endoteliais do organismo são os alvos principais para a replicação do CAV-1. Cães jovens e não vacinados são mais susceptíveis à doença. Entretanto, cães de qualquer idade, raça ou sexo podem ser infectados, caso não tenham sido previamente vacinados ou expostos ao agente. A doença pode se manifestar de forma aguda. A hepatite crônica pode ocorrer após a infecção inicial pelo CAV-1, sem necessariamente ocorrer à manutenção do vírus no fígado (MORAES; COSTA, 2012).

### 2.2.4 Sinais clínicos

Os cães com a doença superaguda podem morrer dentro de poucas horas após o surgimento dos sinais clínicos. Esses sinais incluem apatia, anorexia, palidez das mucosas e petéquias, convulsões e coma. Podem ocorrer também sinais neurológicos associados à hemorragia cerebral. A forma aguda da doença ocorre com maior frequência. Um curso de 5 a 7 dias caracterizado por febre de 39,5 a 41 °C, vômitos, diarreia, dor abdominal, tonsilite -



faringite, linfadenopatia e edemas cervicais, tosse e diátese hemorrágica (petéquias e equimose epistaxe, melena) (SWANGO, 1997; KELLY, 1993; GREENE, 2006).

Podem ocorrer sinais neurológicos como desorientação, depressão, estupor, coma, e ataques convulsivos, devido à ocorrência de encefalopatia hepática ou de encefalite não supurativa (MORAES; COSTA, 2007).

Em casos de infecção aguda ou após a recuperação de uma infecção inaparente podem ocorrer sinais que incluem edema corneano (nublação corneana, também chamada de “olho azul”), dor ocular, fotofobia e uveíte anterior (blefaroespasma, inflamação, miose e glaucoma complicante) (BIRCHARD; SHERDING, 2003). As lesões oculares geralmente são brandas e, com resolução espontânea após duas a três semanas, indicando que o animal apresenta resposta imunológica ao vírus.

#### 2.2.5 Lesões

Cães naturalmente infectados e também cães que recebem vacina atenuada (mais raramente) com o CAV-1 podem desenvolver lesões oculares. Na fase de viremia, o vírus atinge o humor aquoso e replica no endotélio do trato uveal e da córnea, causando uveíte anterior e edema de córnea. Durante esta fase o vírus pode se localizar e replicar nas células do endotélio glomerular e no endotélio dos túbulos renais. A lesão inicial dos glomérulos é causada pela deposição de complexos imunes (complexos antígeno-anticorpo), produzindo glomerulonefrite (CARMICHAEL, 1965). No fígado, são observadas congestão e necrose de coagulação multifocal, com o envolvimento dos hepatócitos ou necrose lobular generalizada em casos graves. A extensão e gravidade das lesões hepáticas estão relacionadas com a imunidade humoral. Corpúsculos de inclusão podem ser observados nos tecidos-alvos de replicação viral (KELLY, 1993; GREENE, 2006).

Na necropsia os linfonodos podem estar edemaciados e hemorrágicos, a cavidade abdominal pode apresentar líquido claro ou avermelhado, petéquias e equimoses nas serosas. A icterícia não é observada com frequência em cães que morrem na fase aguda da doença (KELLY, 1993; GREENE, 2006).

#### 2.2.6 Diagnóstico

Na prática clínica, os achados da anamnese, dos exames clínicos e laboratoriais podem ser indicativos da enfermidade. Mas o diagnóstico definitivo só pode ser elaborado através do

isolamento do vírus, da detecção de ácidos nucleicos ou antígenos virais, ou pelo achado de corpúsculos de inclusão intranucleares. Utilizando-se técnicas como Isolamento viral, Imunofluorescência (IFA), Imunoperoxidase (IPX), PCR, Histopatologia, ELISA, Soroneutralização (SN) e Inibição da hemaglutinação (HI) (MORAES; COSTA, 2012).

### 2.2.7 Tratamento

O tratamento recomendado é o de suporte, até que ocorra a recuperação a partir do estágio agudo de infecção e a regeneração hepatocelular. Isso geralmente requer uma fluidoterapia que utilize de soluções suplementadas com potássio e dextrose, tratamento para encefalopatia hepática, e antibióticos para complicações bacterianas secundárias (BIRCHARD; SHERDING, 2003).

### 2.2.8 Prevenção e Controle

Atualmente existem vacinas com vírus vivo modificado, contendo o CAV-2, que conferem imunidade cruzada contra o CAV-1. Essas vacinas são multivalentes e contêm antígenos de outros agentes virais e bacterianos. O desenvolvimento de lesões oculares em cães vacinados com cepas atenuadas de CAV-1 levou a troca desse vírus pelo CAV-2 nas formulações das vacinas (BASS et al., 1980).

Administram-se pelo menos duas doses em um intervalo de 3 a 4 semanas, com 8 a 10 semanas e com 12 a 14 semanas de idade. Recomenda-se a revacinação anual, embora a imunização inicial persista por toda a vida (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

## 2.3 Coronavírus Canino

### 2.3.1 Etiologia

O CCoV tem sido associado a surtos esporádicos de gastroenterite moderada em cães de todas as idades, porém com maior gravidade em filhotes. Quando a infecção ocorre associada com a parvovirose, a doença é grave e frequentemente fatal para os filhotes (PRATELLI et al., 1999). O vírus foi isolado, pela primeira vez, na Alemanha, em 1971, a partir das fezes de cães com enterite. Desde então, esse agente tem sido amplamente detectado

em cães clinicamente saudáveis ou em cães que apresentam vômitos e diarreia severa (BINN et al., 1974).

As características gerais de estrutura e do ciclo de replicação do CCoV são semelhantes aos descritos para a família *Coronaviridae*. O CCoV pertence ao grupo I dos coronavírus e também é propenso a recombinações no genoma. Os Genes das proteínas M e S, que possuem importantes propriedades biológicas e imunológicas, são os principais locais de recombinação (PRATELLI, 2005). Diferenças na sequência de nucleotídeos desses genes indicam a existência de uma diversidade genética entre cepas de referência e isolados de campo. Alguns isolados altamente virulentos (cepas pantrópicas) já foram identificados, associados com altos índices de mortalidade (BRANDÃO et al., 2012).

### 2.3.2 Epidemiologia

Cães de todas as idades e raças são susceptíveis a infecção pelo CCoV. No entanto, os filhotes são mais sensíveis e frequentemente desenvolvem sinais clínicos de enterite, além de apresentarem índices maiores de mortalidade (TAMS, 2005). A doença ocorre com maior frequência em canis, abrigos e locais onde há convívio entre cães. O vírus é altamente contagioso e dissemina-se rapidamente na população canina (CARMICHAEL; BINN, 1981).

A principal fonte do vírus são fezes de cães infectados, além de fômites contaminados, e a infecção ocorre principalmente pela via oral. O vírus pode ser excretado nas fezes por até duas semanas após a infecção, porém alguns estudos demonstraram a eliminação por longos períodos (entre 37 e 180 dias). Cães sem manifestações clínicas também podem excretar o vírus nas fezes por períodos prolongados (BRANDÃO et al., 2012).

Há evidências sorológicas de que o CCoV apresenta distribuição mundial, mas os dados de prevalência são variáveis. Além dos cães e outros canídeos, gatos domésticos também podem ser infectados, demonstrando soro-conversão, porém sem o desenvolvimento de sinais clínicos. O CCoV também foi detectado em animais selvagens, como coiotes (GREEN et al., 1984), lobos (ZARNKE et al., 2001) e hienas (EAST et al., 2004).

No meio ambiente, o vírus é facilmente inativado pelo calor e por solventes lipídicos. No entanto, em temperaturas baixas, pode manter-se infeccioso por longos períodos. O CCoV é estável sob pH ácido, sobrevivendo a um extremo de pH 3,0 (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

### 2.3.3 Patogenia

A infecção dos cães ocorre pela via fecal-oral. Após a ingestão, o CCoV atinge o intestino delgado e se replica nas células epiteliais das vilosidades, e a sua excreção nas fezes se inicia entre um e dois dias após a infecção (APPEL, 1987). O vírus passa pelo estômago, resistindo ao pH ácido, e, após a replicação no epitélio do duodeno, dissemina-se na superfície intestinal até o íleo. O vírus pode se disseminar aos linfonodos mesentéricos e, ocasionalmente, alcança o baço e o fígado. A mortalidade geralmente é baixa. Contudo, por mais que o CCoV seja associado a infecções restritas ao trato entérico, já foi descrita uma variante do vírus denominada de pantrópica (CCoV-II) por apresentar tropismo por pulmões, rins, fígado, baço e linfonodos, podendo causar surtos epidêmicos com elevada mortalidade em cães jovens (SANCHEZ-MORGADO et al., 2004; EVERMANN et al., 2005; BUONAVOGLIA et al., 2006).

#### 2.3.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos se iniciam entre um e quatro dias após a infecção. Os cães infectados podem apresentar sinais leves a moderados de enterite. As manifestações mais frequentes são: diarreia, vômito, desidratação, perda de apetite e letargia, podendo levar os cães jovens a morte. A infecção conjunta com outros vírus, bactérias ou parasitas geralmente produz uma forma mais severa e até mesmo fatal da doença (DECARO; BUONAVOGLIA, 2008). O estresse é outro fator que pode agravar as manifestações clínicas. Se não houver agravamento dos sinais, a recuperação pode ocorrer em uma semana após a infecção (CARMICHAEL; BINN, 1981). A infecção pelo CCoV é restrita ao intestino e geralmente não ocorre viremia. Portanto, os títulos de anticorpos produzidos em resposta a infecção são geralmente baixos (BRANDÃO et al., 2012).

#### 2.3.5 Lesões

Macroscopicamente, o intestino delgado encontra-se dilatado, o conteúdo é líquido e de coloração amarelada ou esverdeada. A mucosa intestinal encontra-se hiperêmica e, em alguns casos, hemorrágica. Os linfonodos mesentéricos podem estar edemaciados (PENSAERT et al., 1994).

Microscopicamente, a replicação viral resulta em atrofia e fusão das vilosidades intestinais, depressão das criptas, achatamento das células epiteliais, aumento na celularidade da lâmina própria e aumento de células globosas (BRANDÃO et al., 2012).

### 2.3.6 Diagnóstico

A detecção do vírus nas fezes ou no intestino constitui-se na forma mais objetiva de diagnóstico, diferenciando-a da enterite por outros agentes. O isolamento viral não é muito utilizado, assim com também, a sorologia. Utiliza-se kits baseados em cromatografia para a detecção de antígenos do CCoV e também as técnicas de RT-PCR e RT-PCR em tempo real (PRATELLI et al., 1999).

### 2.3.7 Tratamento

O tratamento é de suporte e baseia-se na restituição do equilíbrio hídrico-eletrolítico, além do controle de infecções bacterianas e parasitárias concomitantes. Recomenda-se a utilização de antibióticos de amplo espectro para pacientes com gastroenterite grave, também devido ao intenso comprometimento da mucosa intestinal e consequente perda da barreira de proteção, não havendo, no entanto protocolo fixo (HOSKINS, 2004). Nestas condições, antibióticos orais não são recomendados, pois podem alterar a microbiota intestinal em favor de patógenos entéricos, além de promover a difusão e a resistência de microrganismos enteropatogênicos como a *Salmonella* sp. (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990). Os agentes antimicrobianos são indicados para prevenir e controlar as septicemias bacterianas (SHERDING, 1998). Em pacientes com sinais de septicemia avançada pode-se administrar uma mistura de glicose-insulina-potássio. Se for possível, devem-se mensurar diariamente as concentrações de eletrólitos séricos e a monitoração da glicemia. Devem-se oferecer pequenas quantidades de água durante o dia, e se bem toleradas, oferecer porções de comida sólida. É importante observar a manutenção do volume sanguíneo, assim como repor as perdas. Outra opção é a utilização de imunoterapia (TAMS, 2005).

### 2.3.8 Prevenção e Controle

Para a prevenção da infecção e da doença, deve-se evitar o contato de cães soronegativos com cães infectados. Condições de estresse causadas pela falta de sanidade,

aglomeração, desmame e infecções concomitantes por parasitas e outros vírus favorecem o desenvolvimento de enterite nos cães infectados (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

Existem várias vacinas multivalentes que possuem antígenos do CCoV inativados, no entanto, a eficácia destas vacinas é questionável pela importância na imunidade local na mucosa intestinal. Vacinas vivas atenuadas já foram testadas, e resultados promissores foram demonstrados através da aplicação oral em uma única dose. Cães vacinados pela via oral apresentam títulos mais altos do que cães vacinados pela via intramuscular (LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

## **2.4 Rotavírus canino**

### **2.4.1 Etiologia**

A primeira descrição dos rotavírus de animais foi descrita em 1969, desde então, os rotavírus têm sido identificados como uma das principais etiologias virais de diarreia em animais jovens de diversas espécies de mamíferos e aves. Ele é um vírus de genoma de RNA segmentado, dupla fita, de aproximadamente 85 nm de diâmetro, não possuindo envelope. Seu capsídeo viral tem simetria icosaédrica com três camadas proteicas. A partícula viral sintetiza proteínas não estruturais e proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, que são componentes do core viral, além das proteínas da camada externa VP7 e VP4, que representam os maiores antígenos envolvidos na neutralização viral e são responsáveis pela definição dos diferentes sorotipos (ESTES; COHEN, 1989).

Diferentemente de outras infecções entéricas, especialmente as bacterianas e parasitárias, as medidas de caráter higiênico-sanitárias adotadas isoladamente não são capazes de reduzir significativamente o número de casos clínicos de rotavirose. Algumas características peculiares dos rotavírus fazem com que se manifestem de forma diferente de outras doenças entéricas, determinando um grande impacto na sanidade animal (ALFIERI et al., 2012). Dentre essas características estão: resistência dos vírions às condições ambientais e aos produtos químicos utilizados em desinfecção, altas concentrações de partículas virais excretadas no período agudo da doença, presença de infecções subclínicas e de adultos portadores assintomáticos, grande variedade de hospedeiros, possibilidade de transmissão entre espécies, caráter endêmico e zoonótico da infecção. Esses fatores também contribuem para que as infecções por rotavírus sejam amplamente disseminadas na população. No

entanto, a distribuição dos sorotipos de cada espécie animal pode apresentar variações (ALFIERI, 1999).

#### 2.4.2 Epidemiologia

A transmissão do rotavírus ocorre principalmente pela via fecal-oral, por meio de partículas virais encontradas no ambiente, na água e nos alimentos contaminados pelas fezes (GORDON, 1982; COOK et al., 1996; KAPIKIAN et al., 2001). Após a ingestão, as partículas virais alcançam a luz intestinal, sendo que o rotavírus possui tropismo pelas células do intestino delgado. Os vírions penetram nos enterócitos maduros, localizados na região apical das vilosidades intestinais. O vírus é secretado nas fezes por até sete dias após a infecção (ALFIERI et al., 2007). As taxas de morbidade e mortalidade e os prejuízos econômicos ocasionados em espécies de importância veterinária são variáveis.

#### 2.4.3 Patogenia

A alteração entérica ocasionada por este agente também é conhecida como diarreia por má absorção, devido às alterações nos mecanismos fisiopatológicos. Em consequência das lesões no epitélio, os mediadores da reação inflamatória comprometem também as células das criptas; e a motilidade intestinal pode estar inibida durante a maioria dos casos de diarreia. Quando o número de enterócitos infectados excede o da reposição celular, as vilosidades atrofiam-se, podendo fusionar-se nos casos mais graves (BISHOP et al., 1973).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta às infecções pelos rotavírus ainda não estão totalmente esclarecidos. A imunidade de mucosas, mediada por imunoglobulinas IgA parece constituir a principal defesa orgânica contra as infecções intestinais causadas por esses vírus (ALFIERI et al., 2012).

#### 2.4.4 Sinais clínicos

Após o período médio de incubação de 16 a 24 horas, surgem os primeiros sinais de diarreia. Podendo também aparecer outros sinais clínicos inespecíficos como: depressão, anorexia, vômito, desidratação, pelo eriçado e sinais inerentes à acidose metabólica. Animais jovens podem morrer em consequência da desidratação ou da infecção bacteriana secundária, mas a maioria se recupera em três a quatro dias (ALFIERI et al., 2012).

#### 2.4.5 Lesões

As paredes do intestino delgado ficam dilatadas e tornam-se finas e translúcidas, com conteúdo líquido no seu interior. Microscopicamente, ocorre atrofia das vilosidades em até 2/3 da altura original. Além disso, os enterócitos do ápice das vilosidades afetadas aumentam de volume e descolam-se facilmente da lâmina própria (TORRES-MEDINA; UNDERDHAL, 1980).

#### 2.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo depende essencialmente da realização de testes laboratoriais como, por exemplo, a Microscopia eletrônica (ME) utilizada com o objetivo de solucionar os resultados discrepantes de outros métodos de diagnóstico (NAKATA et al., 1987). O Isolamento viral em cultivo celular é uma técnica demorada e exige a manutenção de linhagens celulares, que torna o processo oneroso (CUKOR; BLACKLOW, 1984). Outros métodos também podem ser utilizados para a detecção do vírus como: PAGE, fixação do complemento, IFA, RIA, HA, SN, aglutinação em látex e ELISA. Métodos moleculares, como RT-PCR e RT-PCR multiplex, vêm sendo amplamente utilizados para genotipagem e identificação de infecções mistas (ALFIERI et al., 2012).

#### 2.4.7 Tratamento

O tratamento realizado para esta infecção é de suporte e baseia-se na restituição do equilíbrio hídrico-eletrolítico, além do controle de coinfeções bacterianas e parasitárias. A utilização de antibióticos de amplo espectro e parenterais é recomendável, devido ao intenso comprometimento da mucosa intestinal e consequente perda da barreira de proteção, não havendo, no entanto protocolo fixo (HOSKINS, 2004). Nestas condições, antibióticos orais não são recomendados, pois podem alterar a microbiota intestinal em favor de patógenos entéricos, além de promover a difusão e a resistência de microrganismos enteropatogênicos como a *Salmonella* sp. (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990). Os agentes antimicrobianos são indicados para prevenir e controlar as septicemias bacterianas (SHERDING, 1998). Em pacientes com sinais de septicemia avançada pode-se administrar uma mistura de glicose-insulina-potássio. Se for possível, devem-se mensurar diariamente as concentrações de



eletrólitos séricos e a monitoração da glicemia. Devem-se oferecer pequenas quantidades de água durante o dia, e se bem toleradas, oferecer porções de comida sólida. É importante observar a manutenção do volume sanguíneo, assim como repor as perdas. Outra opção é a utilização de imunoterapia (TAMS, 2005).

#### 2.4.8 Prevenção e controle

Os anticorpos rotavírus-específicos presentes no colostro são particularmente importantes na proteção dos animais neonatos. A ingestão de colostro de boa qualidade pode prevenir a incidência da doença nos neonatos ou reduzir a gravidade da diarreia. Contudo, as rotaviroses representam um desafio para a elaboração de imunógenos capazes de induzir resposta imunológica plena e duradoura, pois possuem uma grande variabilidade antigênica e molecular (ALFIERI et al., 2012).

A profilaxia das rotaviroses não se restringe apenas às medidas higiênico-sanitárias, pois estas são responsáveis por surtos de diarreia com impacto em saúde pública e em sanidade animal mesmo em países desenvolvidos com manejo zootécnico e sanitário adequados (BERN et al., 1994; GLASS et al., 1994).

Os dados que seguem na parte experimental desta monografia foram obtidos durante o período de graduação com bolsa de Iniciação Científica, e executados ou acompanhados pela graduanda, fazendo parte da Tese de Doutorado de Luciane Dubina Pinto. A graduanda analisou cerca de 15 % das amostras de parvovirose, 50 % das amostras de coronavirose, 60 % das amostras de rotavirose e 100 % das amostras de adenovirose.

### **3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO 2 NO BRASIL**

#### **3.1 Materiais e métodos**

##### **3.1.1 Amostras**

Foram analisadas 144 amostras de fezes caninas de 20 municípios do Rio Grande do Sul e de alguns Estados do Brasil, entre abril de 2009 e julho de 2010. Estas eram oriundas de fezes ou suabes retais de cães com idade entre um mês e um ano, de ambos os gêneros e raças distintas, que apresentavam ou não GEH. As amostras foram armazenadas em recipientes estéreis e estocadas a -20 °C.

##### **3.1.2 Extração do DNA**

As amostras (fezes) foram ressuspensas a 20 % (peso/volume) com PBS (pH 7,4). As soluções foram congeladas e descongeladas por três vezes, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para extração. Como controle positivo foram utilizadas vacinas comerciais. A extração do DNA total foi realizada através de kit comercial a base de sílica, conforme descrito por Boom e colaboradores (1990).

##### **3.1.3 Amplificação de DNA**

Na Reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os seguintes reagentes: PCR buffer 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,5), MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 µM dos *primers*, 2 U de *Taq* DNA polimerase e 2 µL de amostra com DNA (DESARIO et al., 2005). Para amplificação de 583 pares de bases do fragmento do gene VP2 (posição 4003 a 4585), foram utilizados os pares de

*primers:* CPV555for 5'CAGGAAGTAATCCAGAAGGA 3'; CPV555rev 5'GGTGCTAGTTGATATGTAATAAAACA 3' (BUONAVOGLIA et al., 2001). As temperaturas do termociclador foram de 94 °C por 10 minutos, 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 10 minutos em 40 ciclos (DESARIO et al., 2005). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x concentrado (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). A visualização foi realizada sob lâmpada ultravioleta, onde foram comparados os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 100 pb (Fermentas, USA).

#### 3.1.4 Sequenciamento do DNA

Os produtos de amplificação da PCR foram submetidos à purificação com GFX DNA e Gel Band Purification (Amershan Bioscience, USA) e sequenciados através do Analisador Genético ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). As sequencias foram submetidas ao banco de dados do GenBank.

O alinhamento e análise das sequencias foram interpretados pelo método Clustal através do software Bio-Edit 7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

As sequencias de nucleotídeos de CPV-2a (DQ340434 e EF375482), CPV-2b (DQ340409) e CPV-2c (FJ222821, FJ0052511, EF375479) foram retiradas do GenBank para fins de comparação.

### 3.2 Resultados

Foram realizadas as extrações e PCRs de todas as amostras, sendo sequenciadas as amostras positivas. Na PCR para amplificação parcial do gene VP2 obteve-se uma banda única, com o tamanho esperado de 583 pb. Foi utilizada como controle positivo uma cepa vacinal CPV-2 (Cornell, Biovet, Vargem Grande Paulista, SP) e como controle negativo água destilada. O controle negativo (água destilada) não gerou produtos de amplificação (Figura 1).

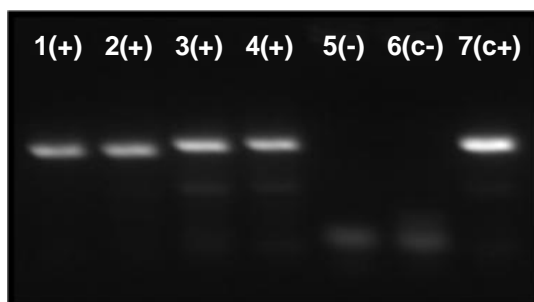


Figura 1 – Visualização dos produtos da PCR.

Os resultados obtidos da análise de 144 amostras demonstraram 29,2 % (42/144) de positividade para CPV-2 (Tabela 1). De todos os cães analisados, 38,8 % (56/144) apresentavam gastroenterite hemorrágica (GEH); dos 42 positivos 71,4 % (30/42) tinham sinais de GEH. No Rio Grande do Sul, foram analisadas 111 amostras (77 %), sendo elas oriundas dos municípios de Porto Alegre, Viamão, Cachoeirinha, Taquara, Canoas, Caxias do Sul, Passo Fundo, Bagé, Glorinha, Gravataí, Santana do Livramento, Lavras do Sul, Novo Hamburgo, Rio Pardo, São Francisco de Paula.

Tabela 1 - Resultados da detecção de parvovírus tipo 2 em amostras de fezes caninas.

	Amostras Analisadas	Amostras Positivas para CPV-2	Amostras Positivas para CPV tipo 2c
Rio Grande do Sul	111	33	26
Paraná	12	5	5
Santa Catarina	10	3	2
Rio de Janeiro	4	0	0
São Paulo	5	0	0
Rondônia	2	1	0
<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>42</b>	<b>33</b>

Foram sequenciadas as 42 amostras positivas para CPV-2, identificando-se 78,6 % (33/42) do tipo 2c, 19 % (8/42) do tipo 2b e 2,4 % (1/42) do tipo 2, sendo que a região sul do país apresentou todos os casos de parvovirose do tipo 2c (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da caracterização do parvovírus tipo 2 em amostras de fezes caninas.

	Amostras sequenciadas	CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
Rio Grande do Sul	33	1	6	26
Paraná	5	0	0	5
Santa Catarina	3	0	1	2
Rondônia	1	0	1	0
<b>Total</b>	42	1	8	33

### 3.3 Discussão

O CPV é um importante agente etiológico de gastroenterite em cães, ele esteve presente em um grande número de amostras de cães com gastroenterite analisadas neste estudo. Constatou-se que o tipo 2c compõe a maioria das amostras presentes na região sul do país, o que confirma que o tipo 2c está circulante no Brasil e que pode estar comprometendo a eficiência das vacinas atualmente utilizadas.

Cavalli et al. (2008) concluíram que as vacinas atuais devam conter todas as variantes do CPV ou as cepas presentes no ambiente dos cães, já que as vacinas com um só tipo de cepa não protegeram satisfatoriamente contra as outras. As vacinas atualmente usadas para a prevenção da parvovirose canina são compostas pelas cepas CPV- 2 e CPV- 2b. Este fator coloca em dúvida se estas vacinas estão conseguindo proporcionar uma proteção eficiente para a nova cepa CPV- 2c. Na Europa e Estados Unidos, vários estudos observaram que cães imunizados com vacinas contendo os genótipos CPV- 2 e CPV- 2b apresentaram sintomas da infecção, sendo que a maioria desses animais foi positivo para o tipo CPV- 2c (DECARO et al., 2006a; PÉREZ et al., 2007; HONG et al., 2007). A identificação dos tipos CPV- 2 no Brasil são importantes para que ocorra o monitoramento de sua disseminação em distintas regiões do país, a ocorrência de surtos da doença e a identificação dos genótipos, contribuindo, com esses dados, para a sua epidemiologia.

Vários testes diagnósticos como Microscopia Eletrônica, Hemaglutinação Direta (HA), Isolamento Viral em Cultivo Celular, ELISA, Inibição da Hemaglutinação, Soroneutralização e Imunofluorescência Indireta serviram para detecção da presença viral. No entanto, a PCR é a mais utilizada para identificação genômica de cepas de parvovírus circulantes, bem como para confirmar a presença do agente em amostras fezes de cães

(MOCHIZUKI; HARASAWA; NAKATAN, 1993; PEREIRA et al., 2000; COSTA et al., 2005).

## 4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

### 4.1 Materiais e métodos

#### 4.1.1 Amostras

Foram analisadas 144 amostras de fezes caninas de 20 municípios do Rio Grande do Sul e de alguns Estados do Brasil, entre abril de 2009 e julho de 2010. Estas eram oriundas de fezes ou suabes retais de cães com idade entre um mês e um ano, de ambos os gêneros e raças distintas, que apresentavam ou não GEH. As amostras foram armazenadas em recipientes estéreis e estocadas a -20 °C.

#### 4.1.2 Extração do DNA

As amostras (fezes) foram ressuspensas a 20 % (peso/volume) com PBS (pH 7,4). As soluções foram congeladas e descongeladas por três vezes, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para extração. Como controle positivo foram utilizadas vacinas comerciais. A extração do DNA total foi realizada através de kit comercial a base de sílica, conforme descrito por Boom e colaboradores (1990).

#### 4.1.3 Extração do RNA

As amostras (fezes) foram ressuspensas a 20 % (peso/volume) com PBS (pH 7,4). As soluções foram congeladas e descongeladas por três vezes, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para extração. Como controle positivo foram utilizadas vacinas comerciais. A extração de RNA foi realizada por TRIzol® LS (Invitrogen®).

#### 4.1.4 Amplificação de DNA

Na PCR para detecção do Adenovírus canino tipo 1 (CAV-1) foram utilizados reagentes segundo Hu et al. (2001). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TAE 1x concentrado (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A visualização foi

realizada sob lâmpada ultravioleta, onde foram comparados os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 100 pb (Fermentas, USA).

#### 4.1.5 Amplificação do RNA

A RT-PCR para detecção do Coronavírus canino (CCoV) e do Rotavírus canino (CRV) foi realizada segundo Herrewegh et al. (1998) e Gouvea et al. (1990) respectivamente. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x concentrado (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A visualização foi realizada sob lâmpada ultravioleta, onde foram comparados os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 100 pb (Fermentas, USA).

## 4.2 Resultados

Os resultados obtidos da análise das 144 amostras demonstraram 25,7 % de positividade para CCoV (37/144), 2,1 % para CRV (3/144) e 1,4 % para CAV-1 (2/144). Sendo que entre os animais positivos para CCoV, 22 % (8/37) apresentavam GEH, e para CRV 67 % (2/3) apresentavam GEH (Tabela 3). Das coinfeções encontradas, foram observadas 12 amostras para CPV- 2 e CCoV, 2 amostras para CPV- 2 e CRV e 1 amostra para CCoV e CAV-1 (Tabela 4).

Tabela 3 - Resultados da detecção dos vírus para diagnóstico diferencial.

	Amostras analisadas	Amostras positivas	Animais positivos com GEH
CPV-2	144	42	29
CCoV	144	37	8
CRV	144	3	2
CAV-1	144	2	0

Tabela 4 - Resultados das coinfeções.

Quantidade de cães	CPV-2	CCoV	CRV	CAV-1
<b>12 animais</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
2 animais	X		X	
1 animal		X		X



### 4.3 Discussão

Embora a participação de agentes infecciosos bacterianos e parasitários não deva ser desprezada no contexto das enterites caninas, os principais agentes virais causadores das mesmas são o parvovírus, o coronavírus e o rotavírus canino; porém outras viroses têm sido incriminadas como causadoras de enterites, tais como: calicivirose, adenovirose, herpesvirose, enterovirose, astrovirose e infecções provocadas pelo vírus da parainfluenza (HOSKINS, 2004).

A partir da década de 70 as enterites virais tornaram-se reconhecidas como a principal causa de diarreia infecciosa em cães com idade inferior a 6 meses. A enterite por parvovírus canina é possivelmente a doença infecciosa mais comum dos cães (McCAW; HOSKINS, 2006).

Sabe-se que associações virais podem ocorrer com relativa frequência em um mesmo processo gastrintestinal (EVERMANN et al., 1988). Acredita-se que as infecções entéricas caninas persistam devido a dois aspectos, representados pelo bloqueio dos anticorpos de origem materna e pelas múltiplas etiologias associadas ao complexo gastroenterite canina. Uma vez determinadas as múltiplas causas, pode-se estabelecer a etiologia geral do complexo (HARRENSTEIN et al., 1997; MARTINELLO et al., 1997; MECH et al., 1997).

O parvovírus, dentre os vírus de tropismo digestivo, vem sendo o mais importante agente etiológico das gastroenterites, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, a alta frequência está aliada com a grande resistência do vírus no meio externo (POLLOCK, 1985). Já a coronavirose canina, presente principalmente em canis, não conduz a altas taxas de mortalidade, embora esteja mais difundida que a parvovirose. Entretanto, a infecção dupla é favorecida pela superposição dos mecanismos patogênicos de ambos os vírus (APPEL, 1988).

A gastroenterite viral é uma condição infectocontagiosa sujeita a determinados fatores de risco de transmissão e de manutenção dos agentes na população animal e no ambiente. Uma vez presente algum agente viral, o curso clínico da doença e o seguimento da infecção são influenciados pela idade do animal, dose do vírus recebida, rota da infecção, composição da flora microbiana intestinal, condições debilitantes e infecções intercorrentes (HOMEM et al., 1999).

## 5 CONCLUSÃO

As doenças gastrentéricas infecciosas compõem grande parte da casuística da clínica médica de pequenos animais, cujos sinais clínicos típicos são evidenciados através de vômitos e diarreias (BURROWS; BATT; SHERDING, 1997). As enterites virais são consideradas uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em cães com menos de seis meses de idade. Dentre os principais agentes causadores de diarreias estão o CPV-2 e o CCoV (HOSKINS, 1997; TAMS, 2005).

O coronavírus canino é um patógeno que vem merecendo crescente atenção em enterites de cães em um nível mundial, em função de sua frequência de ocorrência e diversidade genética (EVERMANN et al., 2005; BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2008).

O rotavírus canino ainda não se constituiu em patógeno de relevância para enterites em cães, mas estes podem se tornar reservatórios, transmitindo a infecção para outros animais, inclusive o homem (VONSOVER et al., 1993).

O diagnóstico precoce e definitivo da etiologia das gastroenterites caninas torna-se essencial para o tratamento e controle da disseminação do agente etiológico. Assim, a parvovirose canina, por sua elevada frequência aliada à grande resistência no meio ambiente, tem se destacado, dentre as demais, por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade (OTTO et al., 2001).

Apesar de possuir um genoma DNA, o CPV-2 possui uma taxa de mutação genética elevada, semelhante à observada nos vírus com genoma RNA, a qual é responsável pela evolução antigênica contínua e o aparecimento de novas variantes (DECARO et al., 2007a).

O CPV- 2c disseminou-se rapidamente na população canina da Itália e em outros países da Europa devido à sua adaptação ao hospedeiro e ao aparecimento de outras variantes antigênicas, podendo ser considerada como uma doença viral emergente. Com uma rápida dinâmica evolucionária, é provável que o CPV continue a melhorar a sua capacidade de infecção nos hospedeiros carnívoros (SHACKELTON et al., 2004; DECARO et al., 2006a, 2007a, 2007b).

As vacinas comerciais existente no mercado para a imunização contra o CPV, possuem as capas 2 e 2b. Estas vacinas são eficazes conseguindo prevenir a infecção, contudo, o aparecimento do novo tipo originou um debate em relação às diferenças antigênicas existentes entre eles e se este fator poderia contribuir para uma diminuição da eficácia das mesmas (MARTELLA et al., 2005; TRUYEN, 2006).

Geralmente, as vacinas devem conter os tipos antigênicos mais recentes, de forma a obter uma proteção mais completa, apresentando uma resposta imune tão boa quanto à produzida pelas vacinas contendo a estirpe original (TRUYEN, 2006).

A identificação dos tipos de CPV-2 e de outros agentes causadores de gastroenterites é importante para o monitoramento destes vírus na população canina e seus controles através de uma eficiente imunização, com o monitoramento da eficácia das vacinas atualmente utilizadas.

## REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods*, v.83, p.35-43, 1999.
- ALFIERI, A.A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, ed. da UFSM, 2007, 888 p.
- ALFIERI, A.A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, ed. da UFSM, 2. ed., 2012, 1008 p.
- APPEL, M.J.G. et al. Canine viral enteritis. In: Status report on corona and parvo-like viral enteritis. **Cornell Vet.**, v. 69, p. 123-133. 1979.
- APPEL, M.J.G. Does canine parvovirus augment the effects of subsequent parvovirus infection. *Vet.Med.*: 360-366, 1988.
- APPEL, M.J.G.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus type 2. In: **Virus Infections of carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V.Cap.7, p. 69-92, 1987.
- BASS, E.P. et al. Evaluation of a canine adenovirus type 2 strain as a replacement for infectious canine hepatitis vaccine. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.177, p.234-242, 1980
- BERN, C.; GLASS, R.I. Impact of diarrheal Diseases worldwide. In: *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract* (Kapikian, A.Z. Ed.), 2<sup>nd</sup> ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, p.1-26.
- BICHARD, S. J; SHERDING, R. G. **Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2003. p.1835-1836.
- BINN, L.N. et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. **Proceedings of Annual Meeting US Animal Health Association**, v.78, p.359-366, 1974.
- BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, v.2, p.1281-1283, 1973.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRANDÃO, et al. Reoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, ed. da UFSM, 2. ed., 2012, 1008 p.

BUONAVOGLIA, C. et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n.3, p. 492-494, 2006.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, n. 82, p. 3021-3025, 2001.

BURROWS, C.F.; BATT, R.M.; SHERDING, R.G. Afecções do intestino delgado. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária - Moléstias do cão e do gato**. 4. ed. São Paulo : Manole, v. 2, cap.104, p.1618-1705, 1997.

CARMICHAEL, L.E. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis II. Experimental ocular hypersensitivity produced by the virus. *Pathol. Vet.* 2:344-359. 1965.

CARMICHAEL, L.E. An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine series B**, v. 52, n. 7-8, p. 303-311, 2005.

CARMICHAEL, L.E.; BINN, L.N.; New enteric viruses in the dog. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 25, p. 1-37, 1981.

CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMERO, M.; BELLACICCO, A.L.; PALO, P.; DECARO, N.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Evaluation of the Antigenic Relationships among Canine Parvovirus Type 2 Variants. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 534-539, 2008.

COOK, S.M.; GLASS, R.I.; LeBARON, C.W.; MEI-SHANG, H. Global seasonality of rotavirus infectious. *Bulletin of the World Health Organization*, v.68, p.171- 177, 1996.

COSTA, A.P.; LEITE, J.P.G.; LABARTHE, N.V.; GARCIA, R.C.N.C. Genomic Typing of Canine Parvovirus Circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 Using Polymerase Chain Reaction Assay. **Veterinary Research Communications**, n. 29, p. 735-743, 2005.

CUKOR, G.; BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiological Review*, v.48, p.157-179, 1984.

DE MARI, K. et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. **Vet. Rec.**, v. 152, p. 105-108, 2003.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; Di TRANI, L.; TARSITANO, E.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 19-28, 2005.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; BUONAVOGLIA, D.; BELLACICCO, A.L.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. **Journal of Virological Methods**, n. 138, p. 10-16, 2006a.

DECARO, N. MARTELLA, V.; DESARIO, C.; BELLACICCO, A.L.; CAMERO, M.; MANNA, L., D'ALOJA, D.; BUONAVOGLIA, C. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. **Journal Veterinary Medicine**, v. 53, p. 468-472, 2006b.

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. **Res. Vet. Sci.**, v. 83, p. 269–273, 2007a.

DECARO, N., DESARIO, C., ELIA, G., CAMPOLO, M., LORUSSO, A., MARI, V., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. **Vaccine**, v. 25, p. 1161–1166, 2007b.

DECARO, N., DESARIO, C., ELIA, G., MARTELLA, V., MARI, V., LAVAZZ, A., NARDI, M., BUONAVOGLIA, C. Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiology**, v. 31, p. 125–130, 2008.

DESARIO, C., DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test of virus? **Journal of Virological Methods**, v. 126, p. 179-185, 2005.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinimose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 183-189, 2007.

DURIGON, E.L.; ÂNGELO, M.J.O.; JEREZ, J.A. et. al. Comparação entre as reações de hemaglutinação (HA), isolamento do vírus em cultura de células (CC), imunoeletrosmoforese (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), para o diagnóstico etiológico da parvovirose canina. **Rev. Microbiol.**, v. 18, p. 205-210, 1987.

EAST, M.L.; MOESTL, K.; BENETKA, V.; PITRA, C.; HONER, O.P.; WACHTER, B.; HOFER, H. Coronavirus infection of spotted hyenas in the Serengeti ecosystem. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n.1-2, p. 1-9, 2004.

ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiological Reviews*, v.53, n.4, p.410-449, 1989.

ETTINGER, S. J; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.135-136.

EVERMANN, J. F.; ABBOT, J. R.; HAN, S.; Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 610-614, 2005.

EVERMANN, J.F.; MCKEIRMAN, A.J.; EUGSTER, A.K. Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. **Compan.animal practice**. vol.19, p.6-122, 1988.

GAGNON, A.N.; POVEY, R.C. A possible parvovirus associated with a epidemic gastroenterites of dogs in Canada. **Vet.Rec.**, v. 104, p. 263-64, 1979.

GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R.; SMITH, J. Rotavirus Vaccines: Success by Reassortment? **Science**, v.265, p.1389-1391, 1994.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica**. 2ed., Editora da UFRGS, cap. 2, p. 49-79, 2006.

GORDON, A.G. Rotavirus infection and the some syndrome. **Journal of Infectious Diseases**,v.146, p.117-118, 1982.

GORDON, J.C.; ANGRICK, E.J. Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. **American Journal of Veterinary Research**, n. 47, p. 1464-1467, 1986.

GREEN, J.S.; BRUSS, M.L.; EVERMANN, J.F.; BERGSTROM, P.K. Serologic response of captive coyotes (*Canis latrans Say*) to canine parvovirus and accompanying profiles of canine coronavirus titers. **Journal of Wild life Diseases**, v.20, n.1, p.6-11, 1984.

GREENE, C.E. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis, p.41-47. In: Idem (ed.), **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 3rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 1387p. 2006.

GREENWOOD, N.M.; CHALMERS, W.S.K.; BAXENDALE, W; THOMPSON, H. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains. **Vet.Rec.**,v. 136, p. 63-67, 1995.

HAGIWARA, M.K.; JULY, J.R.; BACCARO, M.R. et al. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovírus. **Arq. Inst. Biol.**, v. 47, p. 47-49, 1980.

HARRENSTEIN, L.A.. MUNSON, L., RAMSA Y, E.C. et al. **Antibody responses of red wolves to canine distemper virus and canine parvovirus vaccination**. J. Wildl. Dis., v.33, p.600-605, 1997.

HOMEM, V.S.F.; MENDES ,Y.G.; LINHARES, A .C. Gastroenterite canina-Agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51 n. 6, p. 531- 536, 1999.

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**, n. 19, p. 535-539, 2007.

HORZINEK M. C. Vaccination Protocols for Companion Animals: The Veterinarian's Perspective. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, p. 129-132, 2010.

HOSKINS, J.D. Update on canine parvoviral enteritis. **Veterinary Medicine**. v. 92, n.8, p. 694-709, 1997.

HOSKINS, J.D. Doenças Virais Caninas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 5.ed, v. 1. p. 442 - 444, 2004.

HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v.25, p.77-84, 2001.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: Fields, B. Fields Virology. 4.ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2001. cap.55.

KAPIL, S. et al. Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 4044-4047, 2007.

KELLY, W.R. The liver and biliary system, p.319-406. In: Jubb K.F.V., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.), Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego. 747p. 1993.

KOCATURK, M.; MARTINEZ, S.; ERALP, O.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.; YILMAZ, Z. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, p. 478-483, 2010.

LARSON, L., SCHULTZ, R.D. Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? **Veterinary Therapy**, v. 9 n. 2, p. 94-101, 2008.

LENGHAUS, C.; STUDDERT, M.J. Relationships of canine panleucopenia (enterites) and myocarditis parvoviruses to feline panleucopenia virus. **Aust.Vet.J.**, v. 56, p. 152-53, 1980.

LOPEZ DE TURIZO, J.; CORTES, E.; RANZ, A. et al. Fine Mapping of Canine Parvovirus B Cell Epitopes. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2445-2456, 1991.

LOVATO, L.T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, ed. da UFSM, 2007, 888 p.

MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I. A.; THOMPSON, H., P., CORNWELL, H.J.C. Canine parvovirus enteritis 1: Clínica, haematological and pathological features of experimental infection. **Vet.Rec.**, v. 115, p. 201-210, 1984a.

MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I. A.; THOMPSON, H., P., CORNWELL, H.J.C. Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. **Vet. Rec.**, v. 115, p. 453-460, 1984b.

MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; DECARO, N.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; BOZZO, G.; TARSITANO, E.; BUONAVOGLIA, C. Immunogenicity of na Intranasally Administered Modified Live Canine Parvovirus Type 2b Vaccine in Pups with Maternally



Derived Antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, n. 10, v.12, p. 1243-1245, 2005.

MARTINELLO, F., GALUPPO, F., OSTANELLO, F. et al. **Detection of canine parvovirus in wolves from Italy**. *J. Wildl. Dis.* v.33, p.628-631, 1997.

MARULAPPA, S.Y.; KAPIL, S. Simple Tests for Rapid Detection of Canine Parvovirus Antigen and Canine Parvovirus-Specific Antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 1, p. 127-131, 2009.

McCANDLISH, I.A.P. In: DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**, São Paulo, ed. 1º, Roca, 2001, 1075 p.

McCAW, D.L.; HOSKINS, J.D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and the Cat**. Saunders-Elsevier, Canada, p. 63-73, 2006.

McMASTER, G.K.; TRATSCHIN, J.D.; SIEGL, G. Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. **J.Virol.**, v. 38, n. 1, p. 368-371, 1981.

MECH, L.D., KURTZ, H.J., GOYAL, S. **Death of a wild wolf from canine parvoviral enteritis**. *J. Wildl. Dis.* v.33, p.321-322, 1997.

MOCHIZUKI, M.; HARASAWA R.; NAKATANI H.. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. **Vet. Microbiol.**, v. 38, p. 1-10, 1993.

MOOJEN, V.; GONÇALVES, I.; PIZZOL, M. Parvovirose canina : Diagnóstico laboratorial realizado no período de 1980 a 1989, na Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 20, p. 209-223, 1992.

MORAIS, M.P.; COSTA, P.R. Adenoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, ed. da UFSM, 2. ed., 2012, 1008 p.

MORAIS, M.P.; COSTA, P.R. Parvoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, ed. da UFSM, 2007, 888 p.

MURPHY, F.A. et al. Reoviridae. In: **Veterinary Virology**, 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. p. 391.

NAKAMURA, M.; TOHYA, Y.; MIYAZAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; PHUNG, H.T.; NGUYEN, N.P.; HUYNH, L.M.; NGUYEN, L.T.; NGUYEN, P.N.; NGUYEN, P.V.; NGUYEN, N.P.; AKASHI, H. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. **Archives of Virology**, v. 149, p. 2261-2269, 2004.

NAKATA, S.; PETRIE, B.L.; CALOMENI, E.P.; ESTES, M.K. Electron Microscopy procedure influences detection of rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.10, p.1902-1906, 1987.

NELSON, R.; COUTO, C. G. Distúrbios do trato intestinal. In: **Medicina interna de pequenos animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 33, p. 417-447, 2006

OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P.; SANTOS, A.S.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 131-136, 2009.

OTTO, C.M. et al. Recombinant Bactericidal/Permeability- Increasing Protein (rBPI21) for Treatment of Parvovirus Enteritis: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 355-360, 2001.

PARRISH, C.R. The emergence and evolution of canine parvovirus – an example of recent host range mutation. **Seminars in Virology**, v. 5, p. 121-132, 1994.

PARRISH, C.R. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, n. 69, p. 29-40, 1999.

PENSAERT, M.; CALLEBAUT, P.; COX, E. Enteric coronaviruses of animals. In: Kapikian, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. Ed. New York: Marcel-Dekker, 1994, p.627-696.

PEREIRA, C.A.D.; MONEZI, T.A.; MEHNERT, U.; D'ANGELO, M.; DURIGON, E.L. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, n. 75, p. 127-133, 2000.

PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. **Veterinary Microbiology**, n. 124, p. 147-152, 2007.

POLLOCK, R.V.H.; CARMICHAEL, L.E. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. **Infections diseases of the dog and cat**. WB Saunders Company, p. 268-287, 1990.

POLLOCK, R.V.H.; COYNE, M.J. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 555-569, 1993.

PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; GRECO, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Development of nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 80, p. 11-15, 1999.

PRATELLI, A et al. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.550-553, 1999.

PRATELLI, A.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. n. 3, v. 8, p. 612-615, 2001.

PRATELLI, A. Canine Coronavirus Infection. **Recent Advances In Canine Infectious Diseases**, Ithaca, 2005.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, 1989, 223p.

SANCHEZ-MORGADO, J.M., POYNTER, S., MORRIS, T.H., Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain. **Virus Research**, v. 104, p. 27–31, 2004.

SHACKELTON, L.A., PARRISH, C.R., TRUYEN, U., HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of canine parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102, 379-384, 2004.

SHERDING, R.G. Vírus intestinais. In: BIRCHARD, S.J; SHERDING, R.G. **Manual Saunders de Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p.124-131, 1998.

SPIBEY, N.; GREENWOOD, N.M.; SUTTON, D.; CHALMERS, W.S.K.; TARPEY, I. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 48–55, 2008.

STRECK, A.F.; SOUZA, C.K.; GONÇALVES, K.R.; ZANG, L.; PINTO, L.D.; CANAL, C.W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 465-469, 2009.

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. **Small animal gastroenterology**. 2.ed. USA: Wolfe Publishing Limited, p.280-313, 1991.

STROTTMANN, D.M.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L.C.; BARCELOS, L.J.G.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERON, D. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 400-405, 2008.

SVARA, T. et al. Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of dogs with canine parvovirus. **Slovenian Veterinary Research**, v. 40, p. 81-89, 2003.

SWANGO, L.J. Moléstias virais caninas, p.573-588. In: Ettinger S.J & Feldman E.C. (ed.), **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Manole, São Paulo. 3020p. 1997.

TAMS, T. R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: ROCA, 2005. 454p.

TORRES-MEDINA, A., UNDERDAHL, A. Scanning electron microscopy of intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.44, p. 403 – 404, Out. 1980.

TRUYEN, U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, n. 69, p. 47-50, 1999.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, n. 117, p. 9-13, 2006.

TRUYEN U.; PARRISH C.R. Canine and feline host range of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, v. 66, p. 5399-5408, 1992.

TRUYEN, U.; EVERMAN, J.F.; VIELER, F.; PARRISH, C.R. Evolution of canine parvovirus involved in loss and gain of feline host range. **Virology**, v. 215, p. 186-189, 1996.

VIEIRA, M.J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A.L.; DECARO, N.; DESARIO, C.; MULLER, A.; CARVALHEIRA, J.; BUONAVOGLIA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 488-491, 2008.

VONSOVER, A. et al. Identification of feline-and-canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1783-1787, 1993.

ZARNKE, R.L.; EVERMANN, J.; VER HOEF, J.M.; MCNAY, M.E.; BOERTJE, R.D.; GARDNER, C.L.; ADAMS, L.G. Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, n. 4, p. 740-745, 2001