

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Medicina Veterinária

Renata Pidori

**GENÓTIPOS CIRCULANTES EM AMOSTRAS DE CÃES
COM DIARREIA COM SUSPEITA DE PARVOVIROSE
CANINA**

São Paulo

2018

Renata Pidori

**GENÓTIPOS CIRCULANTES EM AMOSTRAS DE CÃES COM
DIARREIA COM SUSPEITA DE PARVOVIROSE CANINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador(a): Prof^aDr^a Adriana Cortez

São Paulo

2018

Renata Pidori

**GENÓTIPOS CIRCULANTES EM AMOSTRAS DE CÃES COM
DIARREIA COM SUSPEITA DE PARVOVIROSE CANINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção de título de Médico Veterinário.

Orientador (a): Prof^aDr^a Adriana Cortez

São Paulo, de de 2018

Banca Examinadora:

Professora Doutora Adriana Cortez

Orientadora

Professor _____

Professor do Curso de Medicina Veterinária

Professor _____

Professor do Curso de Medicina Veterinária

*Dedico este trabalho aos meus pais,
irmão e meus familiares que muito me
apoiaram e incentivaram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, pela força e proteção de sempre.

Agradeço aos meus pais, irmão, e familiares, pelo amor, incentivo, apoio e pela compreensão dos momentos em que estive ausente me dedicando ao meu sonho.

Agradeço a minha orientadora Prof^aDr^a Adriana Cortez, pela disponibilidade e dedicação durante toda a orientação.

Agradeço ao Prof^o Marcos Bryan Heinemann, a Gisele e ao Antônio por todo o ensinamento, agradeço ao laboratório de Zoonoses Bacteriana da USP, pelo espaço cedido para a realização da análise das amostras.

A todos os professores, pelos ensinamentos, pela dedicação, e por acreditar que somos capazes.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, sou eternamente grata.

“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda
a escada. Apenas dê o primeiro
passo”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A parvovirose canina é uma doença altamente contagiosa e caracterizada principalmente por gastroenterite em animais jovens e é causada pelo Parvovirus Canino (CPV). Por ser um vírus não envelopado, pode persistir no ambiente por meses ou anos, pois essa característica lhe confere uma resistência à inativação. O CPV foi isolado pela primeira vez em 1978 e denominado de CPV-2. Espalhou-se rapidamente e em 1980 já era comum em todo o mundo. O CPV-2 sofreu mutações no gene codificante da VP1 e deu origem a duas variantes CPV-2a e CPV-2b, e em 2000, a CPV-2c emergiu, estirpe que é vinculada a casos de manifestações clínicas, inclusive em animais adultos. Em relação à imunoprofilaxia, existe uma preocupação quanto à proteção total das vacinas comercialmente disponíveis contra a essa nova variante virulenta. Enquanto muitos autores sugerem que as vacinas baseadas no tipo CPV-2 ainda são protetoras contra essa variante, outros acreditam que é eficaz contra o vírus homólogo, pois algumas vacinas demonstraram não apresentar reação cruzada com essa nova variante. A identificação e monitoramento das estirpes de CPV que circulam na população canina são importantes na compreensão da evolução viral e do desenvolvimento de medidas para controlar a sua propagação. Para isso, 11 amostras de fezes provenientes de cães com diarreia, oriundas do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, pertencentes a um banco de amostras biológicas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ USP foram sequenciadas para a identificação do genótipo. Das 11 amostras, 10 (90,9%) foram classificadas como pertencente ao genótipo 2b e uma como 2a, resultado esperado, pois o 2b ainda é o genótipo predominante no Brasil.

Palavras-chave: Cães, parvovírus, CPV-2, sequenciamento.

ABSTRACT

The canine parvovirus is highly contagious and characterized mainly by a gastroenteritis in young animals. For being a non-enveloped virus, it can persist in the environment for months or years because this characteristic confers a resistance to inactivation. The virus was first isolated in the 1978 and named CPV-2. Spread quickly and in 1980 was already common throughout the world. The virus was soon subjected to genetic evolution and gave rise to two variants CPV-2a and CPV-2b, and in 2000, a new variant has emerged, the CPV-2c, variant that is linked to cases of clinical manifestations, including in adult animals. Regarding immunoprophylaxis, there is a concern as to the full protection of commercially available vaccines against this new virulent variant. While many authors suggest that vaccines based on CPV-2 are still protective against this variant, others believe that it is effective against the virus counterpart, because some vaccines showed no cross-reactivity with this new variant. The identification and monitoring of CPV strains circulating in the canine population are important in the understanding of viral evolution and the development of measures to control your spread. To this end, 11 stool specimens from dogs with diarrhea from the Veterinary Hospital of the UFMG Veterinary School belonging to a bank of biological samples from the Laboratory of Bacterial Zoonoses of FMVZ USP were sequenced to identify the genotype. Of the 11 samples, 10 (90,9 %) were classified as belonging to genotype 2b and one as 2a, expected result because the 2b is still the predominant genotype in Brazil.

Key words:Dogs, parvovirus, CPV-2, sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da variante CPV-2a em cães domésticos.....16

Figura 2. Distribuição mundial da variante CPV-2b em cães domésticos.....16

Figura 3. Distribuição mundial da variante CPV-2c em cães domésticos.....17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 ETIOLOGIA.....	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	13
2.3 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL	15
2.4 PATOGÊNESE, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS	17
2.5 DIAGNÓSTICO	19
2.7 TRATAMENTO.....	20
2.8 PROFILAXIA.....	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVOS GERAIS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS	24
4.2 IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	24
5. FORMA DE ANÁLISE.....	25
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSSÃO	26
8. CONCLUSÃO	29
9. REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) pertence à família *Parvoviridae*, é um vírus não envelopado e seu genoma é constituído por bases de DNA de cadeia simples. É resistente à inativação e podem persistir no ambiente por meses ou anos (Lamm e Rezabek, 2008)

O CPV-2 foi identificado pela primeira vez, em 1978, nos Estados Unidos. Devido à falta de imunidade pré-existente da população canina, o vírus espalhou-se rapidamente e, em 1980, foi relatado como sendo comum em todo o mundo (Goddard e Leisewitz, 2010). Logo após o seu aparecimento, o CPV-2 evoluiu dando origem consecutivamente a duas variantes antigênicas, a CPV-2a e CPV-2b, que substituíram progressivamente o tipo original (Decaro e Buonavoglia, 2012). Na última década, uma nova estirpe, o CPV-2c, emergiu, essa estirpe foi relatada pela primeira vez na Itália em 2000 (Goddard e Leisewitz, 2010).

A parvovirose canina é altamente contagiosa e é caracterizada principalmente por uma gastroenterite em animais jovens, também pode causar uma miocardite em animais infectados no útero ou logo após o nascimento, raramente visto nos dias de hoje (Miranda *et al.*, 2015).

Inicialmente, as taxas de morbidade e mortalidade foram altas, após a introdução de vacinas para a população canina, os surtos foram limitados a animais não vacinados ou vacinados de forma inadequada e a situações de abrigo com as populações selvagens ou abandonadas (Lamm e Rezabek, 2008).

A indentificação e monitoramento das estirpes de CPV que circulam na população canina são importantes na compreensão da evolução viral e do desenvolvimento de medidas para controlar a sua propagação (Pinto *et al.*, 2012), incluindo a preocupação quanto à proteção total conferida pelas vacinas comercialmente disponíveis contra as novas variantes virulentas de CPV (Castro *et al.*, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O parvovírus canino (CPV) pertence à família *Parvoviridae* (Peres et al., 2007), essa, subdividida em *Parvovirinae* e *Densovirinae*, infectando, respectivamente, vertebrados e insetos. O gênero *Protoparvovirus* (Miranda e Thompson, 2016) e mais quatro gêneros, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*, pertencem à subfamília *Parvovirinae* (Decaro e Buonavoglia, 2012). No gênero *Protoparvovirus* estão incluídas as seguintes espécies, parvovírus canino (CPV), vírus da panleucopenia felina (FPV), enterite viral do cão (MEV) e parvovírus do guaxinim (RPV) (Decaro e Buonavoglia, 2012; De la Torre et al., 2018), essas espécies infectam vários mamíferos, como porcos, roedores, carnívoros domésticos e selvagens (Hoelzer e Parrish, 2010).

O CPV é um vírus pequeno, não envelopado, possui um capsídeo icosaédrico, com aproximadamente 25 nm de diâmetro (Miranda e Thompson, 2016). Seu genoma consiste em uma molécula de DNA linear, de cadeia simples e polaridade negativa de aproximadamente 5200 nucleotídeos (De la Torre et al., 2018), com duas fases abertas de leitura (ORFs), Uma delas é responsável pela codificação de duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2), e a outra, por duas proteínas estruturais (VP1 e VP2) que formam um capsídeo de 60 unidades proteicas, 54 e 6 unidades, de VP2 e VP1, respectivamente (Miranda e Thompson, 2016; De la Torre et al., 2018). Esse capsídeo é altamente antigênico, tem papel importante na determinação do hospedeiro e no tropismo de tecidos. Já as proteínas não estruturais possuem inúmeras funções, dentre elas, replicação do genoma (Hoelzer e Parrish, 2010).

Devido à ausência de um envelope, o parvovírus é altamente resistente à inativação por desinfetantes, variações de temperatura e pH, características que favorecem a disseminação do vírus, podendo persistir no ambiente por meses ou anos. É sensível apenas ao formol e ao hipoclorito de sódio a

5%.(Lamm e Rezabek, 2008). O hipoclorito é eficaz quando a exposição do agente ao desinfectante dura por pelo menos 1 hora (Prittie, 2004).

O vírus causador da parvovirose canina é conhecido como parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), isolado pela primeira vez em 1978, foi assim denominado pois foi o segundo parvovírus descrito em cães. Em 1967, o parvovírus foi relatado, pela primeira vez, e denominado MVC (minute vírus of canine), posteriormente, ficou conhecido como parvovírus canino tipo 1 (CPV-1) (Carmichael, 2005; Goddard e Leisewitz, 2010). O CPV-1 é de origem desconhecida e está mais relacionado com o parvovírus bovino (BPV), geralmente as infecções são assintomáticas (Lamm e Rezabek, 2008).

A origem do CPV-2 ainda é questionável. Várias publicações especulam que pode ter se originado a partir do vírus da panleucopenia felina (FPV), este conhecido desde 1920 (Decaro et al., 2009), e outras pesquisas, sugerem que o CPV-2 e o FPV possuem uma origem a partir de um antepassado antigenicamente semelhante de carnívoros selvagens (Truyen, 2006; Hong *et al.*, 2007; Goddard e Leisewitz, 2010), já que esses vírus tem mais de 98% da sequência do DNA iguais (Miranda e Thompson, 2016).

O CPV-2 foi identificado pela primeira vez em 1978, nos Estados Unidos e espalhou-se rapidamente, em 1980 foi relatado como comum em todo o mundo (Goddard e Leisewitz, 2010), dele derivaram duas variantes, CPV-2a e CPV-2b, que logo substituíram o tipo original (Decaro e Buonavoglia, 2012). Em 2000 foi relatada, na Europa, uma nova estirpe, a CPV-2c (De la Torre *et al.*, 2018).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo parvovírus tem sido relatada em cães domésticos e selvagens, coiotes e raposas, além de outros animais selvagens. Nos gatos, as variantes do CPV-2 são capazes de infectar e se replicarem, causando uma doença semelhante ao FPV (Miranda e Thompson, 2016). Nos cães

domésticos, o vírus infecta qualquer raça, idade ou sexo. Os filhotes entre 6 semanas e 6 meses de idade são mais suscetíveis, alguns fatores como a falta de imunidade materna, infestação por parasitas e condições estressantes podem justificar essa maior susceptibilidade, e algumas raças, como Rottweiler, Doberman, Pinscher, Pit bull terrier, Labrador retriever e Pastor alemão aparentam ter maior suscetibilidade (Goddard e Leisewitz, 2010; Miranda *et al.*, 2015).

Em 1978, houve um surto de uma enterite contagiosa e desconhecida nos Estados Unidos. O agente foi isolado e identificado como uma nova espécie de Parvoviridae, chamada de CPV-2 (Pereira *et al.*, 2000; Goddard e Leisewitz, 2010). Dentro de alguns meses o CPV-2 se espalhou, e casos foram relatados na Ásia, Austrália, Nova Zelândia, América e na Europa (Miranda e Thompson, 2016) com altas taxas de morbidade e mortalidade, mas com o uso da vacina diminuíram, sendo os surtos posteriores relacionados a animais não vacinados ou vacinados inadequadamente e animais de abrigos (Goddard e Leisewitz, 2010). Alguns estudos moleculares e filogenéticos mostram o CPV-2 surgiu no início da década de 1970, alguns anos antes do seu reconhecimento (Hoelzer e Parrish, 2010) e desapareceu por volta de 1981 (Charmichael, 2005).

Durante o ano de 1979, uma nova variante emergiu e foi designada CPV-2a. Essa nova estirpe difere da CPV-2 em apenas cinco ou seis aminoácidos (Buonavoglia *et al.*, 2001; Mohan *et al.*, 2010) da proteína de revestimento (VP2) (Peres Ruben *et al.*, 2007). As modificações nos aminoácidos nas posições 87 (Met para Leu), 300 (Ala para Gly) e 305 (Asp para Tyr) permitiram a replicação em gatos, e houve outras alterações na proteína do capsídeo, nas posições 101 (Ile para Thr), 297 (Ser para Ala) e 555 (Val para Ile) (Miranda e Thompson, 2016; Hoelzer e Parrish, 2010).

Esse vírus sofreu outra alteração antigênica (Buonavoglia *et al.*, 2001) e em 1984, nos Estados Unidos, foi detectado e definido como CPV-2b (Miranda e Thompson, 2016). Esse difere do CPV-2a apenas em duas posições 426 (Asn para Asp) e 555 (Ile para Val) (Buonavoglia *et al.*, 2001; Miranda e Thompson, 2016). Essas duas variantes substituíram

progressivamente o tipo original e possuem distribuição mundial (Decaro e Buonavoglia, 2012).

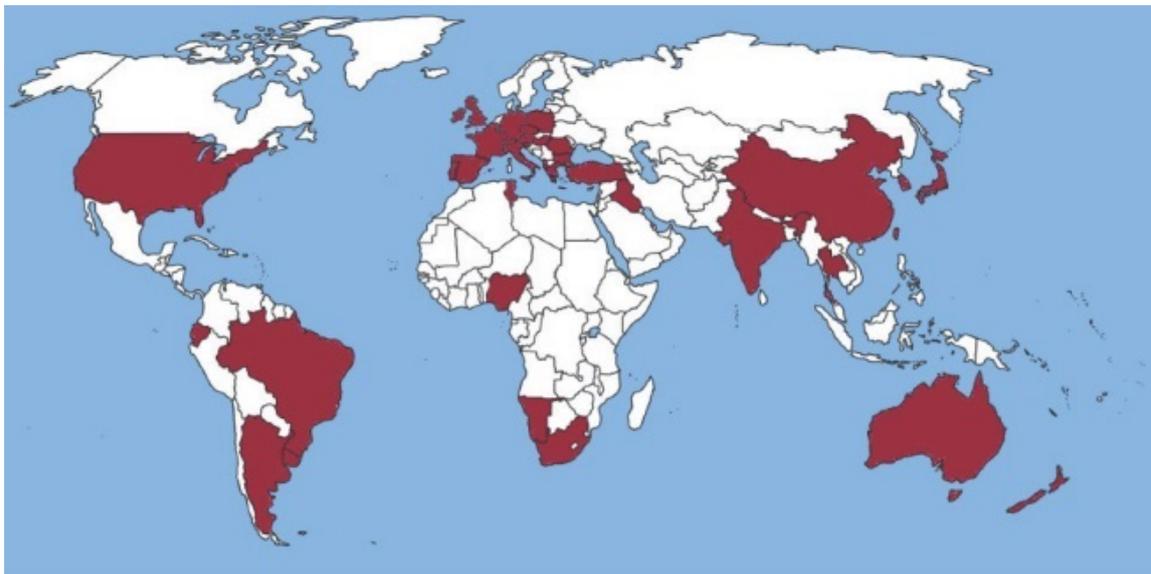
No ano de 2000, uma nova estirpe nomeada de CPV-2c emergiu, foi relatada pela primeira vez na Itália (Mittal *et al.*, 2014) e, em seguida, no Vietnã, Espanha, Estados Unidos, América do Sul, Portugal, Alemanha e Reino Unido (Goddard e Leisewitz, 2010). É distinguível de CPV-2a e CPV-2b pela substituição de Ácido Glutâmico (Glu) no lugar da Asparagina (Asn) (CPV-2a) ou do Ácido Aspártico (Asp) (CPV-2b) na posição 426 (Hong *et al.*, 2007; Streck *et al.*, 2009; Duque-Garcia *et al.*, 2017). Esta variante é altamente virulenta, com elevada morbidade e mortalidade (Goddard e Leisewitz, 2010). Animais adultos, que não eram infectados com frequência, são mais susceptíveis, e as vacinas atuais tem eficácia duvidosa em relação a esta nova variante, o que favorece o surgimento de surtos da doença (Lamm e Rezabek, 2008).

2.3 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

Com a substituição do CPV-2 pelo CPV-2a houve uma disseminação viral e, no fim de 1983, a infecção por CPV já havia sido descrita em 50 países, localizados no continente Africano, Asiático, Americano e Europeu, ganhando uma proporção mundial (Decaro *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007). Essa disseminação ocorreu graças à circulação de cães e proprietários, seja ela por via aérea, terrestre ou marítima (Carmichael, 2005).

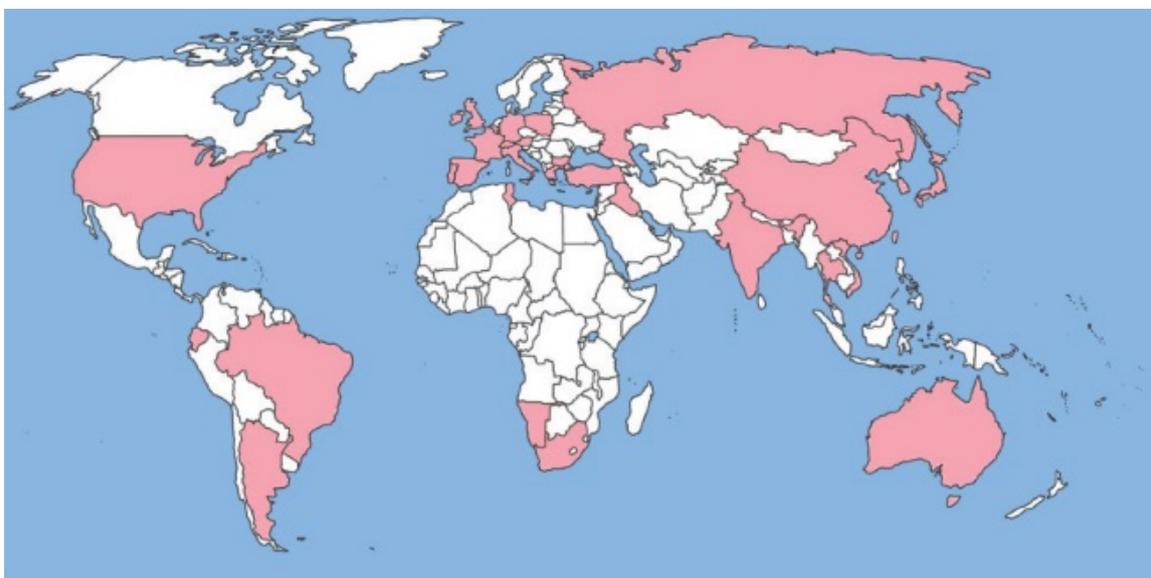
As variantes de CPV-2 foram relatadas em diversos países, distribuídos em cinco continentes, como mostram as figuras 1, 2 e 3. O CPV-2a foi relatado em 37 países, o CPV-2b em 31 países e o CPV-2c em 21 países. Em 15 países todas as variantes estão presentes, principalmente no continente Europeu e no Sul Americano (Castanheira *et al.*, 2014; Miranda e Thompson, 2016). Atualmente a CPV-2c tem se espalhado, ocorrendo em regiões do continente europeu e na América do Sul, sendo prevalente no Brasil, Argentina e Uruguai (Miranda e Thompson, 2016).

Figura 1. Distribuição mundial da variante CPV-2a em cães domésticos



Fonte: (Miranda e Thompson2016)

Figura 2. Distribuição mundial da variante CPV-2b em cães domésticos.



Fonte: (Miranda e Thompson 2016)

Figura 3. Distribuição mundial da variante CPV-2c em cães domésticos.



Fonte: (Miranda e Thompson 2016)

2.4 PATOGÊNESE, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS

A principal via de transmissão do vírus é a fecal-oral, o animal pode entrar em contato com as fezes contaminadas ou entrar em contato com fômites contaminados. A replicação viral ocorre no núcleo de células que estão em constante processo mitótico, como células epiteliais das criptas intestinais, células precursoras da medula óssea e células do miocárdio (Lamm e Rezabek, 2008; Patel e Heldens, 2009; Goddard e Leisewitz, 2010). A excreção viral pelas fezes é iniciada 3 dias após a infecção do vírus e pode perdurar por até 3 ou 4 semanas após a doença clínica ou subclínica (Goddard e Leisewitz, 2010).

Após o animal entrar em contato com o vírus, o agente infecta o hospedeiro e replica-se no tecido linfoide da orofaringe, em linfonodos mesentéricos e no timo (Goddard e Leisewitz, 2010). Após 3 a 5 dias, ocorre uma disseminação por via hematogena através de leucócitos infectados no epitélio germinativo das criptas do intestino delgado, resultando em uma

viremia, permitindo que o vírus alcance vários órgãos, caracterizando uma doença sistêmica (Lamm e Rezabek, 2008; Decaro e Buonavoglia, 2012). Com a viremia instalada, o vírus localiza-se predominantemente em epitélio que reveste a língua, a cavidade oral, o esôfago, o intestino delgado, a medula óssea e em tecido linfoide. O vírus pode ser encontrado nos pulmões, baço, fígado, rins e miocárdio (Goddard e Leisewitz, 2010), sendo que este é ocasionado em cães infectados ainda no útero ou logo após o nascimento (Miranda *et al.*, 2015).

Os sinais clínicos ocorrem após um período de incubação, que varia de 3 a 7 dias, e consistem em anorexia, episódios eméticos, diarreia mucoide seguida de hemorrágica, depressão, desidratação e febre ou hipotermia (Lamm e Rezabek, 2008; Miranda *et al.*, 2015; Dela Torre *et al.*, 2018). A forma clínica mais característica é uma enterite hemorrágica, isso ocorre, pois ao infectar o epitélio germinal da cripta intestinal, o vírus provoca uma necrose das criptas e um colapso das vilosidades, tendo como consequência a perda da capacidade de absorção do intestino delgado, levando ao quadro de desidratação (Goddard e Leisewitz, 2010; Decaro e Buonavoglia, 2012). Podem ocorrer sinais de septicemia, pois devido ao dano causado no epitélio intestinal, há uma translocação de bactérias oportunistas e absorção de toxinas bacterianas (Goddard e Leisewitz, 2010). O parvovírus não afeta todos os cães da mesma forma, as manifestações clínicas e o prognóstico dependem de quão virulenta é a estirpe, carga infectante, da imunidade, idade e raça do hospedeiro, e se há presença concomitante de outros patógenos entéricos (Lamm e Rezabek, 2008).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos não são específicos para diagnosticar a doença, porém são de extrema importância para excluir diagnósticos diferenciais, avaliar a resposta ao tratamento e determinar um prognóstico (Castro *et al.*, 2013). Os achados mais frequentes foram a leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, hipoglicemia, hipoproteinemia e hipoglobulinemia (Castro *et al.* 2013), portanto devem ser considerados sugestivos da parvovirose canina. E quando o filhote apresentou leucopenia e hipoglicemia, a taxa de sobrevivência foi menor (Castro *et al.* 2013). A anemia

não é um achado incomum na parvovirose canina e é provável que seja um resultado da hemorragia intestinal associada à terapia de reidratação (Goddard e Leisewitz, 2010).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico *antemortem* pode ser clínico, que é sugestivo e se faz necessário uma boa anamnese associada a um exame físico completo (Battersby e Harvey, 2006), porém não é confirmatório, pois vários outros agentes podem causar as mesmas manifestações clínicas em cães, como coronavírus, adenovírus, rotavírus entre outros (Decaro e Buonavoglia, 2012). Dessa forma, sempre que há a suspeita, devem ser realizados exames laboratoriais, sejam eles para descartar diagnósticos diferenciais ou definir um diagnóstico (Lara, 2000; Travassos, 2009).

Os testes laboratoriais disponíveis comercialmente podem detectar a presença do agente nas fezes de animais infectados, que é o caso da imunocromatografia (SNAP) e a hemaglutinação (HA), podem visualizar o agente por meio da microscopia eletrônica, além de detectar o genoma do CPV, através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e por fim, necropsia com histopatológico, que é realizado *post mortem* (Vieira, 2011; Decaro e Buonavoglia, 2012; Silva *et al.*, 2013).

O SNAP é comumente utilizado, além de ser um teste rápido e simples de ser executado, pode ser usado a campo. É um imunoenensaio enzimático (EIA) e possui alta especificidade, porém baixa sensibilidade (46%) (Desario *et al.*, 2005). As partículas virais são detectadas nas fezes depois de 4 a 7 dias da inoculação; depois de 10 a 12 dias, o vírus é indetectável, podendo ter um resultado falso-negativo (Goddard e Leisewitz, 2010). O resultado pode ser falso-positivo quando a amostra é de um animal vacinado por via oral, quando deveria ser por via subcutânea, ou quando se realiza o teste entre o quarto e décimo dia após a vacinação com vacina com vírus modificado (Lamm e Rezabek, 2008; Goddard e Leisewitz, 2010; Decaro e Buonavoglia, 2012).

Os testes de EIA, HA e PCR foram capazes de detectar todas estirpes do CPV-2, inclusive o CPV-2c (Silva *et al*/2013). Já Lamm e Rezabek(2008)sugeriram que as falhas, ou seja, os falso-negativos no SNAP podem ter relação com a baixa reação cruzada para essa nova variante.

2.6 TRATAMENTO

O tratamento para animais infectados consiste em tratamento de suporte, não há nada de específico para a parvovirose, portanto o objetivo é tratar os sinais (Lamm e Rezabek, 2008).

Nos casos de desidratação,a fluidoterapia intravenosa é indispensável,pois esses animais apresentam um quadro de hipovolemia, e se faz necessário à reposição dos fluidos perdidos através do vômito e da diarreia (Goddard e Leisewitz, 2010). Inicialmente, usa-se o Ringer com lactato, uma solução isotônica, ou seja, eletrolíticamente balanceada. A taxa de reposição vai depender das condições do animal, por exemplo, se o cão apresenta choque hipovolêmico, a taxa inicial é de 90 mL/kg/h, e a reposição deve ser feita dentro de 1 a 2 horas. Já os animais que não apresentam choque, apenas desidratação, a taxa é equivalenteao resultado da multiplicação da porcentagem de desidratação pelo peso corporal em quilogramas. Assim que o animal apresenta uma hidratação adequada, inicia se a taxa de manutenção, que equivale de 4 a 10 mL/kg/h (Prittie, 2004).

Os filhotes infectados tendem a apresentar hipoglicemia e hipocalemia, isso ocorre devido à anorexia, êmese e diarreia. Ambos devem ser repostos de acordo com a necessidade do paciente (Prittie, 2004; Goddard e Leisewitz, 2010).

Animais que apresentam anorexia há mais de 24 horas precisam de uma nutrição microenteral, ou seja, administração em pequenas quantidades de água, eletrólitos e nutrientes facilmente absorvidos (Battersby e Harvey, 2006). Segundo Mohret *al* (2003), filhotes que recebem nutrição entérica por

sonda nasoesôfágica, tem ganho de peso e melhoria na função da barreira intestinal, o que limita a translocação de bactérias e de endotoxinas.

Os animais que apresentam vômitos devem ser medicados com antieméticos, esses vômitos são causados devido à destruição de células das criptas intestinais e da alteração na motilidade intestinal. Os fármacos mais utilizados são a metoclopramida, proclorperazina e ondansetrona. O uso de metoclopramida deve ser cauteloso, pois há o aumento do peristaltismo do trato gastrointestinal, o que pode levar a uma intussuscepção (Goddard e Leisewitz, 2010).

O uso de antibioticoterapia, de forma preventiva a uma infecção bacteriana secundária, é preconizado em animais que apresentam uma leucopenia grave e provável alteração da barreira intestinal. Usa-se antibióticos de amplo espectro, e geralmente é feita uma associação de ampicilina (betalactâmico) com gentamicina (aminoglicosídeo) (Prittie, 2004; Goddard e Leisewitz, 2010).

Quando o tratamento é feito de forma adequada, aproximadamente 75% dos animais respondem bem a terapia. Uma vez recuperado da doença, o animal adquire imunidade duradoura contra a variante (Lamm e Rezabek, 2008).

2.7 PROFILAXIA

A imunização dos animais susceptíveis é essencial na prevenção de doenças infecciosas. No caso dos cães, essa imunidade pode ser de forma passiva, origem placentária e/ou colostrar, e de forma ativa, por meio da vacinação. Devido ao tipo de placenta dos cães, classificada como endoteliocorial, apenas de 1 a 7% do total de imunoglobulina G (IgG), adquiridos passivamente, são de origem placentária. A maior parte dessas imunoglobulinas são ingeridas através do colostro e absorvidas pela mucosa intestinal, isso ocorre durante as primeiras horas de vida, pois a mucosa intestinal é imatura e essas macromoléculas tem a capacidade de

atravessa lá e chegar até a circulação sanguínea (Goddard e Leisewitz, 2010; Mila *et al.*, 2017).

Quando a transferência da imunidade passiva, via colostro, é feita de forma adequada, há a diminuição do risco de doenças infecciosas e de mortes neonatais (Mila *et al.*, 2014), portanto, em casos que não ocorre a ingestão do colostro, seja por conta da não produção ou dificuldade na sucção, medidas devem tomadas, como por exemplo, um banco de colostro e o uso de plasma canino por via oral (Mila *et al.*, 2017).

Há diversas vacinas eficazes contra o parvovírus canino, porém as vacinas de escolha são as que possuem um vírus atenuado, com alto título e baixa passagem, ou seja, com uma grande quantidade do vírus e com uma baixa virulência (Prittie, 2004; Goddard e Leisewitz, 2010). O protocolo de vacinação deve ser seguido minuciosamente para que não haja falhas na imunização. Em geral, recomenda-se 3 doses ou mais da vacina. O protocolo deve ser iniciado entre a 6ª e a 9ª semana de vida do animal e repetida a cada 21 a 28 dias, até que animal complete 16 semanas de idade. A vacinação de reforço deve ser realizada de 6 a 12 meses após a última dose e quando adulto, o reforço é de 1 a 3 anos. O protocolo depende do resultado da sorologia para avaliação dos títulos de anticorpos, e este deve ser feito anualmente. Vale lembrar que o excesso de vacinação aumenta o risco de doença imunomediada (Lamm e Rezabek, 2008; Goddard e Leisewitz, 2010; Altman *et al.*, 2017).

A interferência dos Anticorpos de Origem Materna (MDA) na imunização ativa dos filhotes é conhecida desde os primeiros estudos após o isolamento do CPV-2 (De Cramer *et al.*, 2011). Essa interferência leva a uma janela de suscetibilidade, presente entre a idade de 40 a 69 dias, sendo essa a causa mais comum para a falha da vacinação, pois os anticorpos maternos são capazes de neutralizar a vacina de CPV-2. (Lamm e Rezabek, 2008; Goddard e Leisewitz, 2010; Altman *et al.*, 2017). A fim de diminuir essa janela de suscetibilidade e diminuir as falhas, recomenda-se que, em canis infectados, o protocolo de vacinação em filhotes seja iniciado com 4 semanas de vida (De Cramer *et al.*, 2011). Segundo Lamm e Rezabek, (2008), a eficácia da vacina

varia de acordo com a presença de anticorpos maternos. Foi observado que quando administrada em filhotes com 6 semanas de vida, a eficácia é de 25%, já em animais a partir de 18 semanas de vida, é de 95%.

Outra causa para a falha da vacinação é a diferença entre as variantes do parvovírus canino circulantes e as variantes utilizadas na produção da vacina. A grande maioria das vacinas disponíveis no mercado são produzidas a partir do CPV-2, uma variante já extinta, e outras são produzidas a partir da variante CPV-2b. Não existem vacinas a partir do CPV-2a e CPV-2c (Altman *et al.*, 2017). Enquanto muitos autores sugeriram que as vacinas baseadas no tipo CPV-2 são protetoras contra as variantes, outros acreditam que é eficaz contra o vírus homólogo, mas é significativamente menor contra as novas variantes (Castro *et al.*, 2010), permitindo, então, a infecção por estirpes virulentas. O ideal seria o uso de vacinas produzidas a partir das variantes que circulam na determinada região (Decaro *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Decaro *et al.* (2008), na Itália, foi investigado um surto de gastroenterite aguda em um canil, onde animais adultos, devidamente vacinados, com a vacina a partir do CPV-2, foram infectados. Concluiu-se que a cepa altamente patogênica do CPV-2c infectou esses cães adultos, ou seja, nesse caso, a vacina de CPV-2 não foi capaz de garantir uma proteção adequada e esses animais tiveram manifestações clínicas e alguns morreram.

Além da vacinação, outras medidas de profilaxia são recomendadas, como evitar passeios de animais não imunizados em ambiente com alto risco, como locais gramados e que tenham cães de procedência e protocolo vacinal desconhecidos (Altman *et al.*, 2017), e é importante respeitar a quarentena de animais recentemente introduzidos. As boas práticas de higiene também são incluídas na profilaxia. Vale lembrar que o parvovírus canino é altamente resistente, portanto, a desinfecção do ambiente, dos objetos e das roupas que entram em contato com um animal infectado deve ser de forma cuidadosa e adequada, pois, quando higienizados de forma incorreta, o agente pode persistir por 5 meses ou mais (Lamm e Rezabek, 2008; Goddard e Leisewitz, 2010; Altman *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar os genótipos circulantes em amostras de cães com diarreia com suspeita de parvovirose canina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram sequenciadas 11 amostras de DNA de parvovírus canino obtidas em amostras de fezes diarreicas de cães, oriundas do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, pertencentes a um banco de amostras clínicas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ USP. O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o número 38/2017.

4.2 IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

O DNA viral foi extraído por meio do kit comercial *Pure Link Genomic* (Invitrogen®). Para a amplificação parcial do gene da VP2 foi utilizado o set de primers 555For(5'-CAGGAAGATATCCAGAAGGA-3') /555Rev(5'-GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA-3') (4003–4585) que gera um fragmento de 583 pb, que incluem os *hotspots* das posições de aminoácido 426 e 555.

A reação de sequenciamento de DNA foi feita com o kit comercial BigDye 3.1 (AppliedBiosystems™), sendo que as sequências foram resolvidas em sequenciador automático ABI-3500 (AppliedBiosystems®). Os cromatogramas gerados foram interpretados pelo aplicativo *Phred* para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com score superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos). Em seguida as sequências foram montadas com o programa CAP3 e sendo a mesma

submetida ao BLASTn para confirmação da identidade das amostras positivas. As sequências obtidas foram editadas por meio do programa BioEdit 7.2.5 e neste mesmo programa os *hotspots* foram identificados. As sequências de parvovírus canino usadas como referência estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Sequências de referência, tipo e posição dos hotspots.

GenBank	Tipo	426	555
M38245 (EUA)	CPV-2	G (Asp)	AAT (Asn)
M24000 (EUA)	CPV-2 ^a	T (Tyr)	AAT (Asn)
DQ340434 (BR)	CPV-2 ^a	T (Tyr)	AAT (Asn)
DQ340409 (BR)	CPV-2b	T (Tyr)	GAT (Asp)

5 FORMA DE ANÁLISE

A análise foi feita de forma descritiva.

6 RESULTADOS

Das 11 amostras sequenciadas, 10 (90,9%) foram classificadas como pertencente ao genótipo 2b e uma como 2a.

7 DISCUSSÃO

Dentre as enterites infectocontagiosas, a de origem viral foi reconhecida, a partir da década de 70, como a principal causa, e afeta principalmente cães com até 6 meses de idade. O parvovírus canino e o coronavírus canino são os principais agentes responsáveis por essas infecções virais (Tams, 2005; McCaw e Hoskins, 2006).

Embora as manifestações clínicas da gastroenterite sejam sugestivas para a parvovirose canina, a confirmação, através de exames laboratoriais, é indispensável (Monteiro *et al.*, 2016). O diagnóstico precoce e definitivo é essencial para o tratamento da doença e controle do agente. Devido à prevalência e a resistência do parvovírus canino, esse vírus se destaca por apresentar alta taxa de morbidade e mortalidade em populações susceptíveis, apresentando grande importância na clínica médica de pequenos animais (Otto *et al.*, 2001; Travassos, 2009).

Os animais que são mais propensos a gastroenterite causada por parvovírus, são animais entre 6 semanas e 6 meses de idade, não vacinados. Nesse estudo, esses dados não foram obtidos, porém, já foram confirmados em um estudo feito por Pinto *et al* (2012), em que 95,2% dos animais positivos tinham entre 1 a 6 meses de idade.

Todas as 11 amostras foram coletadas de animais que apresentavam diarreia, porém é sabido que o grau da severidade da doença e das manifestações clínicas varia de acordo com a carga viral, virulência da cepa, da ação da imunidade passiva e do sistema imune do animal infectado, portanto, animais infectados podem não apresentar diarreia. No estudo do Pinto *et al* (2012), de 42 animais positivos para parvovirose, 12, ou seja, 28,57% não apresentavam sinais de gastroenterite hemorrágica (GEH). Já no estudo realizado em Porto Alegre, por Reis (2013), de 144 animais positivos, 13 (30,95%) animais não apresentavam GEH. Ambos os estudos tiveram resultados semelhantes, firmando que animais podem não apresentar GEH.

Questionamentos a respeito de mutações de um vírus com genoma DNA surgiram assim que o CPV-2 emergiu e dispersou-se pelo mundo, e depois de 3 anos já havia sido substituído por suas variantes. Durante a replicação viral podem ocorrer substituições de nucleotídeos, o que leva a uma evolução antigênica, surgindo novas variantes, podendo causar um impacto negativo sobre a saúde dos cães (Peres *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2010; Rathje, 2010; Dos Reis, 2013).

Das 11 amostras sequenciadas, 10 foram classificadas como pertencente ao genótipo 2b e uma como 2a. Nenhuma amostra foi compatível com o genótipo 2c. Essa variante, apesar de não ter sido encontrada nesse estudo, já foi identificada na América do Sul, e inclusive no Brasil. A primeira descrição na América do Sul foi feita por Peres *et al* (2007), através de estudo realizado no Uruguai, em 2006, onde foram coletadas 30 amostras de fezes de cães vacinados e não vacinados, com suspeita de parvovirose canina. Das 30 amostras com suspeita de parvovirose canina, 25 foram positivas e 24 foram compatíveis com o genótipo 2c, ou seja, presença de um Ácido Glutâmico (Glu) na posição 426. Esse resultado indica que o tipo 2c é prevalente no Uruguai.

Já no Brasil, a primeira detecção foi feita no ano de 2008, por Streck *et al* (2009), onde foram coletadas 20 amostras de fezes de animais com diarreia, vacinados e não vacinados, residentes de Porto Alegre. Das 9 amostras positivas, 7 foram descritas como o tipo 2c, e as outras duas, como tipo 2b. Em outro estudo, realizado por um grupo de pesquisadores do Rio Grande do Sul, 78,6% das amostras coletadas entre 2008 e 2010, oriundas de seis estados brasileiros, foram positivos para CPV-2c, sendo que, 6 amostras eram de animais vacinados adequadamente. Nesse estudo concluiu-se que, entre os anos de 2008 e 2010, o genótipo CPV-2c foi predominante (Pinto *et al.*, 2012). Ambos os resultados diferem do resultado desse estudo, pois nesse houve maior prevalência do genótipo CPV-2b.

Um estudo mais recente, Monteiro *et al.* (2016) obtiveram um resultado semelhante ao desse trabalho. Das 20 amostras sequenciadas, oriundas do

estado de São Paulo, 18 foram classificadas como CPV-2b, e 2 como CV-2c. Ambos os estudos mostram que o genótipo CPV-2b é predominante.

Uma das maiores preocupações, quanto à predominância do genótipo 2c, está relacionada com a proteção que as vacinas atuais conferem para os animais contra essa nova variante. Nesse estudo, o histórico vacinal é desconhecido, porém alguns estudos demonstram que as vacinas produzidas com CPV-2 ou com CPV-2b não protegem contra o genótipo CPV-2c. Em um estudo realizado nos Estados Unidos (Hong *et al.* 2007), o protocolo vacinal não impediu a infecção por CPV-2c. Das 27 amostras positivas para o CPV-2, 7 foram classificadas como CPV-2c, e todas foram colhidas de animais devidamente vacinados.

Outro estudo, realizado na Itália, também obteve resultados que questionam a eficácia das vacinas contra o CPV-2c. Decaro *et al.* (2008) descreveram um surto de gastroenterite aguda em um canil com 98 cães (60 Bernese, 35 dachshunds e 3 collies), todos eles vacinados adequadamente, com vacina produzida a partir do vírus CPV-2. Dos 98 cães, 11 apresentaram manifestações clínicas, com idade entre 6 meses e 2 anos e meio, destes, 1 veio a óbito. As amostras foram positivas quando submetidas à realização do teste imunocromatográfico (SNAP), e posteriormente o genótipo CPV-2c foi descrito. Os autores concluíram que a imunidade induzida pela variante da vacina não garantiu uma proteção eficaz contra uma variante de campo, portanto é alta a possibilidade de uma variante 2c infectar cães vacinados com a variante CPV-2 ou CPV-2b.

Com os resultados citados anteriormente e muitos outros obtidos, fica claro que o parvovírus apresenta uma mutação genética importante e isso implica na proteção vacinal, tornando-se necessário o acompanhamento da diversidade viral, da distribuição geográfica e da prevalência dos genótipos em cada região, pois há a necessidade de formulação de vacinas específicas, ou seja, vacinas a partir de estirpes do CPV que circulam em determinada área, levando em conta o CPV-2c (Peres *et al.*, 2007).

8 CONCLUSÃO

Houve predominância do genótipo CPV-2b (90,9%) nos cães com sintoma compatível com parvovirose canina.

REFERÊNCIAS

Altman, K. D., Kelman, M., & Ward, M. P. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Veterinary Microbiology*; 2017; 210, 8–16.

Antunes, Jéssica dos Reis. Detecção, caracterização e diagnóstico diferencial de parvovírus. 2013. 2010. Trabalho de conclusão de curso (graduação)– Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Battersby I, Harvey A, Differential diagnosis and treatment of acute diarrhoea in the dog and cat. In *Pract.* 2006;(28):480-488

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. *J Gen Virol*; 2001, 82:3021-3025

Castanheira P, Duarte A, Gil S, Cartaxeiro C, Malta M, Vieira S & Tavares L. Molecular and serological surveillance of canine enteric viruses in stray dogs from Vila do Maio, Cape Verde. *BMC Vet Res* 2014; 10

Castro, T.X., Costa, E.M., Leite J.P., Labarthe N.V., Cubel Garcia R.C.N, 2010. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Research in Veterinary Science* 90 (2011) 336–340

Castro, Tatiana X., N. Cubel Garcia, Rita de Cássia, Gonçalves, Luciana P.S., Costa, Erika M., Marcello, Gracy C.G., Labarthe, Norma V., Mendes-de-Almeida, Flavya. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*; 2013; 54. 885-8.

Carmichael LE. An Annotated Historical Account Of Canine Parvovirus. *J. Vet. Med.* 2005 (52): 303-311

Decaro N, Desario C, Addie D D, Martella V, Vieira M J, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G & other authors. The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 2007;(13):1222 – 1224.

Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. Evidence for immunisation in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Micro* 2008;(31): 125-130

Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Buonavoglia, C. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* (2009), 385(1), 5–10.

Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus - A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Mic* 2012;(155):1-12

De Cramer, K. G. M., Stylianides, E., & van Vuuren, M. Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 2011;149(1-2), 126–132.

De la Torre, D., Mafla, E., Puga, B., Erazo, L., Astolfi-Ferreira, C., & Ferreira, A. P. Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. *Veterinary World* (2018), 11(4), 480–487.

Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Buonavoglia, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*, 2005; 126(1-2), 179–185.

Duque-García, Y., Echeverri-Zuluaga, M., Trejos-Suarez, J., & Ruiz-Saenz, J. Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Veterinary Microbiology*, 2017; 201, 56–61.

Goddard A, Leisewitz A. Canine Parvovirus. *Vet Clin Small Anim* 2010 (40): 1041-1053.

Gonçalves, Karla Rathje. Detecção e tipagem de parvovírus canino (CPV). 2010. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

Hoelzer K, Parrish C R. The emergence of parvovirus of carnivores. *Vet Res* 2010; 41-39

Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo C, Sanchez S, Buonavoglia C, Saliki J. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diag* 2007;(19):535-539.

Lamm, Catherine G., D.V.M., Rezabek, Grant B., M.P.H., D.V.M., 2008. Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. *Vet Clin Small Anim* 38 (2008) 837–850.

Lara V. Parvovirose Canina. *Revista Cães e Gatos*. Porto Feliz, ano 14, nº. 86, nov/dez, 2000.

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

Mila, H., Feugier, A., Grellet, A., Anne, J., Gonnier, M., Martin, M., Chastant-Maillard, S. Inadequate passive immune transfer in puppies: Definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Preventive veterinary medicine*, 2014; 116, 209–213.

Mila H, Grellet A, Mariani C, Feugier A, Guard B, Suchodolski J, Steiner J, Chastant-Maillard S. Natural and artificial hyperimmune solutions: Impact on health in puppies. *Reprod Dom Anim* 2017;(52): 163-169

Miranda, Carla, Carvalheira, Júlio, Parrish, Colin R., Thompson, Gertrude, 2015, Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. *Veterinary Microbiology* 180 (2015) 59–64.

Miranda, Carla & Thompson, Gertrude. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology* (2016), 97, 2043–2057.

Mittal, M., Chakravarti, S., Mohapatra, J. K., Chug, P. K., Dubey, R., Upmanuy, V., Kanwar, N. S. Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure. *Infection, Genetics and Evolution* (2014), 23, 1–6.

Mohr AJ, Leisewitz AL, Jacobson LS, et al. Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med* 2003;17(6):791–8.

Mohan Raj, J., Mukhopadhyay, H.K., Thanislass J., Antony P.X., Pillai R.M. Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2010) 1237–1241.

Monteiro K., Allendorf SD, Vicente AF, Appolinário CM, Peres MG, Cortez A., Heinemann MB & Megid J. 2016. Viral caracterização tipo e aspectos clínicos da parvovirose canina em cães naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36 (12): 1181-1185.

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.

Patel J R, Heldens J G M. Review of companion animal viral diseases and immunoprophylaxis. *Vaccine* 2009;(27):491-504.

Pereira C A D, Monezi T A, Mehnert D U, D'angelo M, Durigon E L. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Mic* 2000;(75):127-133

Peres, Ruben, Francia, Lourdes, Romero, Valeria, Maya, Leticia, López Ignacio, Hernández Martín. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology* 124 (2007) 147–152.

Pinto, Luciane Dubina, Streck, André Felipe, Gonçalves, Karla Rathje, Souza, Carine Kunzler, Corbellini, Ângela oliveira, Corbellini, Luís Gustavo, Canal, Cláudio Wageck, 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research* 165 (2012) 29-33.

Prittie, Jennifer, DVM, DACVIM, DACVECC, Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 14(3) 2004, pp167-176

Silva, M.M.O. et al. Comparison of three laboratorial tests for diagnosis of canine parvovirus infection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 65, n. 1, p. 149-152, Feb. 2013.

Silva R, Dorella F, Figueiredo H, Costa E, Pelicia V, Ribeiro B, Ribeiro M, Paes A, Megid J, Lobato F. *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. *Jou Elsevier*. 2017 (48): 66-69

Streck, André Felipe, Souza, Carine Kunzler de, Gonçalves, Karla Rathje, Zang, Luciana, Pinto, Luciane Dubina, Canal, Cláudio Wageck. First detection

of canine parvovirus type 2c in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40, 465-469.

Tams, T. R. Gastroenterologia de pequenosanimais. 2.ed. São Paulo: ROCA, 2005. 454p.

Travassos V. Parvovirose canina Revisão de Literatura. Recife; 2009. 27p.

Truyen U. Evolution of canine parvovirus — a need for new vaccines? Vet Microbiol. 2006 (117) 9-13.

Vieira, Maria João Nobre de Matos Pereira. Parvovirose Canina. Tese de doutoramento em Ciências Veterinárias. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. Portugal, 2011.