

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Medicina Veterinária

Jéssica Melo Dias

**DETECÇÃO DE PARVOVIRUS CANINO EM FEZES DE
CÃES**

São Paulo

2017

Jéssica Melo Dias

DETECÇÃO DE PARVOVIRUS CANINO EM FEZES DE CÃES

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^a Dr^a Adriana Cortez

São Paulo

2017

Jéssica Melo Dias

DETECÇÃO DE PARVOVIRUS CANINO EM FEZES DE CÃES

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 2017

Banca Examinadora:

Professora Doutora Adriana Cortez
Orientadora

Professor _____
Professor do Curso de Medicina Veterinária

Professor _____
Professor do Curso de Medicina Veterinária

Este trabalho é dedicado à minha mãe e avô, pelo apoio incondicional, e a memória de Carlos José do Nascimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof^a Dr^a Adriana Cortez, pela paciência, atenção e dedicação que teve ao me orientar.

Agradeço ao laboratório de Zoonoses Bacteriana da USP, por ceder o espaço para que pudesse ser feito a análise das amostras, ao Prof^o Marcos Bryan Heinemann, a Gisele, Antônio e ao Osvaldo, pela paciência e ensinamentos durante o período em que estive presente.

Agradeço também as amigas de classe, pelos estudos em conjunto durante todo esse período, à Beatriz Semensato, Joyce Gonçalves e Amanda Arruda. E aos demais colegas de classe.

Agradeço imensamente aos meus familiares, noivo e filho, pela compreensão das horas em que não pude estar presente por dedicar-me aos estudos.

À todos os professores, pelos ensinamentos, pela paciência, e por acreditar que somos capazes.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por tornar este trabalho possível.

“É longo o caminho que vai do
projeto à coisa”.
(Jean Molière)

RESUMO

A parvovirose canina é uma das principais enfermidades que acometem cães jovens e que possui alta letalidade, algumas vezes, acarretando a morte de neonatos em menos de 24 horas, dependendo de co-morbidades envolvidas, idade do animal, virulência da estirpe e imunidade prévia. O vírus foi isolado pela primeira vez na década de 1970, e denominado CPV-2. Atualmente já é sabido que outras variantes gênicas estão presentes no mundo, dentre elas a CPV-2^a, CPV-2b e mais recentemente a CPV-2c, que tem se mostrado uma cepa altamente virulenta. Em relação a imunoprofilaxia, algumas vacinas demonstraram não apresentar reação cruzada com essa nova variante. Medidas preventivas podem variar de acordo com a cepa, de modo que a identificação desses agentes contribui para uma melhor estratégia de vacinação. Para isso, 207 amostras clínicas de fezes provenientes de cães com diarreia e cães saudáveis oriundos 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 processados para a procura de parvovírus canino inicialmente através da PCR.

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

ABSTRACT

Canine parvovirus is one of the main diseases affecting young dogs and has a high lethality, sometimes leading to the death of neonates in less than 24 hours, depending on the comorbidities involved, age of the animal, strain virulence and previous immunity. The virus was first isolated in the 1970s, and called CPV-2. It is now known that other gene variants are present in the world, among them CPV-2^a, CPV-2b and more recently CPV-2c, which has been shown to be a highly virulent strain. Regarding immunoprophylaxis, some vaccines showed no cross-reactivity with this new variant. Preventive measures may vary according to the strain, so the identification of these agents contributes to a better vaccination strategy. To this end, 207 clinical stool specimens from dogs with diarrhea and healthy dogs 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 processed for the search of canine parvovirus initially through PCR.

Key words: Dogs, parvovirus, CPV-2, PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Distribuição da variante CPV-2a em cães pelo mundo.....	14
Figura2. Distribuição da variante CPV-2b no mundo.....	15
Figura3. Distribuição da variante CPV-2c no mundo.....	15
Figura 3. Amostras positivas para o vírus da parvo reveladas em gel de agarose 1,5 %.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela1. percentual de amostras negativas e positivas para CPV-2 de animais oriundos do Hospital Veterinário da UFMG.....	21
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 ETIOLOGIA.....	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	12
2.3 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL	14
2.4 PATOGÊNESE E SINAIS CLINICOS	15
2.5 DIAGNOSTICO	17
2.7 TRATAMENTO.....	18
2.8 PROFILAXIA.....	18
3. OBJETIVOS	19
3.2 OBJETIVOS GERAIS	19
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 AMOSTRAS CLINICAS	20
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ENTEROPATÓGENOS	20
5. FORMA DE ANÁLISE.....	20
6. RESULTADOS	20
7. DISCUSSÃO	21
8. CONCLUSÃO	24
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

Diferenças entre as causas de óbito, entre os cães, variam entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento; enquanto no primeiro as mortes ocorrem por neoplasias ou por idade extrema, no segundo, as doenças infecciosas ainda são as causas mais comuns que contribuem para a diminuição da expectativa de vida entre os cães.¹

A parvovirose canina é uma das principais enfermidades que acometem cães jovens e que possui alta letalidade, algumas vezes, acarretando a morte de neonatos em menos de 24 horas. Seu agente etiológico é o parvovirus canino, um vírus que possui em seu genoma DNA de fita simples, é não envelopado, pertencente à família *Parvoviridae*, gênero *Parvovirus*.² São descritos dois tipos do vírus, o parvovirus canino tipo 1 (CPV 1) e o parvovirus canino tipo 2 (CPV 2), sendo o tipo 2 responsável pela gastroenterite hemorrágica observada nos animais. O CPV 2 pode ser, ainda, subdividido em 4 biotipos: o 2, o 2a, o 2b e o 2c. Em São Paulo, foi observado que há a predominância do CPV-2b em relação ao CPV-2a e CPV-2c em cães naturalmente infectados com a presença ou não de vacinação anterior.³

Portanto considerando que o agente citado possui manifestações clínicas semelhantes com outros enteropatógenos virais e que, rotineiramente, não é realizado o diagnóstico diferencial e que a identificação dos agentes contribui para aprimorar estratégias vacinais para os cães, o objetivo desse projeto é identificar o parvovirus canino, em amostras de fezes de cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O parvovirus canino é um vírus pequeno (20 a 25 nm de diâmetro), não envelopado e formato icosaédrico, pertencente a à família *Parvoviridae*. Seu genoma é composto por DNA de fita simples.^{4-5,6}

Foi isolado pela primeira vez na década de 1970, como uma variante do vírus da Panleucopenia Felina, onde foi levantada uma hipótese de que o vírus tivesse sofrido mutações gênicas através de carnívoros selvagens⁷. Essa variante encontrada, foi denominada CPV-2. Teve essa denominação para diferenciação do CPV-1 ou CMV (Minute Virus of Canines), que já havia sido isolado pelo Dr. Leonard Binn em 1968, e considerado até então assintomático.^{8,9,10}

Posteriormente outras duas variantes antigênicas foram descobertas nos anos 1980, a CPV-2a e CPV-2b que substituíram a primeira CPV-2. Recentemente, foi descrita uma nova variante 2c, que difere das outras apenas no aminoácido 426 na região VP2.¹¹

No ambiente, o CPV tem uma alta resistência a desinfetantes e detergentes, variações de temperatura e pH, devido a sua característica não envelopada, dificultando sua eliminação do ambiente e facilitando a disseminação do agente, que persiste por muito tempo em áreas contaminadas. Sendo sensível apenas ao formol e ao hipoclorito de sódio.¹²

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo parvovirus tem sido reportada em cães domésticos e selvagens, como coiotes (*Canis latrans*) e raposas (*Vulpes vulpes*), além de outros animais selvagens. Relações filogenéticas entre CPV de diferentes espécies animais, sugerem que todos são derivados de um mesmo antepassado

em comum, semelhantes ao vírus de diferentes espécies animais selvagens, podendo haver a transmissão entre canídeos selvagens domésticos.^{6,13}

O CPV-1 é de origem desconhecida, segundo Lammet al¹² ele está mais relacionado com o parvovirus bovino (BPV). Acreditava-se que era apatogênico. Hoje é sabido que cães podem ser infectados, e podem apresentar ou não sintomas. Quando a infecção é sintomática, os sintomas variam entre vômito, diarreia, dificuldade respiratória ou até mesmo óbito súbito.^{9,12}

Em 1978 surgiu o CPV-2, em forma de surtos, com animais apresentando vomito e diarreia, resultando em alta morbidade e letalidade.^{9,12}

Segundo Miranda et al⁶, o CPV e o FPV são idênticos em 98% do DNA, e o CPV-2 surgiu devido a seis mutações gênicas em seu material genético, o que contribuiu para CPV-2 para pudesse se replicar em hospedeiros caninos, entretanto perdeu a eficiência em replicar-se em felídeos.

Cerca de 2 a 3 anos após emergir a CPV-2, surgiram 2 novas variantes gênicas, CPV-2a e CPV-2b indicando uma forte vantagem epidemiológica sobre o CPV-2. Nos estados Unidos foram feitos estudos em coiotes selvagens (*Canis latrans*) onde observaram que os mesmos haviam sido infectados pelas 2 novas variantes genéticas.^{6,14}

Durante os anos de 1980 a CPV-2a era considerada predominante, sendo que anos seguintes a CPV-2b foi a que predominou, durante os anos 1990.¹⁵

A CPV-2c foi descrita inicialmente por Buonavoglia et al¹¹ na Itália. Foi descrita posteriormente em outros países¹⁶⁻¹⁹, mostrando-se uma cepa altamente virulenta, e predominante nos últimos anos. Animais adultos que antes não eram infectados com frequência, hoje são mais propensos. As vacinas tem eficácia duvidosa em relação a esta nova variante que favorece o surgimento de surtos da doença.¹²

2.3 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL

A distribuição global do vírus inicia-se pela substituição do CPV-2 pelo CPV-2a. Foram relatadas infecções em várias regiões como o continente Africano, Asiático, Americano, Europeu e na Austrália. ^{17, 20-24}

No fim de 1983 a infecção por CPV já havia sido descrita em 50 países, ganhando uma proporção mundial, sendo relatada nos cinco continentes. Atualmente a CPV-2c tem se espalhado drasticamente, prevalecendo em regiões do continente europeu, e na América do Sul. Se mostrou prevalente pelos últimos estudos em países como Brasil Argentina e Uruguai, sendo relatada em 21 países. A predominância de cada cepa pode variar entre as regiões de uma mesmo país. Estatisticamente é difícil indicar em proporções as cepas predominantes, entretanto, todas (2a, 2b, e 2c) são encontradas ao redor do mundo como mostra as figuras 1, 2 e 3. ^{23, 25-26}

Figura1. Distribuição da variante CPV-2a em cães pelo mundo



Fonte: (Miranda 2016)⁶

Figura2. Distribuição da variante CPV-2b no mundo.



Fonte: (Miranda 2016)⁶

Figura3. Distribuição da variante CPV-2c no mundo



Fonte: (Miranda 2016)⁶

2.4 PATOGÊNESE E SINAIS CLINICOS

A replicação viral ocorre no núcleo da celular, e requer células que se replicam mais rapidamente, como células epiteliais presentes nas criptas intestinais, células precursoras da medula óssea e células do miocárdio.^{8,27}

A principal via de transmissão é a via fecal-oral. O vírus invade o hospedeiro, multiplica-se no tecido linfoide em conjunto ao gastroentérico, causando viremia, atinge as criptas através dos linfócitos, causando destruição do epitélio e encurtamento dos vilos. Eventualmente podem atingir fígado e coração, provocando insuficiência hepática e miocárdica, sendo que este é ocasionado em cães infectados ainda no útero. A mortalidade é alta e os sinais mais usualmente visualizados são de diarreia e vômito, com alta morbidade e baixa letalidade. Em cães adultos, a mortalidade é de 1% enquanto que para filhotes pode ser de até 70%.^{8,28,29}

Em filhotes, o período de incubação varia entre 3 a 7 dias. Os sinais clínicos são inespecíficos e iniciam-se logo após esse período, sendo o vômito, a diarreia mucoide seguida de hemorrágica, hiporexia seguida de anorexia, depressão são os mais frequentes, febre e desidratação geralmente estão associadas.^{27,29} Podem ocorrer sinais de septicemia, quando bactérias oportunistas ganham circulação, devido ao dano causado no intestino.⁸

Filhotes, entre 6 semanas e 6 meses, são mais comumente infectados pelo parvovirus, alguns fatores como a falta de imunidade materna, infestação por parasitas e condições estressantes em que são submetido podem explicar essa maior susceptibilidade⁸, entretanto, a descoberta da nova variante gênica tornou cães adultos susceptíveis, ocorrendo casos em forma de surtos.¹²

2.5 DIAGNOSTICO

Existem tipos diferentes de diagnostico para o parvovirus, dentre eles o clinico, que é sempre sugestivo, onde basicamente se faz necessário uma

abordagem inicial sobre a história clínica do animal doente, além de um exame físico completo. Seguido de diagnósticos laboratoriais, dentre esses: hemograma, bioquímica sanguínea e urinálise.³⁰

Devido aos sinais inespecíficos, o diagnóstico diferencial se faz necessário para que se descarte outras enfermidades que possuem os mesmos sintomas.^{4,5}

Alterações como neutropenia e leucopenia são alterações encontradas com frequência em hemogramas.^{5,10,30}

Há alguns testes comerciais disponíveis (SNAP) que detectam o antígeno nas fezes com alta especificidade e baixa sensibilidade. Animais vacinados com vacinas atenuadas podem ter resultados falsos positivos. Este teste tem baixa sensibilidade para a detecção do CPV-2c.¹²

Pode ser feito o diagnóstico *post mortem*, através de avaliações micro e macroscópicas. Alterações como enterite segmentar, são facilmente visualizadas, onde a camada serosa fica com aspecto mais grosseiro e de coloração enegrecida. Nos achados histopatológicos, são evidenciadas áreas de necrose dos vilos intestinais, além de perda da arquitetura.¹²

Além desses testes sorológicos como Elisa, que diagnosticam infecções denominadas ativas onde são encontradas imunoglobulinas da classe IgM no soro, Hemaglutinação, Inibição da Hemaglutinação, e reação em cadeia polimerase (PCR). A PCR detecta mais de 90% dos animais infectados dependendo de fatores como *primers* utilizados.^{8,12}

2.6 TRATAMENTO

O animal infectado necessita de hospitalização e monitoramento constantes.³⁰

O tratamento consiste basicamente na amenização dos sintomas. O fornecimento de fluidoterapia se faz necessário para animais em estado de desidratação. Uma profilaxia com antibióticos para evitar uma possível infecção secundária por bactérias, como observado em um estudo feito por Silva et al¹⁰ onde foram identificados a presença de *Clostridium perfringens* e *C. difficile* em cães positivos ao CPV-2b. Se presença de vômitos, administração de antieméticos é preconizada e corticoesteróides no tratamento de endotoxemia.¹²

Em pacientes com anorexia grave, é necessário a administração de nutrição paraenteral, que nada mais é que o fornecimento em pequenas quantidades de nutrientes e eletrólitos que são facilmente absorvidos, através de um tubo nasoesofágico, e com a adequação do paciente, o fornecimento posterior de nutrição enteral. Uso de adsorventes para proteger a mucosa intestinal pela ligação e eliminação de bactérias e toxinas e probióticos, para o repovoamento da flora intestinal são preconizados.³⁰

2.7 PROFILAXIA

Métodos profiláticos são essenciais para animais susceptíveis ao parvovirus, principalmente filhotes, que são os mais acometidos. A transferência de imunidade para estes animais podem ser fornecidas a estes animais através da ingestão de colostro, via transplacentária e vacinais.^{8, 32}

Há diversas vacinas disponíveis no mercado para o CPV-2, que são recomendadas para evitar a infecção dos animais pelo parvovirus. Em filhotes é recomendada a aplicação 2 a 3 semanas antes que os anticorpos recebidos pelos colostro diminuam significativamente pela 8 a 12 semana de vida. A eficácia da vacina em filhotes de 6 semanas é de 25%, enquanto que em adultos e filhotes a partir de 18 semanas de vida, é de 95%, isso ocorre devido a presença de anticorpos recebidos da mãe, presentes nesses filhotes mais jovens

O protocolo vacinal deve ser feito entre na 6^o, 9^o, 12^o semana de vida. As vacinas vivas modificadas são altamente eficazes, promovem reação cruzada para as cepas CPV-2, CPV-2a e CPV-2b, não sendo comprovado a proteção contra o CPV-2c. Não há relatos de vacinas para o CPV-1.^{8,12,29}

Além de vacinas, é preconizado em canis principalmente, onde podem haver surto da doença, o uso de medidas profiláticas, como quarentena para animais oriundos de outros locais, ou com sintomas suspeitos, o uso de produtos capazes de inativação viral, na limpeza dos ambientes, devido sua alta resistência.^{8,12}

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Detectar o parvovovirus canino em amostras de fezes de animais com e sem diarreia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram processadas 207 amostras de fezes de cães oriundos do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, pertencentes a um banco de amostras clínicas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ USP.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ENTEROPATÓGENOS

A extração do material genético foi feita com reagente DNazol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

O CPV foi identificado por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Foi usado o protocolo descrito por Buonavoglia et al¹¹ com os *primers* para VP2 555F (5'-CAGGAAGATATCCAGAAGGA-3') e 555R (5'-GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA-3') que geram um amplificado de 583 pares de bases (pb).

5 FORMA DE ANÁLISE

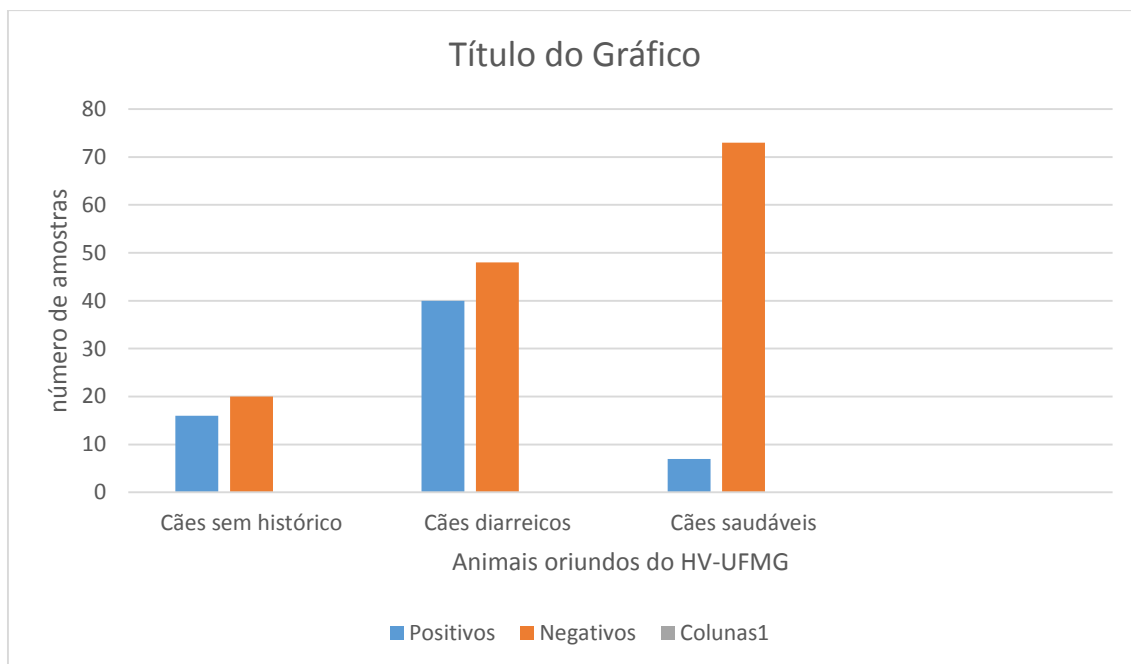
A análise foi feita de forma descritiva.

6 RESULTADOS

Foram analisada ao total 207 amostras, sendo 88 de cães com fezes diarréicas, 80 de cães com fezes com consistência normal e 36, sem informação.

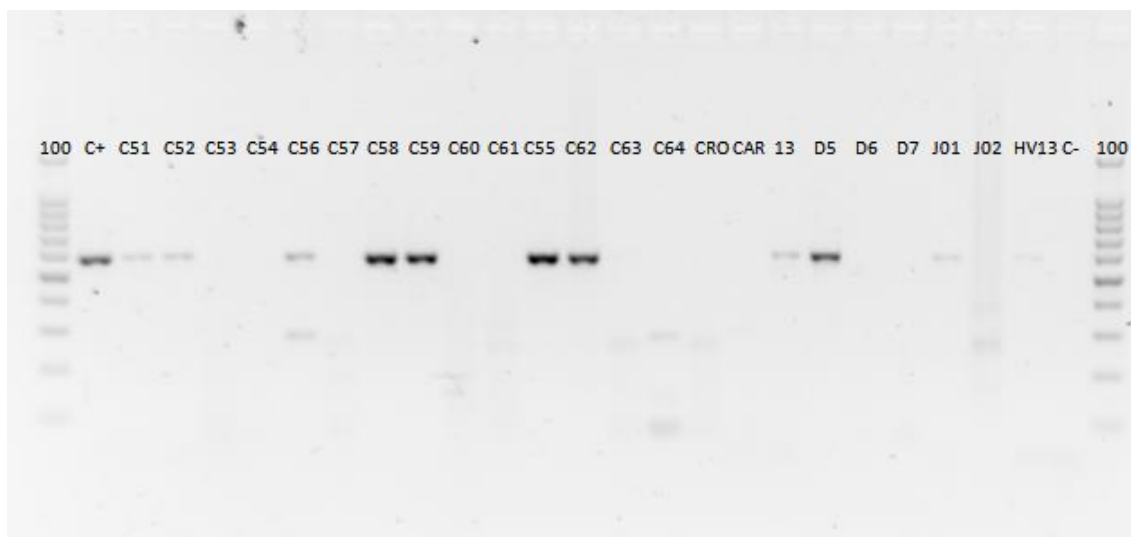
Das amostras analisadas, 30,4 % (63/207) foram positivas para CPV-2, sendo que 63,5% eram de cães com diarreia, 11,1 %, sem e 25,4% não foi possível obter histórico (Figuras 4 e 5).

Figura 4: percentual de amostras negativas e positivas para CPV-2 de animais oriundos do Hospital Veterinário da UFMG. São Paulo, 2017



Fonte: O autor (2017)

Figura 5. Eletroforese em em gel de agarose 1,5 % de amostras positivas para o parvovirus. São Paulo, 2017.



7 DISCUSSÃO

A Parvovirose canina tem se mostrado de grande importância na clínica médica de pequenos animais, devido sua alta prevalência e resistência no ambiente, o que dificulta sua erradicação, sendo a vacinação a principal forma de controle para esta enfermidade.⁵

Os animais que são mais usualmente acometidos pelas gastroenterites são os de 6 semanas a 6 meses de idade.⁸ Um estudo feito por Pinto et al²⁵ mais de 95% dos animais estudados se encaixam nesta faixa etária. No presente estudo os dados sobre a idade dos animais não foram obtidos.

De 63 amostras positivas, 12 dos animais não apresentavam sinais de gastroenterite hemorrágica, sugerindo que o grau de severidade da doença varia devido a vários fatores, dentre eles: o grau de imunidade materna e sistema imune presente no portador, virulência da cepa e a quantidade de carga viral.²⁵ No presente estudo, mais de 63% das amostras positivas eram oriundas de cães com GEH, o que reforça o dado do estudo citado acima.

No presente trabalho foi investigado 207 amostras fecais de cães, onde 63 mostraram-se positivas para o CPV-2. Para uma abordagem mais específica é necessário ainda o sequenciamento, já que o parvovirus possui variantes antigênicas (2, o 2a, o 2b e o 2c).

O primeiro relato de uma variante antigênica do tipo 2b foi descrito na Itália por Buonavoglia et al ¹¹ onde foram avaliados 2 isolados de CPV e foi encontrado duas alterações em aminoácidos distintos, Ser-297 para Ala e Asp-426 para Glu, indicando uma direção na evolução genética, posteriormente chamada de CPV-2c.

Tendo esta informação como base, tem sido feitos estudos na pesquisa dessa nova variante genética. Na América do Sul, foi detectado pela primeira vez a variante 2c por Perez et al ¹⁸, no Uruguai. Através de um estudo, onde foram analisadas 30 amostras de fezes de cães vacinados e não vacinados, pela PCR, resultando em mais de 80% (25/30) de positividade para CPV-2, posteriormente

foi feito o sequenciamento e detectado a variante. Foi detectada também nos Estados Unidos, em 7 amostras de 27 positivas para o CPV-2, originadas de cães vacinados, com 2 ou 3 doses de vacinas comerciais. Essas amostras eram provenientes de cinco estados diferentes caracterizando que a distribuição é generalizada.¹⁹

Já no Brasil, a primeira detecção foi feita por Streck et al³¹, onde 9 de 20 amostras foram positivas para o CPV-2 e dessas, 7 foram descritas como o tipo 2c. Um segundo estudo feito por Monteiro et al³, onde o CPV-2b foi o subtipo predominante encontrado em suas amostras analisadas e foi constatado que o CPV-2c já é circulante no estado de São Paulo. Um grupo de pesquisadores do Rio Grande do Sul analisaram amostras de seis estados brasileiros, onde 78,6 % foram positivos para CPV-2c, sendo que destes, 6 animais obtinham um cronograma de vacinação completo, Concluindo que o 2c foi predominante entre os anos de 2008 e 2010.²⁵

Um estudo foi realizado por Decaro et al³⁵ em um canil na Itália, com um surto de gastroenterites. Os animais foram alojados em locais diferentes totalizando 98 cães (60 Bernese, 35 dachshunds e 3 collies) Os animais foram vacinados com protocolos adequados. As vacinas utilizadas foram para o CVP-2. Dos 98 cães, 11 ficaram doentes, destes, uma fêmea da raça Bernese veio a óbito. Foram coletados materiais para análise, e posteriormente isolado a variante CPV-2c. Foi concluído, que a possibilidade de uma variante 2c infectar cães vacinados é altamente provável, já que a imunidade induzida pela estirpe da vacina CPV-2 não foi capaz de garantir proteção adequada contra uma estirpe de campo.

O acompanhamento da mutação entre as cepas do parvovirus canino é indispensável, além de testes com vacinais que determinem a eficiência de vacinas contra novas variantes gênicas.³⁴

Com os resultados apresentados por diversos trabalhos feitos em diferentes locais é possível analisar claramente a mutação genética apresentada pelo vírus da parvo, em que nos últimos anos foi possível detectar uma nova variante genética, a CPV-2c, onde há relatos em que a vacina não mostra-se efetiva contra o mesmo. Por isso é necessário acompanhar a evolução viral e

distribuição geográfica para identificar a prevalência dos subtipos de cada região e pela busca de novos métodos profiláticos, com vacinas mais específicas.

8 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode-se concluir que 30,4 % (63/207) foram positivas para o CPV-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bentubo H D L, Tomaz M A, Bondan E F, Lallo M A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil) *Cienc Rural* 2017; 37(4): 1021-1026
2. Murphy FA, Paul E, Gibbs J, Studdert M.J. 1999. *Veterinary Virology*. 3rd ed. Academic, California. 629p.
3. Monteiro K, Allendorf S, Vicente AF, Apolinário CM, Peres MG, Cortez A, Heinemann MB, Megid J. Viral type characterization and clinical aspects of canine parvovirus in naturally infected dogs in São Paulo State, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 2016 36(12): 1181-1185.
4. LARA V. Parvovirose Canina. *Revista Cães e Gatos*. Porto Feliz, ano 14, nº. 86, nov/dez, 2000.
5. Travassos V. Parvovirose canina Revisão de Literatura. Recife; 2009. 27p.
6. Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Jou of Gen Vir.* 2016;(97): 2043-2057.
7. Truyen U. Evolution of canine parvovirus — a need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 2006 (117) 9-13.
8. Goddard A, Leisewitz A. Canine Parvovirus. *Vet Clin Small Anim* 2010 (40): 1041-1053.
9. Carmichael LE. An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus. *J. Vet. Med.* 2005 (52): 303-311
10. 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

11. 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.
12. Lamm C, Rezabek G. Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. *Vet Clin Small Anim* 2008 (38) 837-850
13. Hoelzer K, Parrish C R. The emergence of parvovirus of carnivores. *Vet Res* 2010; 41-39
14. Parrish C R, Have P, Foreyt W J, Evermann J F, Senda M & Carmichael L E. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol* 1988 (69) 1111 – 1116.
15. 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
16. Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung H T, Nguyen N H, Huynh L M, Nguyen L T, Nguyen P N & other authors. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol* 2004 (149) 2261 – 2269.
17. 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.
18. Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Mic* 2007;(124):147-152
19. 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

20. Meers J, Kyaw-Tanner M, Bensink Z &Zwijnenberg R. Geneticanalysisofcanineparvovirusfromdogs in Australia. *AustVet J* 2007;(85):392 – 396.
21. Kumar M &Nandi S. Molecular typingofcanineparvovirusvariantsbypolymerasechainreactionandrestrictionenzy meanalysis. *TransboundEmergDis* 2010;(57):458 – 463.
22. Markovich J E, Stucker K M, Carr A H, Harbison C E, Scarlett J M &Parrish C R. Effectsofcanineparvovirusstrainvariationsondiagnostictestresultsandclinical management ofenteritis in dogs. *J AmVetMedAssoc* 2012;(241):66 – 72.
23. Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Maya L, Panzera Y, Sosa K &Zoller S. Recentspreadingof a divergentcanineparvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenouspopulation. *VetMicrobiol* 2012;(155):214 – 219.
24. Castanheira P, Duarte A, Gil S, Cartaxeiro C, Malta M, Vieira S & Tavares L. Molecular andserologicalsurveillanceofcanineentericviruses in straydogsfrom Vila do Maio, Cape Verde. *BMC Vet Res* 2014; 10
25. Pinto L D, Streck A F, Gonçalves K R, Souza C K, Corbellini A O, Coberllini L G, Canal C W. Typingofcanineparvovirusstrainscirculating in Brazilbetween 2008 and 2010. *Vir Resea* 2012;(165):29-33
26. Calderón M G, Romanutti C, Wilda M, D'Antuono A, Keller L, Giacomodonato M N, Mattion N & La Torre J. Resurgenceofcanineparvovirus 2a strain in the domesticdogpopulationfrom Argentina. *J VirolMethods* 2015;(222):145 – 149.
27. Miranda C, Carvalheira J, Parrish C R, Thompson G. Factoraffectingtheoccurrenceofcanineparvovirus in dogs. *VetMic* 2015;(180): 59-64
28. Patel J R, Heldens J G M. Reviewofcompanion animal viral diseasesandimmuniprophylaxis. *Vaccine* 2009;(27):491-504

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

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

31. 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. *Braz J Vet Microbiol* 2009;(40):465-469

32. 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

33. Cramer K G M, Stylianides E, Vuuren M, Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 2011;(149): 126-132.

34. Castro T X, Costa E M, Leite J P, Labarthe N V, Garcia C R C N. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Vet Sci* 2011;(90): 336-340

35. 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 Microbiol* 2008;(31): 125-130