

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM MEDICINA VETERINÁRIA

DETECÇÃO E TIPAGEM DE PARVOVÍRUS CANINO (CPV)

Autora: Karla Rathje Gonçalves

Porto Alegre

2010/01

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM MEDICINA VETERINÁRIA

DETECÇÃO E TIPAGEM DE PARVOVÍRUS CANINO (CPV)

Autora: Karla Rathje Gonçalves

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Co-orientadora: Msc. Luciane Dubina Pinto

Porto Alegre

2010/01

G635d Gonçalves, Karla Rathje

Detecção e tipagem de parvovírus canino (CPV). / Karla Rathje Gonçalves. –
Porto Alegre: UFRGS, 2010.

37 f.; il. – Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS-
BR, 2010. Cláudio Wageck Canal, Orient.

1. Parvovírus canino: isolamento e purificação 2. Parvovirose canina

I. Canal, Cláudio Wageck, Orient. II. Pinto, Luciane Dubina, Co-orient.

III. Título

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

AGRADECIMENTOS

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

À Luciane Dubina Pinto, minha co-orientadora, pela amizade, pelo companheirismo, pela inesgotável ajuda e conhecimento compartilhado.

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

Ao Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS, representado pelos colegas e amigos por toda experiência e aprendizagem.

A todos os meus amigos, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo, e a todas as pessoas que contribuíram de uma forma ou de outra para a minha conquista.

Agradeço ao meu namorado, Rafa, pelo incentivo, carinho e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Aos meus pais, Pedro e Tânia, pelo amor, carinho e confiança que sempre me dedicaram; pelo apoio em busca dos meus sonhos e pela oportunidade de realização profissional. A vocês a minha eterna gratidão!

Agradeço à uma pessoa especial, que despertou em mim o amor pela profissão, que fez parte dessa trajetória e sempre acreditou em minhas conquistas, onde estiver Vô Cabral.

A Deus, pela vida, pela força e coragem para enfrentar os obstáculos e por permitir que eu sempre alcançasse os meus objetivos.

RESUMO

O parvovírus canino (CPV) foi descrito no final da década de 1970 e é considerado uma das principais causas de diarreia e mortalidade em filhotes de cães. Na década de 90, os variantes antigênicos CPV-2a e CPV-2b substituíram completamente o tipo 2 original e se distribuíram amplamente na população canina mundial. A cepa CPV-2c foi descrita na Itália em 2001, sofrendo alteração em um aminoácido (Asp-426 para Glu-426) de um sítio antigenicamente importante. Esta mutação também foi detectada no Vietnã (2004), Espanha (2006), Estados Unidos (2007) e no Uruguai (2007). Em 2009, nosso grupo de pesquisa identificou o tipo 2c em amostras de fezes caninas oriundas da região metropolitana de Porto Alegre (RS). O presente trabalho tem como objetivos detectar CPV-2 de diferentes regiões do Brasil e determinar os tipos antigênicos predominantes. Foram utilizadas amostras de fezes ou suabes retais de cães com idade entre 1 mês e 1 ano, de ambos os gêneros e raças distintas, de municípios do Rio Grande do Sul e diferentes Estados do Brasil. O DNA total das amostras foi extraído através de kit comercial à base de sílica, sendo amplificado, por PCR, um fragmento de 583 pares de bases do gene VP2. Os produtos de amplificação foram purificados, seqüenciados, alinhados pelo método Clustal através do software Bioedit 7.0.0 e submetidos ao GenBank. Os resultados obtidos com análise de 130 amostras demonstraram 30,8 % (40/130) de positividade para CPV-2. Foram seqüenciadas 23 amostras de CPV-2 oriundas do Estado do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, identificando 82,61 % (19/23) do tipo 2c, 13,04 % (3/23) do tipo 2b e 4,35 % (1/23) do tipo 2a. Os resultados deste projeto demonstram que a variante antigênica CPV-2c já está circulando em toda Região Sul do Brasil.

Palavras chaves: parvovírus canino, diagnóstico, detecção, caracterização, genotipagem.

ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV) was described in the late 1970s and is currently one of the major causes of diarrhea and death among puppies. In the 1990s, CPV-2a and CPV-2b antigenic variants completely replaced original type 2 and rapidly spread to the canine population worldwide. The CPV-2c strain was described in Italy in 2001, with one amino acid change (Asp-426 to Glu-426) on a major antigenic site. This mutation was also detected in Vietnam (2004), Spain (2006), the United States (2007) and Uruguay (2007). In 2009, our research group detected type 2c in fecal samples of dogs in the metropolitan region of Porto Alegre, in southern Brazil. The aims of the present study were to detect CPV-2 in different Brazilian regions and to determine the predominant antigenic types. Fecal samples or rectal swabs obtained from male and female dogs of different breeds aged 1 month to 1 year, from different towns in the state of Rio Grande do Sul and from different Brazilian states, were analyzed. The total DNA of the samples was extracted using a commercially available silica-based kit, with PCR amplification of a fragment of 583 VP2 gene base pairs. The amplification products were purified, sequenced, aligned by the Clustal method by the Bioedit 7.0.0 software and submitted to GenBank. The analysis revealed that 40 (30.8%) out of 130 samples were positive for CPV-2. A total of 23 CPV-2 strains from the states of Rio Grande do Sul, Paraná and Santa Catarina were sequenced, with detection of 82.61% (19/23) of type 2c, 13.04% (3/23) of type 2b and 4.35% (1/23) of type 2a. Our results indicate that the CPV-2c strain is widely disseminated in southern Brazil.

Keywords: canine parvovirus, diagnosis, detection, characterization, genotyping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Prostração e anorexia em um filhote canino com parvovirose.	17
Figura 2 - Gastroenterite hemorrágica em um filhote canino com parvovirose.	18
Figura 3 - Fezes hemorrágicas de odor desagradável são características comuns em cães infectados por parvovírus.	18
Figura 4 - Visualização dos produtos da PCR para amplificação do fragmento de 583 pb do gene VP2 por eletroforese em gel de agarose 2%. Canaletas 1, 2, 3 e 4: amostras positivas. Canaleta 5: amostra negativa. Canaleta 6: controle negativo. Canaleta 7: controle positivo.	28
Figura 5 - Representação ilustrativa dos tipos de CPV-2 detectados na Região Sul do Brasil.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da detecção de parvovírus canino tipo 2.....	28
Tabela 2 - Resultados da caracterização do parvovírus canino tipo 2.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ALT	Alanina aminotransferase
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
CCV	Coronavírus
CID	Coagulação intravascular disseminada
Cl	Cloro
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
CRFK	Linhagem de células de rim de felino
CRV	Rotavírus
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio Imuno Enzimático
etc.	E outros
FPLV	Vírus da panleucopenia felina
K	Potássio
g	Gramas
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos humanos
Glu	Ácido glutâmico
h	Hora

HA	Hemaglutinação
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kg	Quilogramas
L	Litros
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
mEq	Miliequivalente
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Na	Sódio
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TFR	<i>Canine transferrin receptor</i>
U	Unidade
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VP2	Proteína viral 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PARVOVÍRUS CANINO	13
2.1	Etiologia	13
2.2	Epidemiologia	14
2.3	Patogenia	16
2.4	Sinais Clínicos	17
2.5	Diagnóstico	20
2.6	Tratamento	21
2.7	Prevenção	23
2.8	Prognóstico	24
3	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO 2 NO BRASIL	26
3.1	Materiais e métodos	26
3.1.1	Amostras.....	26
3.1.2	Extração do DNA.....	26
3.1.3	Amplificação de DNA.....	26
3.1.4	Seqüenciamento do DNA.....	27
3.2	Resultados	27
3.3	Discussão	30
4	CONCLUSÕES	31
	REFÊRENCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Doenças gastroentéricas 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 6 meses de idade. Dentre os principais agentes virais causadores de diarreias estão o parvovírus (CPV), o coronavírus (CCV), o rotavírus (CRV) canino e o vírus da cinomose (HOSKINS, 1997; TAMS, 2005).

Desde o final dos anos setenta, o CPV ganhou destaque como um dos principais agentes etiológicos de gastroenterites infecciosas em cães jovens (APPEL et al., 1979; MORAES; COSTA, 2007). 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). 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 suplantado pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b sendo rapidamente substituído (DECARO, 2008). Um vírus CPV-2 mutante com uma alteração (Asp-426 para Glu-426) em um sítio antigênicamente importante foi reconhecido na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001). A nova variante, denominada 2c, também foi identificada no Vietnã e na Espanha por Nakamura et al. (2004) e Decaro et al. (2006), respectivamente. Na América do Sul, o primeiro relato desta nova cepa foi no Uruguai por Pérez et al. (2007). Recentemente, Streck et al. (2009) identificaram o tipo 2c em amostras de fezes caninas oriundas da região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Neste trabalho, será feita uma revisão bibliográfica sobre o CPV como principal agente de gastroenterites virais que acometem os cães e será descrito um experimento realizado pela acadêmica que objetivou a detecção de cepas de CPV-2 que circulam em diferentes regiões do Brasil e determinar os tipos antigênicos predominantes.

2 PARVOVÍRUS CANINO

2.1 Etiologia

O parvovírus canino é um patógeno de grande importância em medicina veterinária, propriedades únicas do vírus tornam-o um agente emergente e reemergente de cães em todo o mundo (BUONAVOGLIA et. al., 2001; DECARO et. al., 2007).

O CPV pertence à família *Parvoviridae*, caracteriza-se por ser um vírus pequeno (20 a 25 nm), esférico, com capsídeo icosaédrico e possuir uma molécula de DNA linear de fita simples como genoma (MORAES; COSTA, 2007). São extremamente estáveis no ambiente e 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. Anteriormente, o vírus era reconhecido como vírus minuto dos cães (CnMV), pertencente ao gênero *Bocavirus*. 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. Essas diferenças entre essas duas cepas são mínimas, o que confere uma boa proteção cruzada (MORAIS; COSTA, 2007).

A origem do CPV-2 tem como hipótese mais provável a mutação de outro vírus, o FPLV (vírus da panleucopenia felina), o qual difere em menos de 1% do seu genoma (PARRISH, 1999; TRUYEN, 1999). Com o tempo, o CPV-2 foi sendo substituído, na população canina, pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b (PRATELLI et al., 2001). Segundo Truyen (2006), a cepa CPV-2 é diferenciada das outras pelo uso de anticorpos monoclonais específicos. O CPV-2 replica-se em células felinas *in vitro*, mas não *in vivo* (TRUYEN; PARRISH, 1992). As novas variantes antigênicas, em contraste, replicam-se em gatos, podendo induzir doença clínica (TRUYEN et al., 1996). Estes novos tipos diferem do tipo original 2 por mudanças em aminoácidos específicos do capsídeo e por infectarem cães e gatos (DECARO et al., 2005)

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 das outras por apresentar na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo, uma substituição dos aminoácidos Asn e Asp pelo Glu (HONG et al., 2007).

2.2 Epidemiologia

Desde sua descoberta, o CPV, sempre esteve relacionado com 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 deveria conferir maior resistência aos cães, entretanto, a alta incidência da infecção se mantém em animais com idade entre 6 semanas e 6 meses (MORAIS; COSTA, 2007). 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 (TAMS, 2005; NELSON; COUTO, 2006).

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 e 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). No entanto, a indução da imunidade ativa dos filhotes é bloqueada pela imunidade materna em filhotes de cães. 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 6 a 8 semanas de idade. Oito semanas é a idade em que o maior número de filhotes sucumbe ao CPV (MARULAPPA; KAPIL, 2009). Moraes e Costa (2007) reforçam que antes das 6 semanas de idade, normalmente, os filhotes encontram-se protegidos contra a infecção através dos anticorpos maternos. No entanto, o período da janela de susceptibilidade, os títulos de anticorpos são insuficientes para proteger da doença e, em contra partida, bloqueiam o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva pelas vacinas. Esse período pode explicar porque alguns animais, mesmo adequadamente vacinados, desenvolvem a infecção (MARULAPPA; KAPIL, 2009).

A parvovirose canina é uma doença viral altamente contagiosa causada pela presença do CPV-2 no ambiente contaminado por material fecal. Como facilitadores da transmissão viral, há também a participação do homem, roedores e insetos (HOSKINS, 1997). A infecção,

portanto, ocorre por exposição oro-nasal a fezes, fômites ou ambientes contaminados (MORAES; COSTA, 2007). 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).

Entre os parvovírus de carnívoros, o vírus da panleucopenia felina (FPLV) é conhecido desde 1920, enquanto o parvovírus canino (CPV) emergiu apenas como um patógeno do cão, no final dos anos 70 (TRUYEN, 2006). Outra diferença importante entre esses dois parvovírus é que o FPLV muta em taxas lentas (DECARO et. al., 2008), enquanto o CPV mostra as taxas de substituições genômica similares aos dos vírus RNA, com valores de cerca de 10^{-4} substituições sítio/ano (SHACKELTON et. al., 2005). Portanto, logo após seu surgimento, o tipo original CPV-2 deu origem a variante antigênica CPV-2a através de cinco ou seis mutações de aminoácidos na principal proteína do capsídeo. Uma segunda variante, CPV-2b, foi identificada alguns anos mais tarde (PARRISH et al., 1991). Pereira et al. (2000) identificaram, em amostras de fezes caninas, as cepas 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 predominância da cepa da década de 80 foi a CPV-2a e da década de 90 a CPV-2b.

A terceira variante, CPV-2c, foi descoberta na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001), apresentando uma capacidade para se espalhar rapidamente através da população canina naquele país (DECARO et. al., 2006), bem como em outros países europeus, 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 de campo indicam, atualmente, um curso clínico mais grave e maiores taxas de mortalidade associadas à infecção pelo CPV-2c, bem como a sua capacidade de infectar e causar doença em cães adultos, mesmo adequadamente vacinados (DECARO et. al., 2008).

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

2.3 Patogenia

O CPV-2 normalmente causa sinais clínicos em 5 a 12 dias após o animal se infectar por via fecal-oral. O vírus invade e destrói, rapidamente, as células com alta divisão mitótica, como por exemplo, as precursoras da medula óssea, epitélio das criptas intestinais (NELSON; COUTO, 2006). Contudo, o período de incubação é dependente de outros fatores como o grau de viremia e o índice de mitose da cripta intestinal (MCCANDLISH, 2001).

Após a exposição oro nasal, o vírus replica nos tecidos linfóides da orofaringe e atinge a corrente sangüínea. Marcada viremia plasmática, que ocorre do primeiro ao quinto dia após a infecção, dissemina o vírus para os tecidos de rápida divisão celular (MORAES; COSTA, 2007). A resposta imune inicial, de cada indivíduo, determinará a magnitude da viremia e a gravidade dos sinais clínicos (STROMBECK; GUILFORD, 1991).

O ciclo replicativo do CPV-2 inicia pelo reconhecimento e ligação dos vírions a receptores celulares (*canine transferrin receptor-TFR*) que estão em grande quantidade nas células com alta taxa de mitose. O CPV-2 realiza sua replicação no núcleo da célula parasitada, quando essa se encontra na fase S do ciclo de divisão celular, utilizando a DNA polimerase do seu hospedeiro para síntese do seu DNA. O parvovírus canino é um agente viral citopático, provocando a lise da célula infectada (JONES et al., 2000).

A consequência imediata da infecção intestinal é o achatamento das vilosidades, o colapso e a necrose intestinal, com exposição da lâmina própria da mucosa. A diarreia, resultante da má absorção, costuma ser hemorrágica, pelo sangramento de capilares subjacentes ao revestimento epitelial da mucosa (MORAES; COSTA, 2007). Para McCandlish (2001), o vômito se deve as lesões no intestino delgado proximal e não à gastrite. Linfopenia e neutropenia são geralmente resultantes da replicação do vírus nas células linfóides e da medula óssea (MORAES; COSTA, 2007). A anorexia, vômito e diarreia são quadros patológicos característicos da parvovirose que cursam com alterações do equilíbrio ácido-básico e hidroeletrólítico no organismo do animal. Ambos os quadros clínicos cursam com desidratação. Na diarreia, a perda de líquidos é acompanhada de diminuição de bicarbonato de sódio, levando à acidose metabólica. A depleção de eletrólitos (Na, K, Cl) e alterações no metabolismo energético, causam hipoglicemia grave. Os vômitos prolongados resultam em alcalose metabólica por perda de ácido clorídrico, (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

A septicemia ocorre em casos de enterite por parvovírus como resultado de absorção de toxinas pré-formadas, assim como de bactérias intactas através do epitélio intestinal lesado. A bacteremia tem maior probabilidade de ocorrer em pacientes leucopênicos (TAMS, 2005)

Moraes e Costa (2007) relataram que a excreção do CPV-2 nas fezes inicia no terceiro ou quarto dia após a infecção e se intensifica com o surgimento dos sinais clínicos, já o término da excreção viral está provavelmente relacionado com o desenvolvimento da imunidade.

2.4 Sinais Clínicos

Nelson e Couto (2001) elucidam a idéia que muitos cães são submetidos à consulta por apresentarem prostração (Figura 1), anorexia e/ou vômitos que pode, por exemplo, se assemelhar a ingestão de corpos estranhos e não necessariamente a uma gastroenterite infecciosa. A diarreia, em geral, pode estar ausente nas primeiras 24 a 48 horas da doença e, quando ocorre, nem sempre se apresenta de forma hemorrágica. O vômito é, normalmente, um achado predominante e pode ser grave o suficiente para causar esofagite.

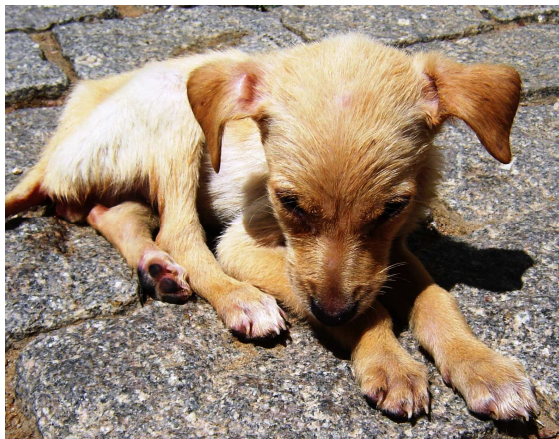


Figura 1 - Prostração e anorexia em um filhote canino com parvovirose.

A apresentação típica da gastroenterite hemorrágica (GEH) ocorre geralmente em cães jovens não vacinados (MORAES; COSTA, 2007) (Figura 2).



Figura 2 - Gastroenterite hemorrágica em um filhote canino com parvovirose.

A diarreia apresenta-se de diferentes formas, onde são identificadas fezes de cor amarelada, hemorrágicas (Figura 3) ou com estrias de sangue. Normalmente, é caracterizada por apresentar um odor desagradável (APPEL et al., 1979). Com a progressão dos sinais clínicos é observada uma acentuada desidratação (DECARO et al., 2005).

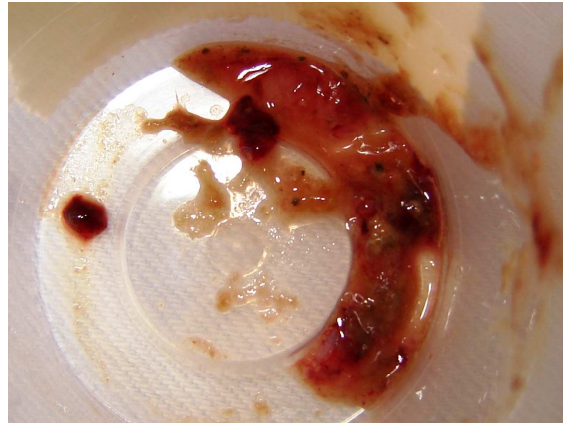


Figura 3 – Fezes hemorrágicas de odor desagradável são características comuns em cães infectados por parvovírus.

Animais infectados demonstram, no hemograma, leucopenia, neutropenia e linfopenia, podendo ocorrer leucocitose na fase de recuperação. A anemia é justificada pela perda de sangüínea intestinal (MORAES; COSTA, 2007) e o hematócrito elevado é resultante da desidratação. Os níveis de uréia e creatinina aumentados são consequência da oligúria e azotemia pré-renal (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). A hipoalbuminemia e anormalidades

eletrolíticas como hiponatremia, hipocalcemia e hipocloremia são vistas em 25-33% dos cães. A enzima alanina aminotransferase (ALT) encontra-se elevada em aproximadamente 25% dos cães e anormalidades ácido-básicas podem ser vistas em cães severamente afetados, geralmente sendo sugestivas de acidose metabólica (STROMBECK; GUILFORD, 1991). Alterações na temperatura retal, como hipertermia, podem ser observadas em decorrência da própria infecção viral ou bacteriana, porém, alguns cães devido a evolução rápida da doença apresentam hipotermia, septicemia e coagulação intravascular disseminada (CID), sinais terminais em pacientes em choque endotóxico (HOSKINS, 2004). 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, estopor ou coma. Nessa situação, a parada cardíaca e respiratória são eminentes, levando os animais à óbito (MORAES; COSTA, 2007).

McCandlish (2001) cita que a recuperação da doença pode ser surpreendentemente rápida, mas pode levar de 7 a 10 dias ou mais nos animais gravemente afetados, o que exige tratamento intensivo. Os filhotes (quatro a oito semanas de idade) podem sair da normalidade para a morte em apenas um dia, quando são infectados ainda no útero da mãe desenvolvendo uma miocardite (NELSON; COUTO, 2006).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo, na rotina clínica, geralmente é feito pelo histórico, sinais clínicos e hemograma (MORAES; COSTA, 2007). Para Tams (2005), o início agudo dos sinais clínicos em um cão não vacinado, previamente, é consistente com infecção por parvovírus. Nelson e Couto (2006) ainda relatam que o diagnóstico é de um modo geral estabelecido por tentativa, sendo a neutropenia uma alteração do hemograma sugestiva de parvovirose, mas não sensível ou específica o suficiente para fechar diagnóstico, pois pode ser devido a uma salmonelose ou outra infecção grave. Porém, 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 (HA), isolamento viral em cultivo celular ou Ensaio Imuno Enzimático direto (ELISA). Estes métodos são os mais

sensíveis e específicos para o diagnóstico, porém dependentes do período de eliminação do antígeno fecal, que é breve e cíclico. Os testes sorológicos indiretos, como Inibição da Hemaglutinação, Soroneutralização e ELISA 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).

Devido à rápida evolução do CPV, testes de diagnóstico com anticorpos monoclonais precisam ser atualizados e avaliados quanto à sensibilidade contra as variantes atuais do CPV. De 2006 a 2008, um total de 163 amostras do CPV foram genotipadas e dessas, 13 foram CPV-2, 82 eram do CPV-2b, 67 foram CPV-2c, e 1 foi um misto de CPV-2b e CPV-2c (KAPIL, et al., 2007; MARULAPPA; KAPIL, 2009). Além disso, a transmissão cruzada de cepas de CPV ou vírus relacionados ameaça a sensibilidade dos testes de anticorpos monoclonais que estão comercialmente disponíveis para uso em campo (MARULAPPA; KAPIL, 2009).

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). Strottmann et. al.(2008) cita que 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. 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 falsos positivos e falsos negativos (DE MARI et. al., 2003). O diagnóstico precoce e definitivo da etiologia das gastroenterites caninas torna-se essencial para o tratamento e controle da disseminação do agente etiológico, principalmente se o CPV estiver envolvido, e para a alocação adequada de cães com outras infecções gastroentéricas. Nesse aspecto, a PCR vem sendo utilizada como método eficaz para o diagnóstico de inúmeras doenças de etiologia viral. 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).

O diagnóstico *post-mortem* dos cães acometidos pela parvovirose canina é realizado com base nos achados macroscópicos observados na necropsia e lesões histológicas características (HOSKINS, 1997). Na necropsia observa-se a mucosa intestinal congesta,

hemorrágica e freqüentemente 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).

Em estudo recente, Oliveira et al. (2009) observaram que o aumento das placas de Peyer do intestino delgado e a hiperemia da mucosa e serosa intestinal foram os achados macroscópicos mais detectados em noventa e seis cães necropsiados com lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose canina. Microscopicamente, foi visualizada enterite necrótica em 77% dos cães, mas em 17,7% as alterações histológicas do intestino delgado ficaram prejudicadas pela autólise, dificultando a interpretação. A identificação viral nos tecidos pela imuno-histoquímica não foi possível em todos os casos, sendo o intestino delgado o melhor órgão para a identificação do CPV, onde se obteve um número maior de marcação positiva e uma maior quantidade de células marcadas. Entretanto, a imuno-histoquímica de tecidos linfóides revelou um menor número de cortes positivos para CPV e em geral com baixa quantidade de células linfóides marcadas, resultado que sugere a rápida passagem do CPV nesses órgãos.

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 esta alteração *post-mortem* se apresenta precocemente (SVARA et al., 2003). Desta forma, métodos de diagnóstico auxiliares são necessários para a confirmação da parvovirose canina.

2.6 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 (SHERDING, 1998). O uso de antibióticos parenterais em casos de enterites é inquestionável, 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. Por outro lado, 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 poucos 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 a 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 hipoproteinemia frequentemente se desenvolve de forma rápida, em pacientes com diarreia e lesão intestinal graves (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Foi demonstrado experimentalmente que a flunixin meglumine, antiinflamatório 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. Os antagonistas de receptor de H₂ e sucralfato líquido podem ser úteis caso ocorra esofagite (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.

Estudos recentes mostram que o uso de interferon-omega recombinante, de origem felina (Virbagen Omega ®: 2,5 milhões U/kg/dia, via intravenosa, por 3 dias) resulta em uma grande redução da mortalidade de cães acometidos por CPV-2 (DE MARI et. al., 2003).

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, ultrasonografias 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 mudados para uma veia diferente a cada 72 horas (até 5 dias para cateteres de veia jugular) (TAMS, 2005).

2.7 Prevenção

Cães com parvovirose devem ser isolados e receber tratamento em um local específico. A limpeza e desinfecção do ambiente devem ser feitas com hipoclorito de sódio a 0,175%, ficando em contato com o agente por tempo prolongado (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-se difícil prevenir a exposição; cães assintomáticos podem eliminar em suas fezes o CPV-2; a imunidade passiva proveniente da mãe pode inativar o vírus vacinal, podendo persistir em alguns filhotes até 18 semanas de idade (NELSON; COUTO, 2006).

A maneira mais efetiva de prevenção da parvovirose é a vacinação sistêmica de filhotes, que devem receber a primeira dose da vacina 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 (NELSON; COUTO, 2006; MORAES; COSTA, 2007). McCandlish (2001) cita que, quando há um alto risco de infecção, doses de vacina mais freqüentes, por exemplo, com 6, 9 e 12 semanas de idade, podem ser apropriadas. A revacinação anual é, geralmente, recomendada para o parvovírus, embora possivelmente a vacinação a cada 3 anos seja suficiente após a série inicial dada aos filhotes (NELSON; COUTO, 2006; HORZINEK, 2010). Esse esquema é recomendado para estimular a imunidade ativa à medida que a imunidade passiva declina o que geralmente ocorre entre 20 semanas de vida. Por um período de duas a quatro semanas, os títulos de anticorpos passivos atingem níveis não-protetores, mas interferem com a eficácia das vacinas. Recomenda-se o isolamento dos animais até completarem a fase de imunização, sempre observando a desinfecção do local (MORAES; COSTA, 2007).

No final dos anos 70 e início dos 80, vacinas com FPLV vivo e inativado foram utilizadas para proteger os cães contra o CPV devido aos antígenos comuns que estimulam proteção cruzada, porém baixos níveis de proteção lhes foi conferida e uma curta duração da imunidade. Essas vacinas foram substituídas por vacinas vivas atenuadas do CPV, que forneceram excelente proteção e maior duração da imunidade. Atualmente, as vacinas vivas atenuadas são derivadas da cepa CPV 2b ou CPV2 do vírus original. Desde que o vírus tipo 2 foi inteiramente substituído, a campo, por 2a, 2b e 2c, existem preocupações com os níveis de proteção conferidos pelas vacinas atuais contra o desafio por cepas heterólogas (SPIBEY et. al., 2008).

2.8 Prognóstico

Atualmente, existem dois parvovírus de cães: o CPV tipo 1, também denominado parvovírus minuto dos cães (CnMV), sem importância clínica definida nas gastroenterites, e o CPV-2, que apresenta três subtipos CPV2a, CPV2b e CPV2c. O CPV2b talvez ainda seja o mais prevalente na população canina e, conseqüentemente, utilizado em vacinais (TRUYEN, 2006). Com o uso de vacinas, a infecção por CPV tem sido relativamente controlada (STROTTMANN, 2008). Os cães que recebem tratamento adequado se recuperam da infecção, sobretudo quando ele inicia nos primeiros quatro dias do curso clínico (NELSON; COUTO, 2006).

Comumente, o CPV causa a doença em filhotes de 1 a 6 meses de idade. Os filhotes vacinados são normalmente protegidos da doença e da infecção, a menos que haja uma falha na imunização, devido à presença de altos títulos de anticorpos maternos (DECARO et. al., 2004, 2005). Da mesma forma, cães adultos (com mais de 1 ano de idade) não são geralmente sensíveis ao CPV, devido à infecção natural ou vacinação anteriores (TRUYEN, 2006). No entanto, observações preliminares têm mostrado que o CPV-2c também é isolado de cães doentes ou que vieram à óbito com mais de seis meses e até 2 anos (DECARO et. al., 2008). Em estudo recente, Decaro et. al. (2008) descrevem um surto de gastroenterite grave induzida por CPV-2c, em cães adultos regularmente vacinados.

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).

O parvovírus canino continua a ser um importante patógeno de cães e é responsável por graves ocorrências de morbidade e mortalidade, apesar da disponibilidade de vacinas seguras e eficazes (DECARO et al., 2006). Embora já tenha sido demonstrado que uma vacina do tipo 2 é capaz de fornecer proteção contra 2a e 2b isolados de campo, o surgimento da variante 2c naturalmente levanta a questão de saber se o tipo 2 também pode fornecer proteção contra esta nova variante (SPIBEY et al., 2008).

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

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. Também fazem parte da Tese de Doutorado de Luciane Dubina Pinto e foram parcialmente publicados no trabalho de Streck et al. (2009).

3.1 Materiais e métodos

3.1.1. Amostras

Foram analisadas amostras de fezes caninas de municípios do Rio Grande do Sul e de alguns Estados do Brasil. Elas são oriundas de fezes normais e/ou diarréicas, de suabes retais de cães com idade entre 1 mês e 1 ano, de ambos os gêneros e raças distintas. As amostras foram armazenadas em recipientes estéreis e estocadas a -20°C.

3.1.2 Extração do DNA

A amostra (fezes) foi ressuspensa a 20% (peso/volume) com PBS (pH 7,4). A solução foi congelada e descongelada por três vezes, centrifugada a 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para extração. As amostras vacinais não sofrem nenhum processamento prévio a extração. 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 PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizamos os seguintes produtos: tampão de PCR 1x (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), MgCl₂ 2 mM, 200 µM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µL dos *primers* (20pmol/100 µL), 2 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/ µL) 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), utiliza-

se os pares de *primers*: CPV555for 5'CAGGAAGTAATCCAGAAGGA 3'; CPV555rev 5'GGTGCTAGTTGATATGTAATAA AACA 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 2,0% com 0,1 µg/mL de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) em tampão TAE 1X concentrado (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS; 1989). A visualização foi feita 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 Seqüenciamento do DNA

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

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

As seqüências de nucleotídeos de CPV-2a (DQ340434 e EF375482), CPV-2b (DQ340409) e CPV-2c (EF375479, EF375480, EF375481, AY742942 e AY380577) foram retiradas do GenBank para fins de comparação.

3.2 Resultados

A PCR para amplificação do gene VP2 obteve uma banda única com o tamanho esperado (583 pb) para as amostras positivas para CPV-2 testadas. O controle negativo (água destilada) não gerou produtos de amplificação (Figura 4).

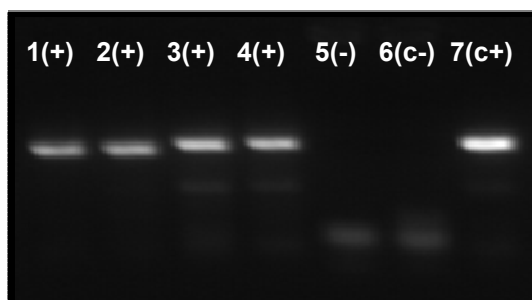


Figura 4 – Visualização dos produtos da PCR para amplificação do fragmento de 583 pb do gene VP2 por eletroforese em gel de agarose 2%. Canaletas 1, 2, 3 e 4: amostras positivas. Canaleta 5: amostra negativa. Canaleta 6: controle negativo. Canaleta 7: controle positivo.

Os resultados obtidos da análise de 130 amostras demonstraram 30,8% (40/130) de positividade para CPV-2 (Tabela 1). De todos os cães analisados, 52 apresentavam gastroenterite e desses, 31 foram positivos para CPV-2, sendo o CPV-2 o provável agente viral em 60% (31/52) dos casos. No Rio Grande do Sul, foi analisado um maior número de amostras, sendo elas oriundas de Porto Alegre, Viamão, Cachoeirinha, Taquara, Canoas, Caxias do Sul, Passo Fundo e Bagé.

Tabela 1 - Resultados da detecção de parvovírus canino tipo 2.

	Amostras Analisadas	Cães com gastroenterite	Amostras positivas para CPV-2
Rio Grande do Sul	103	37	32
Santa Catarina	11	3	3
Paraná	12	12	5
Rio de Janeiro	4	0	0
Total	130	52	40

Foram seqüenciadas 23 amostras de CPV-2 oriundas do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, identificando 82,61 % (19/23) do tipo 2c, 13,04 % (3/23) do tipo 2b e 4,35 % (1/23) do tipo 2a (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da caracterização do parvovírus canino tipo 2.

	Amostras sequenciadas	CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
Rio Grande do Sul	16	1	2	13
Paraná	5	0	0	5
Santa Catarina	2	0	1	1
Total	23	1	3	19

No Estado do Rio Grande do Sul, foram detectadas as três variantes antigênicas do CPV-2 (2a,2b e 2c), em Santa Catarina podemos verificar a presença do CPV-2b e 2c, e no Paraná apenas o CPV-2c. Contudo, a nova variante antigênica CPV-2c foi detectada nos três estados do sul do Brasil (Figura 5).

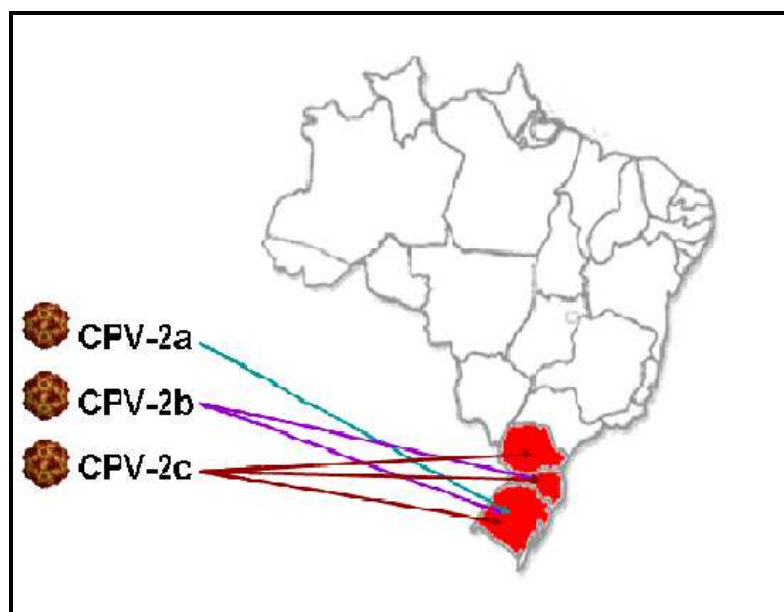


Figura 5 – Representação ilustrativa dos tipos de CPV-2 detectados na Região Sul do Brasil.

3.3 Discussão

A emergência e dispersão do parvovírus canino tipo 2 na década de 70, possivelmente originário de uma variante do (FPLV) vírus da panleucopenia felino (SHACKELTON et al.,

2005) foi o primeiro indício para questionamentos sobre mutações em vírus de DNA (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008). Estudos ainda precisam ser realizados para compreender como um vírus de DNA fita simples arquiteta taxas de mutação maiores do que seu hospedeiro eucarioto utilizando exatamente o mesmo maquinário enzimático deste (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008).

O CPV -2c é um exemplo de como mutações bem sucedidas podem se fixar em uma população. Este vírus, que foi descrito em 2001 na Itália (BUONAVOGLIA et al.2001), nunca havia sido descrito no Brasil antes de Streck et al. (2009). Em dois estudos realizados no Brasil, foi evidenciada uma passagem de cepas 2a para 2b ocorrendo a partir da década de 90 (PEREIRA et al., 2000; COSTA et al., 2005; PEREIRA; LEAL; DURIGON, 2007). Em amostras brasileiras isoladas no ano de 2001 não houve indícios do tipo 2c, o que reforça a idéia de que o CPV-2c tenha surgido na Itália ou Europa.

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 positiva para o tipo CPV-2c (DECARO et al. 2006; PÉREZ et al. 2007; HONG et al. 2007).

Vários testes diagnósticos foram bastante utilizados para detectar o vírus ou o genoma do vírus em amostras fecais de cães com gastroenterite, tais como HA seguido de HI, ELISA, o isolamento viral e PCR (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980; MOCHIZUKI; HARASAWA; NAKATAN, 1993; PEREIRA et al., 2000, COSTA et al., 2005). No entanto, a PCR é principalmente utilizada para identificação genômica de cepas de parvovírus circulantes, bem como para confirmar a presença do vírus em amostras fezes de cães, sem interferência com a vacinação (MOCHIZUKI; HARASAWA; NAKATAN, 1993; PEREIRA et al., 2000; COSTA et al., 2005).

No presente trabalho, os três estados do sul do Brasil apresentaram o CVP-2c, indicando que este vírus está circulando atualmente em nosso país. O resultado obtido pelo seqüenciamento de 23 amostras revelou que 19 delas foram do subtipo CPV-2c. Em relatos internacionais, utilizando um número maior de amostras, a elevada frequência do CPV-2c também foi verificada (MARTELLA et al., 2005, KAPIL et al., 2007). No Uruguai, das 25 amostras testadas, 24 foram do tipo 2c, evidenciando uma alta prevalência desta cepa (PÉREZ et al., 2007). Além da habilidade de dispersão, este novo tipo viral deve possuir vantagens de adaptação em seus hospedeiros capazes de suplantarem os tipos virais 2a e 2b.

4 CONCLUSÕES

O parvovírus canino continua a ser um importante patógeno de cães, é o principal agente responsável pelos casos de gastroenterite e por graves ocorrências de morbidade e mortalidade. Os últimos estudos revelam a predominância da variante antigênica CPV-2c nos cães acometidos por parvovirose de vários países do mundo. O CPV-2c, atualmente circulante no Brasil, foi detectado em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, no Estado de Santa Catarina e Paraná. Entretanto, ainda são necessários mais trabalhos que possam monitorar cautelosamente os sinais clínicos da parvovirose mediante as várias cepas e mutantes (TRUYEN, 2006).

A vacinologia do CPV-2c é outra questão a ser mais estudada. Há apenas um relato sobre a completa proteção de vacina viva atenuada contra o CPV-2c experimentalmente inoculado em cães (SPIBEY et al., 2008). Em contrapartida, relatos sobre falhas vacinais a campo quando o CPV-2c é o vírus desafiante encontra-se em maior frequência (DECARO et al., 2005, PÉREZ et al., 2007, DECARO et al., 2007, DECARO et al., 2008). Nosso trabalho reforça a idéia de outros autores sobre a necessidade de uma vacina específica contra o CPV-2c (DECARO et al., 2006, PÉREZ et al., 2007), uma vez que um dos animais coletados estava vacinado para PCV-2.

A escassez de informações técnicas sobre a proteção vacinal conferida ao tipo CPV-2c é um fator limitante na clínica de pequenos animais. Esta cepa deve ser identificada e estudada, pois sua virulência pode estar acometendo muitos cães e comprometendo a eficiência dos protocolos de imunização.

REFÊRENCIAS

- 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.
- BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BUONAVOGLIA C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. **J. Gen. Virol.** 82, 1555-1560. 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, 1997. V.2. Cap.104, p.1618-1705.
- CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C.; POLLOCK, R.V. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, p.784-791, 1980.
- COSTA, A.P. et al. 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 Communication**. 29:735-743, 2005.
- DE MARI, K. et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. **Vet. Rec.**; 152 : 105-108; 2003.
- DECARO, N. et al. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 17: 133-138, 2005.
- DECARO, N. et al. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**. 53, 468-472. 2006.
- DECARO, N. et al. Molecular epidemiology of canine parvovirus, **Europe. Emerg. Infect. Dis.** 13:1222-1224. 2007.
- DECARO N et al. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiologica**, 31, 125-130, 2008.
- DESARIO, C. et al. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**. n. 126, p. 179-185, 2005.

DUFFY S., SHACKELTON L. A., HOLMES E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat. Ver. Genet.** 9(4):267-76, 2008.

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

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

HONG, C. et al. 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. **J. Comp. Path.**, Vol. 142, S129eS132, 2010.

HOSKINS, J.D. Update on canine parvoviral enteritis. **Veterinary Medicine.** vol.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, vol.1. p.442 - 444, 2004.

JONES, T.C. et al. In: **Patologia Veterinária.** 6 ed. Barueri: Manole, cap.8, p.266-273, 2000.

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

MARTELLA, V. et al. Immunogenicity of an Intranasally Administered Modified Live Canine Parvovirus Type 2b Vaccine in Pups with Maternally Derived Antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, p. 1243-1245, Vol. 12, No. 10, October 2005.

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

MORAES, Mauro Pires; COSTA, Paula Renato. In: Flores, Eduardo Furtado. **Virologia Veterinária.** Ed. Da UFSM, Santa Maria, p. 388-392. 2007.

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

NAKAMURA, M. et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. **Arch. Virol.** 149, 2261-2269. 2004.

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.

OLIVEIRA, E.C. et al. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino1. **Pesq. Vet. Bras.** 29(2):131-136, fevereiro, 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**.vol.15, n.4, p.355-360, 2001.

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

PARRISH, C.R. et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. **J Virol.**; 65(12):6544-52, Dec., 1991.

PEREIRA, C. A. et al. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**. 75:127-133, 2000.

PEREIRA, C.A.; LEAL, E.S.; DURIGON, E.L. Selective regimenshift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. **Infect. Genet. Evol.** 7(3):399-409, 2007.

PÉREZ, R. et al. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. **Vet. Microbiol.** 124: 147-152. 2007.

POLLOCK, R.V.H.; CARMICHAEL, LE. Canine viral enteritis: recent developments. **Mod. veterinary practice**. vol. 60, p.375-380, 1979.

PRATELLI, A. et al. Canine Parvovirus (CPV) Vaccination: Comparison of Neutrolizing 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.

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

SHACKELTON L. A. et al. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proc. Natl Acad. Sci.** 102:379-384, 2005.

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

SPIBEY N. et al. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology** 128: 48–55, 2008.

STRECK, A.F et al. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** vol.40 n. 3, São Paulo, 2009.

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. **Small Animal Gastroenterology**. 2ed., Wolfe Publishing Limited, USA, p. 327-330. 1991.

STROTTMANN, D.M. et al. 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, mar-abr, 2008.

SVARA, T. et al. Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of dogs with canine parvovirus. **Slov. Vet. Res.** 40:81-90. 2003.

TAMS, Tood R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. Editora ROCA, p. 199-200. 2005.

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

TRUYEN, U. et al. Evolution of canine parvovirus involved in loss and gain of feline host range. **Virology**, v.215, p.186-189, 1996.

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.