



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL

MICHELLE MATTOS OLIVEIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL  
DA PARVOVIROSE E FATORES RELACIONADOS À INFECÇÃO EM CÃES DA ZONA  
SUL DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO E MUNICÍPIO DE DUQUE DE CAXIAS

Niterói  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MICHELLE MATTOS OLIVEIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL  
DA PARVOVIROSE E FATORES RELACIONADOS À INFECÇÃO EM CÃES DA ZONA  
SUL DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO E MUNICÍPIO DE DUQUE DE CAXIAS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária da  
Universidade Federal Fluminense como  
requisito para a obtenção do Grau de Mestre  
em Clínica e Reprodução Animal.

Orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. RITA DE CÁSSIA NASSER CUBEL GARCIA  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. FLAVYA MENDES DE ALMEIDA

Niterói  
2010

S586

Silva, Michelle Mattos Oliveira da

Avaliação de métodos rápidos para diagnóstico laboratorial da parvovirose e fatores relacionados à infecção em cães da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e município de Duque de Caxias / Michelle Mattos Oliveira da Silva; orientadora Rita de Cássia Nasser Cubel Gracia. – 2010.

74f.

Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)–Universidade Federal Fluminense, 2010.

Orientadora: Rita de Cássia Nasser Cubel Gracia

1. Diagnóstico de laboratório. 2. Gastroenterite. 3. Parvovírus canino. 4. Rio de Janeiro (RJ). 5. Duque de Caxias (RJ). I. Título.

CDD 636.089607563

MICHELLE MATTOS OLIVEIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL  
DA PARVOVIROSE E FATORES RELACIONADOS À INFECÇÃO EM CÃES DA ZONA  
SUL DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO E MUNICÍPIO DE DUQUE DE CAXIAS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária da  
Universidade Federal Fluminense como  
requisito para a obtenção do Grau de Mestre  
em Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. RITA DE CÁSSIA NASSER CUBEL GARCIA – Orientadora  
UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. NORMA VOLLMER LABARTHE  
UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELISABETH MARTINS DA SILVA DA ROCHA  
UFF

Niterói  
2010

À minha mãe por todo o amor e compreensão  
durante essa etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar a superar todos os obstáculos durante essa árdua caminhada.

À Prof<sup>a</sup> Ana Lucia Crissiuma de Azevedo Juppá, pessoa pela qual tenho muita admiração e respeito e que acreditou no meu potencial.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Volmer Labarthe e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flavya Mendes-de-Almeida pelo apoio e incentivo na minha carreira científica.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia N. Cubel Garcia pela excelente orientação. Presença importante para meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup> Tatiana Xavier de Castro, pelo carinho e grande ajuda na elaboração dessa dissertação.

Ao Hospital Escola da Unigranrio e Clínicas veterinárias do Município de Duque de Caxias pela oportunidade de promover a coleta das amostras utilizadas neste estudo, e à Dr<sup>a</sup>. Luciana Peralta Silva Gonçalves, pelo envio de amostras do Hospital Veterinário da Zona Sul do Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr. Maurício Cagy, pela orientação estatística fundamental para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas Erika Costa, Rafael Oliveira, Dr<sup>a</sup>. Liza Crissiuma Gershony e “Sr. Nonô” da Fazenda Escola da UFF, pela colaboração.

Aos colegas e professores da Disciplina de Virologia pela ajuda e convivência durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, por esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro durante a elaboração deste trabalho.

“Deus não escolhe os capacitados, capacita os seus escolhidos.”

(autor desconhecido)

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA, p. 4

AGRADECIMENTOS, p. 5

EPÍGRAFE, p. 6

RESUMO, p. 10

ABSTRACT, p. 11

LISTA DE FIGURAS, p. 12

LISTA DE QUADRO, p. 13

LISTA DE TABELAS, p. 14

LISTA DE APÊNDICE, p. 15

LISTA DE ANEXO, p. 16

1 INTRODUÇÃO, p. 17

2 REVISÃO DA LITERATURA, p. 20

2.1 Histórico, p. 20

2.2 Classificação, p. 21

2.3 Características do vírus, p. 21

2.4 Replicação do vírus, p. 23

2.5 Variação antigênica, p. 25

2.6 Patogenia, Transmissão e manifestações clínicas, p. 27

2.7 Diagnóstico, p. 30

2.8 Prevenção e Vacinação, p. 32

### 3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 35

#### 3.1 Material, p. 35

##### 3.1.1 AMOSTRA CLÍNICA, p. 35

##### 3.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES, p. 36

##### 3.1.2.1 *Solução de Alsever*, p. 36

##### 3.1.2.2 *Tampão Tris-Ca<sup>++</sup> 0,01M pH 7,2*, p. 36

##### 3.1.2.3 *Tampão salina-borato (BABS) pH 9,0*, p. 37

##### 3.1.2.4 *Tampão VAD pH 6,4*, p. 37

##### 3.1.2.5 *Caolim 25%*, p. 37

##### 3.1.2.6 *Tampão L2 pH 6,4*, p. 38

##### 3.1.2.7 *Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 6,4*, p. 38

##### 3.1.2.8 *Tampão NaOH 10N*, p. 38

##### 3.1.2.9 *Sílica*, p. 38

##### 3.1.2.10 *Etanol 70%*, p. 39

##### 3.1.2.11 *EDTA 0,5M pH 8,8*, p. 39

##### 3.1.2.12 *Tampão Tris-Boro-EDTA (TBE) 10X pH 8,4*, p. 39

##### 3.1.2.13 *Agarose a 1,5%*, p. 40

##### 3.1.2.14 *Solução de brometo de etídio*, p. 40

##### 3.1.2.15 *Tampão corante azul de Bromofenol*, p. 40

##### 3.1.3 INICIADORES UTILIZADOS NA PCR PARA CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA, p. 41

#### 3.2 Métodos, p. 42

##### 3.2.1 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE), p. 42

##### 3.2.2 PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL, p. 43

##### 3.2.3 REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (HA) / INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HI), p. 43

##### 3.2.3.1 *Preparo da suspensão de hemácias a 0,5%*, p. 43

##### 3.2.3.2 *Reação de Hemaglutinação (HA)*, p. 43

##### 3.2.3.3 *Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)*, p. 44

##### 3.2.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO DO GENOMA DE PARVOVÍRUS CANINO, p. 44

##### 3.2.4.1 *Extração do genoma*, p. 44

##### 3.2.4.2 *Reação em cadeia pela polimerase (PCR)*, p. 45

##### 3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 46

## 4 RESULTADOS, p. 47

4.1 Comparação dos métodos rápidos para diagnóstico laboratorial da parvovirose canina, p. 47

4.2 Ocorrência e fatores relacionados à infecção pelo CPV em filhotes de cães com gastroenterite, em duas populações caninas de áreas geograficamente distintas (Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e Município de Duque de Caxias), p. 50

## 5 DISCUSSÃO, p. 55

## 6 CONCLUSÕES, p. 61

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 62

## 8 APÊNDICE, p. 71

8.1 Ficha de identificação dos animais (Apêndice 1), p. 72

## 9 ANEXO, p. 73

9.1 Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (Anexo 1), p. 74

## RESUMO

O parvovírus canino (CPV) é considerado um importante patógeno associado a casos de gastroenterite em filhotes de cães no estado do Rio de Janeiro. Como os sinais clínicos da infecção por CPV são comuns a outros agentes, o diagnóstico laboratorial através de métodos rápidos é fundamental, pois permite ao médico veterinário a triagem dos casos suspeitos e o isolamento dos animais doentes, prevenindo a infecção em filhotes contactantes suscetíveis. Portanto, este trabalho teve como objetivos avaliar os métodos rápidos para o diagnóstico laboratorial da parvovirose canina e analisar os fatores relacionados à infecção pelo CPV (idade, raça, histórico de vacinação e sinais clínicos) em filhotes de cães com gastroenterite provenientes de duas populações de área geograficamente distintas: Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e Município de Duque de Caxias. Para a avaliação dos métodos rápidos, 57 amostras fecais de cães com diarreia foram testadas pela reação de hemaglutinação (HA)/inibição da hemaglutinação (HI), ensaio imunoenzimático (EIE) (*SNAP® Parvo Antigen Test - Idexx Laboratories Inc®*) e reação em cadeia pela polimerase (PCR). Para a análise dos fatores relacionados à infecção pelo CPV em duas populações distintas, 50 amostras provenientes da Zona Sul do Rio de Janeiro e 40 amostras do Município de Duque de Caxias, coletadas no período de maio de 2007 a maio de 2009, foram testadas por HA/HI e PCR. Em relação aos métodos rápidos de diagnóstico, o EIE foi capaz de detectar o antígeno viral em 19/57 amostras analisadas. Por HA/HI, 17 amostras foram positivas (título  $\geq 32$ ) e 40 negativas. Por PCR, 25 amostras foram consideradas positivas, incluindo 15 amostras positivas e 10 negativas por HA, como também 19 amostras positivas e seis negativas no EIE. Portanto, o EIE apresentou uma concordância de 89,4% com a PCR e o HA/HI de 79,8%. No estudo da infecção por CPV em duas populações distintas, observou-se que a proporção de casos positivos no Município de Duque de Caxias (55%) foi significativamente maior que na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro (32%). Ao comparar a amostragem das duas populações, não se observou diferença significativa em relação ao sexo, raça e faixa etária dos animais. Entretanto, a proporção de cães vacinados na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro (74%) foi significativamente maior que no Município de Duque de Caxias (40%). Pode-se observar também que o fato dos cães apresentarem vômito e diarreia hemorrágica, e serem CPV positivos demonstrou diferença significativa ( $p=0,04$ ) em relação aos cães que não apresentavam os mesmos sinais e foram positivos. Estes resultados mostram que a infecção por CPV ainda é uma importante causa de enterite hemorrágica em filhotes de cães até seis meses de idade no estado do Rio de Janeiro e que, embora alguns sinais clínicos sejam indicativos da infecção, somente o diagnóstico laboratorial é capaz de confirmar os casos suspeitos. Apesar do HA/HI e EIE serem os testes mais utilizados na triagem, as amostras negativas por estes métodos devem ser testadas por outros mais sensíveis e específicos como a PCR.

Palavras-chave: Parvovírus canino (CPV); gastroenterite; diagnóstico laboratorial; métodos rápidos; Rio de Janeiro; Duque de Caxias.

## ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV) is considered one of the most common agent of infectious enteritis in puppies in the state of Rio de Janeiro. The clinical signs of CPV infection are indecisive, since several other pathogens may cause diarrhoea in dogs. Thus, rapid laboratorial diagnosis is essential in order to screen isolate infected dogs and prevent secondary infections of susceptible contact animals. The aim of this study was to evaluate the rapid laboratory tests used for the diagnosis of CPV infection. In addition, it was performed an analysis of the factors related to CPV infection (age, breed, vaccination history and clinical signs) in two different geographic areas: South Zone of Rio de Janeiro City and Duque de Caxias City. In order to evaluate the rapid testes, 57 fecal samples from dogs with diarrhea were tested by hemagglutination (HA)/hemagglutination inhibition (HI), immunoenzymatic assay (EIE) (*SNAP® Parvo Antigen Test - Idexx Laboratories Inc®*) and polymerase chain reaction (PCR). To analyse the factors related to CPV infection, 50 samples from the South Zone of Rio de Janeiro and 40 samples from Duque de Caxias city, collected in the period of may 2007 - may 2009, were tested by HA/HI and PCR. In relation to rapid tests, the EIE was able to detect CPV antigen in 19/57 analysed samples. By HA/HI, 17 samples were positive (titer  $\geq 32$ ) and 40 negative. Using PCR, 25 samples were found positive including 15 HA/HI-positive and 10 HA-negative; they also included 19 EIE-positive and six EIE-negative samples. The best correlation was observed when the EIE test was compared with PCR, where there was an overall agreement of 89.4%. The concordance was low for HA, with value of 79.8%. In the study of CPV infection in two distinct populations, the proportion of CPV-positive cases in Duque de Caxias City (55%) was statistically higher than in the puppies from the Southern region of Rio de Janeiro city (32%). No statistically significance difference between sex, breed and age of the puppies and CPV infection was found among these populations. However, the proportion of vaccinated puppies from the South Zone of Rio de Janeiro city (74%) was statistically higher than from Duque de Caxias City (40%). One of the trends noted in this study was that the fact of puppies presenting vomiting and hemorrhagic diarrhea to be CPV-positive showed significant difference in relation to those with the other clinical signs were CPV-positive ( $p=0.04$ ). These results show that CPV is still an important cause of hemorrhagic enteritis in puppies up to six months of age. Although vomiting and hemorrhagic diarrhea could be indicative of CPV infection, only laboratorial diagnosis is able to confirm the suspected cases. HA and EIE are one of the most common methods used for diagnosis CPV infection, but the negative samples should be tested by the more specific and sensitive PCR.

Key words: Canine Parvovirus (CPV); gastroenteritis; laboratorial diagnosis; rapid methods; Rio de Janeiro; Duque de Caxias.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotomicrografia eletrônica de partículas de CPV em amostra fecal de um cão com gastroenterite hemorrágica (WILLI, 1998), p. 22
- Figura 2.** Etapas da expressão gênica e replicação dos parvovírus autônomos, p. 24
- Figura 3** Esquema evolutivo do CPV desde a sua origem no final da década de 70, até os dias atuais: FPV (parvovírus felino), RPV (*raccoon parvovirus*), BFPV (parvovirus da raposa azul), MEV (vírus da enterite do *mink*), CPV (parvovirus canino) (Modificado de TRUYEN et al., 1995), p. 26
- Figura 4** Esquema da patogenia da infecção pelo CPV (MACARTNEY et al., 1984; POLLOCK; COYNE, 1993; SMITH-CARR et al., 1997), p. 28
- Figura 5** Localização da sequência dos iniciadores em relação ao genoma do CPV, p. 41
- Figura 6** Esquema ilustrativo do teste comercial de EIE (*SNAP Parvo Antigen Test - Idexx Laboratories®*): (a) dispositivo *SNAP* (b) leitura da reação, p. 42
- Figura 7** Resultado dos métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico laboratorial da parvovirose canina. (A) Reação de hemaglutinação: fileiras a, b, e, g: amostras positivas; c, d, f: amostras negativas; h: controle de hemácias; (B) Ensaio Imunoenzimático: amostra positiva; (C) Reação em cadeia pela polimerase com par de iniciador P2ab: fileiras 1: marcador de PM 123pb; 2-9: amostras positivas; 11-13; amostras negativas; 10 e14: controles positivo e negativo, p. 47
- Figura 8** Comparação dos resultados da PCR com HA/HI (a) e EIE (b). Os números indicam amostras positivas (+) e negativas (-) para CPV. A concordância, especificidade, sensibilidade e valor-p do HA/HI e EIE comparados ao PCR foram calculados e estão indicados, p. 49

## LISTA DE QUADRO

- Quadro 1** Descrição dos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase, com o tamanho em pares de base (pb) de seus respectivos produtos, p. 41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Resultado dos três testes laboratoriais utilizados para a detecção de CPV em 57 amostras fecais de cães com diarreia, p. 48
- Tabela 2** Comparação entre o título de HA das 57 amostras fecais e os resultados dos testes de EIE e PCR, p. 49
- Tabela 3** Distribuição das amostras de cães testadas em relação ao sexo, faixa etária e vacinação dos cães na Zona Sul do Rio de Janeiro e no Município de Duque de Caxias, p. 51
- Tabela 4** Distribuição do número de amostras positivas e testadas para CPV de acordo com a vacinação nos Municípios do Rio de Janeiro e Duque de Caxias, p. 52
- Tabela 5** Análise das amostras positivas para CPV obtidas de animais vacinados, p. 53
- Tabela 6** Distribuição das amostras positivas e testadas de acordo com os sinais clínicos apresentados pelos cães na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e no Município de Duque de Caxias, p. 54

## LISTA DE APÊNDICE

**Apêndice 1** Ficha de identificação do animal, p. 72

## LISTA DE ANEXO

- Anexo 1** Aprovação do COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM ANIMAL (CEPA) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP/UFF), sob o nº0082/09, p. 74

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o final da década de 70, com o aparecimento do parvovírus canino (CPV) como um novo patógeno, a enterite viral tem sido reconhecida como uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em filhotes de cães até seis meses de idade (HOSKINS, 1998; MURPHY et al., 1999).

Em condições naturais o CPV acomete canídeos selvagens e domésticos. Quando o vírus emergiu em 1978 encontrou uma população canina suscetível e a infecção por este vírus foi relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade. Com a vacinação dos filhotes e a soroconversão dos adultos através do contato com o vírus no ambiente, o impacto da doença diminuiu, mas o CPV ainda é considerado uma importante causa de gastroenterite (PARRISH et al., 1988; POLLOCK; COYNE, 1993; PARRISH; KAWAOKA, 2005).

Na enterite pelo CPV, dois aspectos principais estão relacionados à persistência da infecção na população canina: a presença de anticorpos maternos que interfere diretamente na imunização (principal forma de prevenção) constituindo uma importante causa de falha vacinal em filhotes (HOMEM; MENDES; LINHARES, 1999) e a resistência do agente à inativação (SIEGL, 1984). Este último aspecto possui grande importância na epidemiologia da doença, visto que animais infectados eliminam o vírus principalmente em canis, exposições zootécnicas, clínicas veterinárias e outros locais com grandes concentrações de animais, possibilitando a infecção de cães suscetíveis (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; COYNE, 1996).

Vários trabalhos realizados no país demonstraram a importância do CPV como agente de gastroenterite em cães (ANGELO et al., 1980; HAGIWARA et al., 1980; MEHNERT et al., 1996; HOMEM; MENDES; LINHARES, 1999; CUBEL GARCIA et al., 2000; 2002). Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro por um período de nove anos (1995 a 2004) pode-se confirmar a infecção pelo CPV em 46% dos cães até seis meses de idade portadores de gastroenterite. Neste estudo os sinais clínicos clássicos da parvovirose canina (vômito, anorexia, apatia e diarreia hemorrágica líquida) foram observados em 70% dos animais com CPV e em 60% dos animais não infectados por CPV (CASTRO et al., 2007a).

Uma vez que os sinais clínicos observados na infecção por CPV são inespecíficos e semelhantes aos causados por diversos agentes infecciosos como outros vírus, parasitos intestinais e bactérias, o diagnóstico da parvovirose baseado somente em achados clínicos é insuficiente (HAGIWARA et al., 1980; HOMEM; MENDES; LINHARES, 1999; DESARIO et al., 2005; CASTRO et al., 2007a).

A intensidade dos sinais clínicos na infecção por CPV pode variar, mas a gravidade do quadro clínico clássico faz com que o proprietário do animal procure um serviço veterinário para atendimento. Portanto, a existência de métodos rápidos de diagnóstico para a detecção do vírus no estágio agudo da infecção é fundamental para esclarecer a etiologia da gastroenterite. Tal diagnóstico é particularmente importante em canis e abrigos de maneira a prevenir o contato com animais suscetíveis (DESARIO et al., 2005).

Como os resultados de um estudo anterior demonstraram a ampla circulação do CPV no estado do Rio de Janeiro (CASTRO et al., 2007a), decidiu-se investigar a ocorrência da infecção por CPV em cães diarreicos provenientes de duas áreas geográficas distintas, como também avaliar três métodos rápidos de diagnóstico utilizados para confirmar tal suspeita clínica.

Portanto, este trabalho teve como objetivos:

**OBJETIVO GERAL:**

- Avaliar métodos rápidos de diagnóstico para a confirmação de casos suspeitos de infecção pelo parvovírus canino (CPV), utilizando amostras fecais diarréicas de filhotes de cães com gastroenterite provenientes de duas populações de áreas geograficamente distintas: Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e Município de Duque de Caxias.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Realizar o diagnóstico laboratorial dos casos de gastroenterite causados pelo CPV através dos testes de hemaglutinação (HA)/ inibição da hemaglutinação (HI), ensaio imunoenzimático (EIE) e reação em cadeia pela polimerase (PCR);
- Comparar sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de diagnóstico;
- Analisar a ocorrência e os fatores relacionados à infecção pelo CPV (idade, raça, histórico de vacinação e sinais clínicos) em filhotes de cães com gastroenterite, de duas populações de áreas geograficamente distintas: Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e Município de Duque de Caxias, no período de maio de 2007 a maio de 2009.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

Em 1978, uma nova doença contagiosa e frequentemente fatal, caracterizada por causar miocardite em cães entre três e dezesseis semanas de idade ou enterite hemorrágica em animais mais velhos, foi relatada na Austrália, Canadá e nos Estados Unidos da América (EUA). Os achados clínicos e histopatológicos da enterite em cães eram similares aos observados na infecção pelo vírus da panleucopenia felina (FPV) em gatos e pelo vírus da enterite do *mink* (MEV) em mustelídeos. Poucos meses após a descrição da enfermidade, partículas semelhantes aos parvovírus foram observadas por microscopia eletrônica (ME) em amostras fecais de cães com a forma miocárdica e entérica da doença, respectivamente. Este novo vírus foi denominado parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) a fim de diferenciá-lo do vírus mínimo do cão (CPV-1) (BINN et al., 1970; APPLE; SCOTT; CARMICHAEL, 1979; HAGIWARA et al., 1980; APPEL; PARRISH, 1987; PARRISH, 1990).

O CPV-1, isolado na Alemanha em 1967 a partir de fezes normais de cães (BINN et al., 1970), foi inicialmente considerado não patogênico. Entretanto, este vírus já foi detectado em casos de enterite e diarreia em neonatos e também foi isolado de filhotes e fetos abortados na Europa, EUA e Ásia. Estudos sorológicos indicam que o CPV-1 é prevalente na população canina, mas desde os achados iniciais em 1968, poucos relatos existem sobre este vírus (CARMICHAEL, 2005).

A correlação entre o CPV e FPV foi logo reconhecida e alguns estudos demonstraram que o CPV é antigênica e geneticamente similar aos FPV e MEV, sendo,

portanto, considerado uma variante do FPV (POLLOCK; COYNE, 1990; PARRISH, 1994; TRUYEN, 1999).

Apesar da disseminação global de CPV ter se iniciado em 1978, amostras de soro de cães obtidas em 1974 na Grécia, em 1976 na Bélgica e em 1977 nos Países Baixos, já apresentavam anticorpos, indicando que este vírus já estava circulando na população canina antes de 1978 (PARRISH; KAWAOKA, 2005).

No Brasil, os primeiros casos de enterite hemorrágica foram observados em São Paulo em 1979, mas a disseminação do vírus na população canina ocorreu a partir de 1980, com surtos iniciais caracterizados por alta morbidade e mortalidade (ANGELO et al., 1980; HAGIWARA et al., 1980).

Embora a vacinação tenha reduzido a incidência da parvovirose e a forma miocárdica da doença não seja mais encontrada, a enterite por CPV ainda é um problema para os filhotes entre seis semanas e seis meses de idade (POLLOCK; COYNE, 1990; CASTRO et al., 2007a).

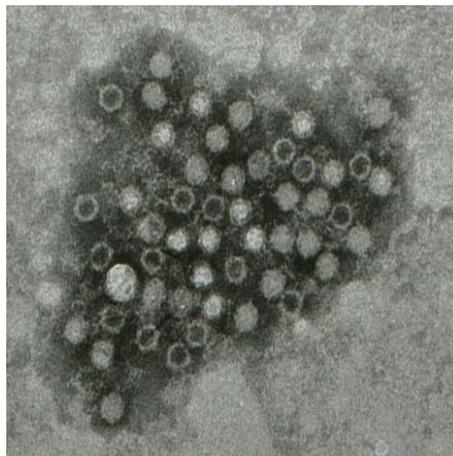
## 2.2 Classificação

Os parvovírus patogênicos de animais estão classificados na família Parvoviridae, sub-família Parvovirinae, gênero *Parvovirus*, sendo que o vírus da panleucopenia felina (FPV), vírus da enterite do *mink* (MEV) e CPV juntamente com o parvovírus da raposa azul (*blue fox parvovirus*-BFPV), *raccoon parvovirus* (RPV) e *raccoon dog parvovirus* (RDPV) formam o Subgrupo dos Parvovírus Felinos (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

## 2.3 Características do Vírus

As partículas de CPV quando visualizadas ao microscópio eletrônico (ME) são esféricas, destituídas de envelope, com diâmetro variando de 18 a 26nm e capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 1). O peso molecular da partícula viral completa é de  $5,0$  a  $6,2 \times 10^6$  daltons e densidade do vírion em gradiente de cloreto de césio é de  $1,39$  a  $1,42\text{g/cm}^3$  (SIEGL, 1984).

O capsídeo é constituído de 60 cópias das proteínas VP1 (84KDa) e VP2 (67KDa), sendo cinco a seis cópias de VP1 e 54-55 cópias de VP2. A VP1 é semelhante a VP2, com a adição de 154 aminoácidos na região amino terminal. Nas partículas infecciosas de CPV, a clivagem de 15-20 aminoácidos na região amino terminal de VP2 gera a proteína VP3 (63KDa) (PARADISE; RHODE; SINGER, 1982; TSAO et al., 1991; PARRISH, 1999). Esta clivagem parece ser essencial à infectividade do vírus porque expõe sequências ricas em glicinas, importantes na interação com a membrana celular (WU; ROSSMAN, 1993). A proteína VP2 além de ser o sítio de ligação ao receptor confere ao vírus a propriedade hemaglutinante *in vitro* e contém os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (LOPEZ DE TURIZO et al., 1991).



**Figura 1.** Fotomicrografia eletrônica de partículas de CPV em amostra fecal de um cão com gastroenterite hemorrágica (WILLI, 1998).

O genoma viral consiste de um único filamento de ácido desoxiribonucleico (DNA), linear e de aproximadamente 5.200 nucleotídeos (nt), o qual tem dois promotores que dirigem a expressão de duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e duas proteínas estruturais (VP1 e VP2). O genoma contém nas regiões 3' e 5' sequências palindrômicas, de aproximadamente 150nt, que são utilizadas na replicação do DNA viral e somente as fitas negativas de DNA são encapsidadas na partícula viral (REED; JONES; MILLER, 1988; PARRISH, 1999).

Os parvovírus são resistentes à inativação e podem persistir no ambiente por meses a anos, sendo estáveis a variações de pH (3,0 - 9,0) e temperatura de 56°C/60min. e ao tratamento com solventes orgânicos. Gordon e Angrick (1986) demonstraram que o CPV pode manter-se infectante por até cinco meses no ambiente. Os parvovírus são sensíveis à formalina (0,2%), hipoclorito de sódio (1:30) e radiação ultravioleta (SIEGL, 1984).

## 2.4 Replicação do vírus

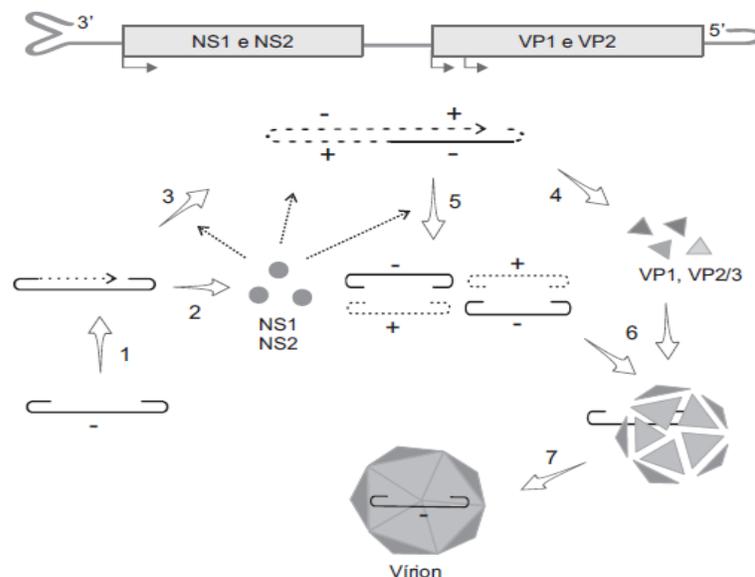
A infecção do CPV está associada à habilidade do capsídeo viral adsorver-se ao receptor de transferrina (Tf), uma glicoproteína de superfície celular expressa na maioria das células do organismo, responsável pelo transporte de ferro para o interior da célula (HUEFFER; PARRISH, 2003; PARRISH; KAWAOKA, 2005).

Em células com intensa atividade mitótica tais como da cripta do epitélio intestinal e do tecido hematopoiético, estes receptores podem ser encontrados em níveis elevados, representando os principais alvos do CPV nos animais. Após a ligação deste vírus ao receptor de Tf ocorre a formação de um complexo (vírus-receptor) que é rapidamente transportado para um sistema endossomal no interior da célula. Os três novos tipos de CPV são capazes de se ligarem tanto ao receptor de Tf canino como felino, enquanto que o FPV apenas a receptores de Tf felinos. Por essa razão o FPV não é capaz de infectar cães e de se replicar em cultura de células caninas (HUEFFER; PARRISH, 2003; PARRISH; KAWAOKA, 2005).

O genoma do CPV não codifica a enzima necessária para a etapa inicial da replicação do DNA (DNA polimerase), que é responsável pela síntese da fita de DNA complementar ao DNA viral simples fita. Como a DNA polimerase celular é somente expressa durante a mitose, a primeira e crucial etapa da replicação viral, portanto, requer a divisão celular (fase S tardia ou G2 do ciclo mitótico). A idade de um animal infectado é muito importante para o estabelecimento dos principais alvos da infecção pelo parvovírus, sendo os tecidos fetais ou de recém nascidos uma rica fonte de células em atividade mitótica. Em animais jovens o tecido linfóide e particularmente o epitélio

do intestino delgado apresentam um grande número de células em intensa proliferação celular (PARRISH; KAWAOKA, 2005).

A replicação do genoma dos parvovírus ocorre no núcleo da célula infectada, onde as sequências palindrômicas terminais dobram sobre si mesmas, formando uma estrutura semelhante a um grampo (*hairpin*), que atuam como iniciadores para a DNA polimerase celular, conforme esquematizado na figura 2. Então o genoma DNA de fita simples (ssDNA) é, inicialmente, convertido em DNA de fita dupla (dsDNA) <sup>(1)</sup>, seguido da expressão (transcrição, tradução) das proteínas NS1 e NS2<sup>(2)</sup>. A proteína NS1 é essencial nas etapas seguintes da replicação do genoma<sup>(3)</sup>, para a expressão das proteínas estruturais<sup>(4)</sup> e também na fase final da replicação do DNA<sup>(5)</sup>. A síntese das proteínas estruturais ocorre no citoplasma da célula, porém os genomas recém-replicados são encapsidados pelas proteínas estruturais VP1 e VP2/3 no núcleo, originando as novas partículas virais, que são liberadas por lise celular <sup>(6,7)</sup> (MORAES; COSTA, 2007).



**Figura 2.** Etapas da expressão gênica e replicação dos parvovírus autônomos (MORAES; COSTA, 2007).

## 2.5 Variação antigênica

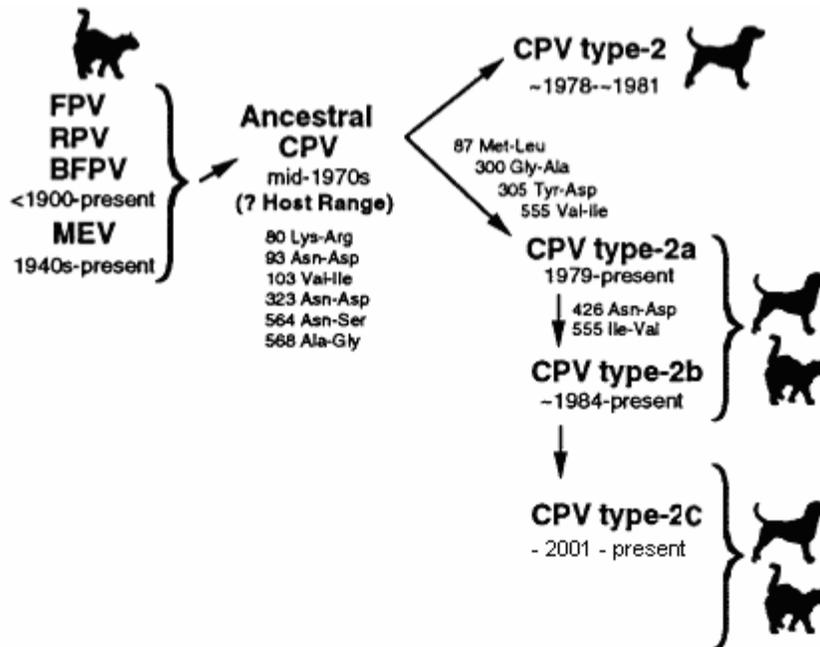
Apesar das controvérsias sobre a origem do CPV, a hipótese mais aceita é a de que este vírus é uma variante do FPV ou de outro parvovírus estritamente relacionado após a passagem em um hospedeiro carnívoro, tal como mustelídeos (*ferrets* e *minks*), canídeos (cães, raposas e lobos), procionídeos (guaxinins) e felídeos (gatos, leões, tigres e chitas). Entretanto, a natureza do vírus ancestral ainda não foi determinada. O CPV e FPV apresentam uma homologia de genoma de aproximadamente 98% e diferem em cerca de oito a dez aminoácidos nas proteínas de capsídeo VP1 e VP2 (PARRISH et al., 1988; PARRISH, 1994).

Desde que surgiu em 1978 como um novo patógeno de cães as amostras de parvovírus canino podem ser diferenciadas em CPV tipo 2 (tipo “antigo”) ou CPV tipos 2a ou 2b (tipos “novos”), pela reação com anticorpos monoclonais, diferenças no mapa de restrição (PARRISH; EVERMANN; CARMICHAEL, 1985; PARRISH, 1994) e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (MOCHIZUKI et al., 1993; SENDA et al., 1995). Os tipos novos do vírus rapidamente substituíram o tipo original CPV-2 em circulação e acredita-se que estas novas variantes (CPV-2a/ CPV-2b) surgiram para uma melhor adaptação do vírus ao hospedeiro canino. Além disso, estes novos tipos estenderam o espectro de hospedeiro do CPV que adquiriu a capacidade de infectar felinos domésticos e selvagens (PARRISH; EVERMANN; CARMICHAEL, 1985; PARRISH; KAWAOKA, 2005) (Figura 3).

Tanto CPV-2a como CPV-2b são detectados na população canina do mundo em diferentes proporções. Enquanto em algumas regiões o CPV-2b é o tipo prevalente, em outras o tipo 2a é a variante mais comum (PARRISH; EVERMANN; CARMICHAEL, 1985; PARRISH et al., 1991; PARRISH, 1994; TRUYEN et al., 1995; BUONAVOGLIA; CAVALLI; PRATELLI, 2000; COSTA et al., 2005).

Em 2000, Bounavoglia et al. detectaram na Itália uma amostra de CPV-2b apresentando uma substituição de aminoácidos na posição 426, de ácido aspártico (Asp) para ácido glutâmico (Glu). Atualmente esta nova variante (CPV-2c), é a mais detectada na população canina da Itália (MARTELLA et al., 2005) e já foi detectada no Vietnã (NAKAMURA et al., 2004), Espanha (DECARO et al., 2006a), Alemanha

(SHACKELTON et al., 2005), Inglaterra (DECARO et al., 2007), EUA, Índia (KAPIL et al., 2007), Argentina, Uruguai (PÉREZ et al., 2007), Portugal (VIEIRA et al., 2008) e, recentemente no Brasil (RODENBUSCH et al., 2008; CASTRO et al., 2009).



**Figura 3.** Esquema evolutivo do CPV desde a sua origem no final da década de 70, até os dias atuais: FPV (parvovírus felino), RPV (*raccoon parvovirus*), BFPV (parvovirus da raposa azul), MEV (vírus da enterite do *mink*), CPV (parvovirus canino) (Modificado de TRUYEN et al., 1996).

Os estudos que buscam relacionar as diferenças de patogenicidade entre as variantes de CPV apresentam resultados controversos. Enquanto um estudo de infecção experimental descreveu maior patogenicidade da variante CPV-2a em comparação com a 2b, outro realizado a partir de amostras clínicas descrevem casos graves de enterite hemorrágica relacionados à infecção pelas duas variantes (MEERS et al., 2007; MOON et al., 2007). Os primeiros relatos de infecção pelo CPV-2c descreveram sinais clínicos brandos e menor patogenicidade relacionada a este vírus, mas estudos experimentais e observações recentes relataram sinais entéricos relacionados a quadros de diarreia hemorrágica grave e alta mortalidade relacionada a esta variante (DECARO et al., 2009; KAPIL et al., 2007).

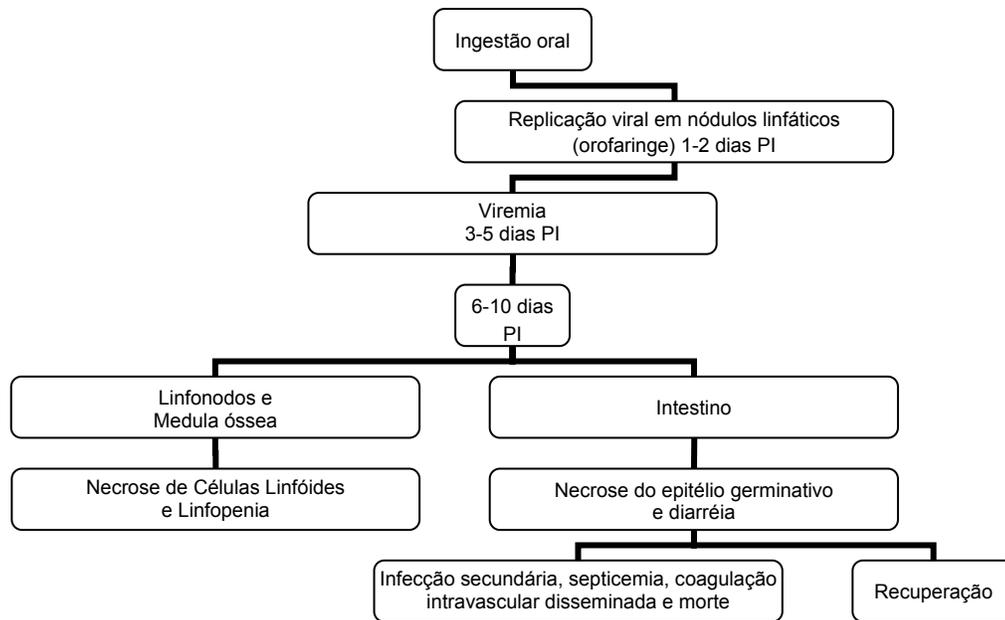
## 2.6 Patogenia, transmissão e manifestações clínicas

Os estudos de infecção experimental em filhotes de cães mostraram que a infecção natural ocorre pela via oral, com replicação inicial do vírus nos tecidos linfóides da orofaringe dois dias após infecção (PI). A seguir, uma intensa viremia é observada três a cinco dias PI, disseminando o vírus para outros tecidos: medula óssea, tecido linfóide e intestino delgado (MACARTNEY et al., 1984). Embora geralmente se manifeste como uma doença entérica, a infecção pelo CPV é uma enfermidade com disseminação sistêmica, com as manifestações clínicas surgindo cinco dias PI (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; POLLOCK; COYNE, 1990).

No trato intestinal, a replicação viral nas células do epitélio germinativo das criptas do intestino delgado resulta em morte celular, levando à destruição do epitélio e, conseqüentemente, achatamento das vilosidades intestinais. Quando ocorre a atrofia das vilosidades, o intestino delgado perde a capacidade de absorção, pois o epitélio germinativo responsável por substituir o epitélio maduro foi destruído. Devido à reposição celular, que ocorre em um a três dias, esta perda normalmente é limitada (POLLOCK; COYNE, 1990) (Figura 4).

O vírus pode ser detectado nas fezes a partir do 3º e 4º dias PI, mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos. A maior concentração do vírus nas fezes é observada entre o 4º e 6º dias PI, coincidindo com a manifestação clínica característica de gastroenterite (APPEL; PARRISH, 1987; POLLOCK; COYNE, 1993).

Foi estabelecido que a dose mínima infectante para cães é de aproximadamente 1 TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dose* ou dose infectante em cultura de tecido) enquanto a quantidade de partículas virais excretadas por um cão infectado pode chegar a 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub> /g de fezes do 5º ao 8º dia(s) de doença (MOORE, 1983). A transmissão fecal-oral ocorre quando animais infectados liberam partículas virais nas fezes que permanecem no ambiente por longos períodos e que infectam animais saudáveis pela ingestão de água ou alimento ou contato com fômites contaminados (MURPHY et al., 1999).



**Figura 4.** Esquema da patogenia da infecção pelo CPV (MACARTNEY et al., 1984; POLLOCK; COYNE, 1993; SMITH-CARR; MACINTIRE; SWANGO, 1997).

Em condições naturais o CPV acomete canídeos selvagens e domésticos. Quando o vírus surgiu em 1978 encontrou uma população canina suscetível e os primeiros casos clínicos da parvovirose estavam relacionados à ocorrência de miocardite aguda fatal em fetos e em filhotes recém nascidos. Atualmente, com a vacinação e a proteção adquirida passivamente através dos anticorpos maternos, esta forma clínica não é mais observada (PARRISH et al., 1988; POLLOCK; COYNE, 1990).

Pela necessidade, para a replicação, de células em atividade mitótica, o CPV apresenta tropismo por tecidos de animais jovens ou recém-nascidos, ou tecidos de animais adultos com intensa proliferação (TSAO et al., 1991). Os tipos de CPV-2a, 2b e 2c possuem um padrão de distribuição semelhante em cães infectados, sugerindo um mesmo comportamento biológico (DECARO et al., 2007a).

Os filhotes entre seis semanas e seis meses de vida são os mais suscetíveis e a forma clínica predominante da parvovirose canina é a gastroenterite, que se caracteriza pela eliminação de fezes de consistência diminuída com ou sem hematoquezia. Os primeiros sinais clínicos geralmente são inespecíficos, observados entre o 4º e 5º dias PI e incluem anorexia, apatia e febre (MCARTNEY et al., 1984; GUILFORD;

STROMBECK, 1996; MACINTIRE; SMITH-CARR, 1997; MARTIN et al., 2002; PRITTIE, 2004).

Vômito e diarreia ocorrem de 24 a 48 horas após os sinais prodômicos e levam a desidratação rapidamente, além de serem associados com a rápida destruição de células em mitose do intestino e medula óssea (SHERDING, 1989; POLLOCK; COYNE, 1993; OTTO et al., 2000). Vômitos normalmente apresentam-se com um aspecto mucoso claro ou coloração de bile. A diarreia pode ser pastosa, mucoide nos casos mais brandos, ou hemorrágica com odor fétido bem acentuado nos casos mais graves. A diarreia hemorrágica em filhotes de cães pode ser considerada um indicativo da infecção por CPV (CARMICHAEL; BINN, 1981; PARRISH, 1995; GUILFORD; STROMBECK, 1996; McCAW; HOSKINS, 1998).

A manifestação clínica da infecção e a intensidade dos sintomas podem variar conforme a idade, imunidade do hospedeiro, presença de fatores debilitantes associados (vírus e parasitos), e quantidade de partículas virais inoculadas (SHERDING, 1989; McCAW; HOSKINS, 1998).

Após o período das manifestações clínicas, que geralmente duram de seis a sete dias, o animal imunocompetente recupera o seu estado geral, desenvolvendo anticorpos contra CPV. Entretanto, em alguns casos, com a presença das lesões na mucosa intestinal, pode ocorrer proliferação bacteriana e septicemia, levando a um quadro de coagulação intravascular disseminada (CID) e óbito, principalmente naqueles filhotes sem tratamento imediato (POLLOCK; COYNE, 1990).

A infecção subclínica é mais comum em filhotes com idade superior a seis meses e adultos, e estes cães participam de maneira significativa na transmissão do patógeno, visto que animais infectados eliminam o vírus juntamente com as fezes (GLICKMAN et al., 1985; MASON; GILLET; MUGGENBURG, 1987; POLLOCK; COYNE, 1993). A infecção associada com a doença clínica é rara em cães adultos, mas pode ser observada recentemente em um surto de CPV-2c nos EUA (DECARO et al., 2006a; KAPIL et al., 2007).

## 2.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico baseia-se na anamnese, nos sinais e sintomas e é usualmente realizado eliminando-se outras causas de gastroenterite como distúrbios alimentares, parasitismo intestinal, bacterioses e outras viroses entéricas (McCAW; HOSKINS, 1998).

Um quadro súbito de diarreia hemorrágica e vômito em filhotes, particularmente associado à febre, depressão grave ou leucopenia é sugestivo de infecção por CPV, principalmente se precedido de contato com outros animais doentes ou fômites. Entretanto, os casos com sintomas mais brandos ou atípicos podem se tornar clinicamente indistinguíveis. Além disso, infecções mistas (virais ou virais e bacterianas) não são incomuns (McCANDLISH, 1981; McCAW; HOSKINS, 1998).

Como o diagnóstico clínico da infecção por CPV é inconclusivo, a confirmação da infecção baseia-se na detecção direta do vírus ou genoma viral a partir de amostras fecais colhidas dos casos agudos da infecção, pois neste estágio, a quantidade de vírus eliminada pelo animal pode alcançar até  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/g de fezes (MOORE, 1983; POLLOCK; COYNE 1990).

Entre os métodos utilizados para o diagnóstico podemos citar a observação das partículas virais pela ME, a reação de hemaglutinação (HA) seguida pela reação de inibição da hemaglutinação (HI), o ensaio imunoenzimático (EIE), o isolamento em cultura de células e a detecção do genoma viral pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980; TERRAMOTO et al., 1984; APPEL; PARRISH, 1987; DURIGON et al., 1987; MOCHIZUKI et al., 1993).

O CPV pode ser cultivado em linhagens celulares de origem felina ou canina, sendo as células de rim de cão (*Madin-Darby canine kidney* - MDCK), células de rim felino (*Crandel feline kidney* - CRFK) e a linhagem celular A72 de fibroma canino, as mais utilizadas (APPEL; SCOTT; CARMICHAEL, 1979; APPEL; PARRISH, 1987; TRUYEN; PARRISH, 1992). A ausência de isolamento viral também não exclui o diagnóstico, já que a presença de substâncias tóxicas para as células nas amostras fecais pode interferir nos resultados. O isolamento requer o tempo mínimo de sete dias e devido à natureza contagiosa da infecção e facilidade de disseminação do CPV, a

utilização de testes rápidos para a triagem dos casos suspeitos é importante (DESARIO et al., 2005; DECARO et al., 2006b).

Como a proteína VP2 do capsídeo viral confere ao vírus a capacidade de aglutinar hemácias de suínos *in vitro*, a técnica de hemaglutinação (HA) é utilizada como método de rotina para o diagnóstico rápido da parvovirose canina, entretanto os resultados positivos devem ser confirmados pela reação de inibição da hemaglutinação (HI) com um antisoro específico para o CPV (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980; SENDA et al., 1986; DURIGON et al., 1987). Ainda, a reação de HI com anticorpos monoclonais permite a diferenciação antigênica das amostras de CPV (PARRISH; EVERMANN; CARMICHAEL, 1985).

A utilização de testes rápidos baseados no ensaio imunoenzimático (EIE) e imunocromatográfico, atualmente disponíveis no mercado em forma de *kits* comerciais (DESARIO et al., 2005; KENNEDY, 2005; DECARO et al., 2006a, 2009), é importante para a triagem dos casos suspeitos, especialmente em canis, exposições zootécnicas, clínicas veterinárias e abrigos para isolamento de cães infectados, prevenindo a infecção secundária em animais contactantes suscetíveis (COYNE, 1996; DESARIO et al., 2005).

Métodos baseados na amplificação do genoma viral mostraram ser altamente sensíveis e a PCR além de permitir a detecção do genoma do CPV em amostras de fezes possibilita também a diferenciação entre os tipos antigo (CPV-2) e novos do vírus (CPV-2a/2b/2c) através da utilização de iniciadores específicos (MOCHIZUKI et al. 1993; SENDA et al., 1995; PEREIRA et al., 2000; BUONAVOGLIA et al., 2001; COSTA et al., 2005). Esta diferenciação é particularmente importante para o esclarecimento da infecção em animais que receberam vacina constituída do tipo antigo do vírus (SENDA et al., 1995; COSTA et al. 2005).

Atualmente, o método considerado mais fidedigno para a caracterização das amostras de parvovírus é o sequenciamento genômico, o qual se baseia na determinação da sequência de nucleotídeos do gene das proteínas de capsídeo VP2 permitindo definir com precisão a variante de parvovírus presente na amostra e a análise da relação filogenética do recente isolado com as amostras de parvovírus

anteriormente sequenciadas (BUONAVOGLIA et al., 2001; BATTILANI et al., 2002; DESARIO et al., 2005).

Recentemente, a PCR em tempo real (qPCR) tem sido utilizada para a detecção, tipagem e quantificação de DNA do CPV em fezes de cães com diarreia. Este método possibilita determinar o número de cópias do genoma viral e o período de eliminação nas fezes, o que é importante para a avaliação da eficácia de vacinas (DECARO et al., 2006a; 2007).

## 2.8 Prevenção e Vacinação

Historicamente, os surtos de enterite por CPV tem sido difíceis de controlar. O vírus pode sobreviver por mais de seis meses em temperatura ambiente, e é facilmente transportado entre cães através de gaiolas, fômites ou seres humanos (PRITTIE, 2004). As boas práticas de higiene, inclusive a desinfecção de todas as superfícies expostas com hipoclorito de sódio (1:30), assim como para lavar utensílios e roupas, deixando agir durante um período de 10min., é fundamental para prevenir a transmissão do vírus (McCAW; HOSKINS, 1998).

A vacinação dos cães é o tratamento profilático mais recomendado (PRITTIE, 2004) e devido à similaridade antigênica entre o CPV e o FPV, vacinas à base de FPV inativado chegaram a ser comercializadas para uso canino no início da década de 80, entretanto ficou comprovado que a resposta à vacina inativada com CPV era superior à obtida com a vacina produzida com FPV e esta deixou de ser utilizada (MOORE, 1983; BURTONBOY et al., 1991).

A presença de anticorpos maternos é considerada a causa mais comum de falha vacinal em filhotes. Vários estudos mostraram que títulos de anticorpos séricos  $\geq 80$  pela reação de HI são considerados protetores e títulos  $\geq 10$  já interferem na imunização com vacinas para CPV (POLLOCK; COYNE, 1993). Os filhotes que nascem de cadelas com baixos títulos de anticorpos podem tornar-se suscetíveis ao vírus selvagem após quatro a seis semanas de vida, enquanto filhotes de cadelas com altos

títulos de anticorpos podem permanecer imunes à infecção por até 12-20 semanas após o nascimento (MURPHY et al., 1999).

Este intervalo, chamado janela imunológica, pode durar algumas semanas, durante as quais os cães não respondem à imunização, mas estão vulneráveis à infecção (BUONAVOGLIA et al., 1992; LARSON; SHULTZ, 1997).

Na tentativa de reduzir este período de suscetibilidade, quatro anos após o surgimento do CPV, vacinas constituídas por vírus atenuado (MLV ou *Modified Live Virus*) foram elaboradas a partir de amostras isoladas no início da década de 80. Com o mesmo objetivo, na década de 90, vacinas constituídas por vírus modificado com alto título ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/dose) e baixa passagem (HTLP ou *High Title Low Passage*) foram desenvolvidas (BURTONBOY et al., 1991; BUONAVOGLIA et al., 1992). Atualmente, vacinas polivalentes constituídas pelo tipo antigo do vírus (CPV-2) ou pelo tipo CPV-2b estão disponíveis no mercado para a prevenção da parvovirose canina (LARSON; SHULTZ, 2008).

No fim da década de 80, uma vacina atenuada foi desenvolvida com a variante CPV-2a e permaneceu no mercado por 10 anos. Durante este período, nenhuma vantagem imunológica foi observada com o uso da vacina constituída por este tipo em relação à vacina constituída pelo tipo antigo (CPV-2) (LARSON; SHULTZ, 2008).

A primeira vacina constituída pelo tipo CPV-2b foi desenvolvida no fim da década de 90. Estudos realizados por Pratelli et al. (2000) demonstraram que esta vacina produziu uma melhor resposta protetora em filhotes com títulos de anticorpos maternos elevados em comparação com a vacina constituída pelo CPV-2. Sabe-se que CPV-2a e 2b podem ser eliminados nas fezes em concentrações muito superiores que o CPV-2 (CARMICHAEL; SCHLAFER; HASHIMOTO, 1994), provavelmente como uma consequência da adaptação das variantes de CPV ao hospedeiro canino o que explicaria porque a variante 2b foi mais eficiente em superar o bloqueio dos anticorpos maternos (DECARO et al., 2005).

As vacinas contra CPV estão disponíveis no mercado de forma isolada ou associadas a outros antígenos, como vírus da cinomose, hepatite, parainfluenza e bacterinas de *Leptospira* spp. Estudos demonstraram que a imunidade conferida pela

vacina contra CPV não é alterada quando usada de forma associada (BASS et al., 1982; CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1983). Cães adultos não são normalmente suscetíveis à infecção por CPV devido à vacinação ou infecções prévias com um vírus selvagem (DECARO et al., 2008).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 AMOSTRA CLÍNICA

As amostras clínicas foram obtidas de filhotes de cães até um ano de idade apresentando diarréia líquida ou pastosa, hemorrágica ou não, atendidos no Hospital Veterinário e Pet Ypiranga na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e em nove clínicas veterinárias localizadas na região central do Município de Duque de Caxias.

Com o consentimento do proprietário, as amostras fecais foram obtidas após defecação espontânea ou com auxílio de sonda. O material fecal foi recolhido em um frasco plástico com tampa de rosca, imediatamente fechado, identificado e enviado sob refrigeração (4 °C a 8 °C) ao Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF. Cada amostra era acompanhada de uma ficha contendo os seguintes dados: identificação do proprietário, resenha do animal, data da colheita da amostra, sinais clínicos e histórico de vacinas (Apêndice 1).

Um total de 108 amostras fecais diarréicas foram coletadas, sendo 50 amostras da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e outras 58 provenientes do Município de Duque de Caxias. As amostras da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro foram coletadas no período de maio de 2007 e maio de 2009 e as do Município de Duque de Caxias entre janeiro de 2006 a março de 2009. Dentre as 58 amostras do Município de Duque de Caxias, 40 foram coletadas no mesmo período que as da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro.

Este trabalho obteve a aprovação do COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP/UFF), sob o registro nº 0082/09 (Anexo 1).

### 3.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

#### 3.1.2.1 *Solução de Alsever*

Dextrose (Vetec ®).....	20,5g
Citrato de sódio (Vetec ®).....	8,0g
Cloreto de sódio (Reagen ®).....	4,2g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

O pH foi ajustado para 6,1 com uma solução de ácido cítrico a 5% e o conteúdo foi transferido para proveta de 1000mL e o volume final completado com água destilada. A solução foi autoclavada a 110°C por 10min. e estocada a 4°C.

#### 3.1.2.2 *Tampão Tris-Ca<sup>++</sup> 0,01M pH 7,2*

Tris-base (Invitrogen ®).....	1,21g
Cloreto de Cálcio 0,0015M (Vetec ®).....	0,02g
Água Mili-Q q.s.p.....	1000,00mL

Em um béquer de 2000mL os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético. O pH 7,2 foi ajustado com ácido clorídrico P.A. (Merck®) antes de completar o volume final em proveta de 1000mL. A solução foi transferida para frasco com vedação, autoclavada a 121°C por 20min. e foi estocada em geladeira a 4°C.

### 3.1.2.3 Tampão salina-borato (BABS) pH 9,0

Cloreto de sódio 1,5 M (Reagen ®).....	80,0mL
Ácido bórico 0,5 M (Merck ®).....	100,0mL
Hidróxido de Sódio 1,0 M (Merck ®).....	24,0mL
Soroalbumina bovina (Sigma®) .....	0,2%
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

As três soluções foram preparadas separadamente. Antes de adicionar a soroalbumina bovina, esta foi dissolvida em banho-maria a 37°C. A solução foi estocada a 4°C.

### 3.1.2.4 Tampão VAD (virus-adjusting diluent) pH 6,4

#### **Solução A:**

Cloreto de sódio (Reagen ®).....	8,77g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec ®).....	80,40g
Água destilada q.s.p.....	1000,00mL

#### **Solução B:**

Cloreto de sódio (Reagen ®).....	8,77g
Fosfato de sódio monobásico P.A. (Vetec ®).....	41,40g
Água destilada q.s.p.....	1000,00mL

As soluções foram preparadas separadamente e estocadas a 4°C. Para pH 6,4, 320mL da solução A foi misturado a 680mL da solução B.

### 3.1.2.5 Caolim 25%

Caolim P.A (Vetec®).....	2,5g
Água destilada q.s.p.....	10,0mL

Os reagentes foram homogeneizados e acondicionado em tubo Falcon® a 4°C até sua utilização.

### 3.1.2.6 *Tampão L2 pH 6,4*

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen®) .....	120,0g
Tris-HCl 0,1 M pH 6,4 .....	100,0mL

Em um béquer de 250ml foram adicionados os reagentes e homogeneizados em agitador magnético. O tampão foi acondicionado em frasco protegido da luz e conservado a temperatura ambiente. Esta solução é estável por uma semana.

### 3.1.2.7 *Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 6,4*

Tris-base (Invitrogen®).....	12,11g
Água destilada q.s.p.....	1000,00mL

Em um béquer de 1000mL, foram adicionados os reagentes e homogeneizados em agitador magnético. O conteúdo foi transferido para proveta de 2000mL e o pH foi ajustado a pH 6,4 com ácido clorídrico P.A. (Merck ®), antes de completar o volume final. A solução foi autoclavada a 121°C por 20min. e estocada a 4° C.

### 3.1.2.8 *Tampão NaOH 10N*

Hidróxido de Sódio (Merck®).....	10,0g
Água destilada q.s.p.....	200,0mL

### 3.1.2.9 *Sílica*

Dióxido de Sílica (Sigma®).....	60,0g
Água destilada q.s.p. ....	500,0mL

Os reagentes foram homogeneizados e mantidos em repouso para sedimentação por 24h. 430mL da solução foram aspirados por sucção e desprezados. O volume foi completado para 500mL com água destilada, homogeneizado e mantido em repouso para sedimentação por 5h. 440mL da solução foram aspirados por sucção e desprezados. O sedimento foi ajustado a pH 2,0 pela adição de 600µL de ácido clorídrico 37% (Merck®) e aliquoteado 10mL da solução em frascos de cor âmbar. Os frascos foram autoclavados e estocados à temperatura ambiente.

### 3.1.2.10 *Etanol 70%*

Etanol P.A. (Merck®) .....	70,0mL
Água destilada q.s.p. ....	30,0mL

Os reagentes foram homogeneizados em béquer de 250mL. O volume final foi ajustado em proveta de 250mL. A solução foi mantida a -20°C.

### 3.1.2.11 *EDTA 0,5M pH 8,8*

EDTA (Sigma®) .....	146,1g
Água destilada q.s.p. ....	1000,0mL

Em um béquer de 1000ml foram adicionados EDTA e 300mL de água destilada. O pH 8,8 foi ajustado com hidróxido de sódio (Merck®) e a solução foi homogeneizada com agitador magnético. A solução foi transferida para proveta de 1000mL e o volume final ajustado. A solução foi alíquotada em frascos com tampa e autoclavado a 121°C por 20min. Os frascos foram mantidos a 4°C.

### 3.1.2.12 *Tampão Tris-Boro-EDTA (TBE) 10X pH 8,4*

Tris-base (Invitrogen®) .....	108,0g
Ácido Bórico (Merck®).....	5,5g
EDTA 0,5M pH 8,8 (Sigma®) .....	40,0mL
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

Em um béquer de 2000mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para uma proveta de 1000mL, completado o volume final e transferido para frasco com vedação. A solução final foi conservada a 4°C e diluída para 0,5 X no momento do uso.

### 3.1.2.13 Agarose a 1,5%

Agarose (Invitrogen®).....	1,5g
Tampão TBE 0,5 X pH 8,4 .....	100,0mL

A agarose foi pesada, colocada em erlenmeyer. Foram adicionados 100mL de tampão TBE 0,5X. O erlenmeyer foi levado ao forno de microondas. A mistura foi resfriada a 50°C e colocada na cuba de eletroforese, evitando a formação de bolhas.

### 3.1.2.14 Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio 10mg/mL (Invitrogen®) .....	15,0µL
Água destilada q.s.p. ....	300,0mL

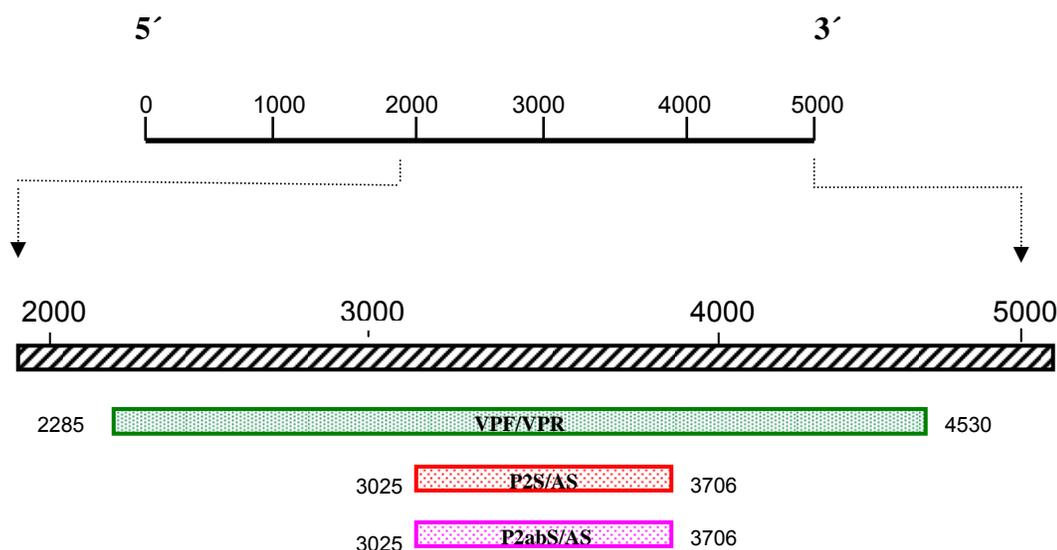
### 3.1.2.15 Tampão corante azul de Bromofenol

Azul de Bromofenol (Shandom So) .....	0,1g
Xylene Cyanol FF (Sigma®) .....	0,1g
EDTA 0,2M pH 8 (Sigma®) .....	10,0mL
Glicerol PA (Sigma®) .....	50,0mL
Água destilada q.s.p. ....	100,0mL

Os reagentes foram gentilmente homogeneizados em um béquer de 250mL até a completa dissolução. Alíquotas de 10mL foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas em temperatura ambiente.

### 3.1.3 INICIADORES UTILIZADOS NA PCR PARA CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA

Para a detecção do genoma viral nas amostras fecais foram utilizados três pares de iniciadores, conforme descritos na Figura 5 e Quadro 1.



**Figura 5.** Localização da sequência dos iniciadores em relação ao genoma do CPV.

**Quadro 1.** Descrição dos iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase, com o tamanho em pares de base (pb) de seus respectivos produtos.

Iniciador	Posição	Sequência 5' - 3'	Produto	Reação com
<b>VPR</b> <sup>(1)</sup> <b>VPF</b>	(2285-2303) (4512-4530)	ATCCACCTCCGGCAAAGA CTCAACTAGCACCTAGAAA	2245 pb	FPV CPV-2 CPV-2a CPV-2b
<b>P2 S</b> <sup>(2)</sup> <b>P2 AS</b>	(3025-3045) (3685-3706)	GAAGAGTGGTTGTAAATAAT <b>A</b> * CTATAT <b>C</b> *ACCAAAGTTAGTAG*	681pb	FPV CPV-2
<b>P2ab S</b> <sup>(2)</sup> <b>P2ab AS</b>	(3025-3045) (3685-3706)	GAAGAGTGGTTGTAAATAAT <b>T</b> * CCTATAT <b>A</b> *ACCAAAGTTAGTAC	681 pb	CPV-2a CPV-2b CPV-2c

<sup>(1)</sup> MOCHIZUKI et al., 1993;

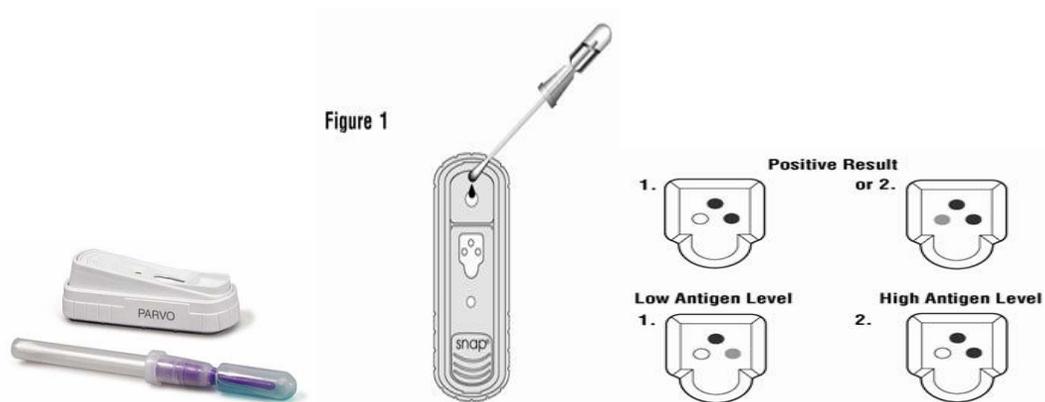
<sup>(2)</sup> SENDA et al., 1995;

\* as bases em destaque são as mutações observadas no genoma do CPV.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE)

Ao chegar ao Laboratório, às amostras de fezes (em temperatura ambiente 15° - 30°C) foram testadas pelo EIE<sup>1</sup>, conforme instruções do fabricante. Resumidamente, parte de cada uma das amostras era retirada com o auxílio do *SWAB* fornecido com o *kit* e imediatamente misturada à solução do *kit*. Após a mistura, as amostras eram aplicadas ao dispositivo *SNAP*<sup>1</sup> (Figura 6a). A amostra fluía pela janela de resultados chegando ao círculo de ativação e, nesse momento, pressionava-se o ativador e a amostra fluía de volta pela janela de resultados. A leitura era realizada oito minutos após a ativação, comparando-se a intensidade de cor do círculo da amostra com a do controle negativo (Figura 6b).



**Figura 6.** Esquema ilustrativo do teste comercial de EIE (*SNAP Parvo Antigen Test - Idexx Laboratories®*): (a) dispositivo *SNAP* (b) leitura da reação.

Após a realização do EIE as amostras fecais foram estocadas a -20°C até posterior utilização.

<sup>1</sup> *SNAP Parvo Antigen Test - Idexx Laboratories®*

### 3.2.2 PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL

Inicialmente foi preparada uma suspensão a 10% de cada amostra fecal em solução Tris-Ca<sup>++</sup> 0,01M pH 7,2 conforme descrito em Castro et al. (2007a). A seguir adicionava-se igual volume de clorofórmio e, após agitação em vortex por um min., as suspensões eram centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) por 15min., e os sobrenadantes estocados em tubo plástico tipo eppendorf® de 1,5mL a -20°C até o momento da análise (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980).

### 3.2.3 REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (HA)/ INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HI)

#### 3.2.3.1 *Preparo da suspensão de hemácias a 0,5%*

Para a realização do teste de triagem é necessária a coleta de sangue de suínos. Estas coletas foram realizadas por venopunção auricular externa. Foram coletados aproximadamente 5mL de sangue total de um animal para a realização do teste.

#### 3.2.3.2 *Reação de Hemaglutinação (HA)*

O teste de HA foi utilizado para a detecção direta do CPV nas suspensões fecais, de acordo com o descrito em Santos et al. (1997). As suspensões fecais foram diluídas em microplacas de 96 orifícios utilizando-se diluições dobradas em tampão BABS pH 9,0. Após as diluições, adicionou-se 50µL de suspensão de hemácias de suínos a 0,5% em tampão VAD (pH 6,4). As microplacas foram incubadas por 18h. a 4°C e o título da reação foi determinado como sendo o inverso da maior diluição da suspensão fecal capaz de causar a aglutinação total das hemácias. Amostras com títulos ≤16 foram consideradas negativas, enquanto amostras com títulos >16 foram submetidas ao teste de inibição da hemaglutinação (HI) para confirmação.

### 3.2.3.3 Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)

O teste de HI foi utilizado para confirmar as amostras positivas por HA. O soro imune de cobaio (*Cavia porcellus*) produzido anteriormente no laboratório de virologia conforme descrito em Santos et al., 1997, foi previamente inativado a 56°C por 30 minutos, tratado com suspensão de caolim a 25% em BABS e suspensão de hemácias a 50% em VAD (SANTOS et al., 1997). A seguir foram feitas diluições dobradas do soro de cobaio (25µL) em BABS (pH 9,0) na microplaca de 96 orifícios. Adicionou-se igual volume de suspensão fecal diluída para conter oito unidades hemaglutinantes (UHA) do vírus. Após incubação a 37°C por duas horas, adicionou-se em todos os orifícios da microplaca 50µL de suspensão de hemácias de suínos a 0,5%. As placas foram incubadas a 4°C por 18h. para posterior leitura, e cada microplaca continha controles de soro, vírus e hemácias de suínos.

### 3.2.4 REAÇÃO CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO DO GENOMA DE PARVOVÍRUS CANINO

#### 3.2.4.1 Extração do genoma

Após o preparo da suspensão fecal a 10%, procedeu-se a extração do genoma viral com isotiocianato de guanidina e sílica (BOOM et al., 1990) modificado (COSTA et al., 2005).

Resumidamente, em tubos tipo eppendorf® de 1,5mL, a 200µL da suspensão fecal a 10% foram adicionados 200µL de fenol/clorofórmio (Invitrogen®), seguido de homogeneização em vórtex. Após centrifugação por 2min., transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e em seguida foram adicionados 10µL de sílica (Sigma ®) e 1mL de tampão L2 pH 6,4. Os reagentes foram homogeneizados em vórtex e mantidos à temperatura ambiente por 30min. com agitação constante.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g/ 20seg. e os sobrenadantes decantados. As amostras foram sucessivamente lavadas em 500µL de etanol 70% (Merck®) (2x) e acetona P.A. (Merck®) (1x) mantidos a -20°C. Os tubos foram incubados a 56°C/ 15min. para a secagem completa dos sedimentos e, então,

adicionou-se a cada tubo 50 $\mu$ L de água milli-Q esterilizada. Após nova centrifugação a 14.000 x g/ 2min., os eluatos foram coletados em tubos plásticos tipo eppendorf® e estocados a -20°C para posterior uso na PCR.

Cada reação de extração de DNA foi realizada com um controle positivo (vacina Vanguard (CPV-2)<sup>2</sup> e vacina Duramune Max5 (CPV-2b)<sup>3</sup>) e um negativo (água milli-Q autoclavada).

#### 3.2.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Após extração do genoma a reação de PCR foi realizada em termociclador automático<sup>4</sup> utilizando os pares de iniciadores: VPF/VPR (amplifica tipo antigo e novos de CPV), P2 (específico para o tipo antigo CPV-2) e P2ab (específico para os tipos novos CPV-2a/2b/2c) (MOCHIZUKI et al., 1993; SENDA et al., 1995; PEREIRA et al., 2000). Inicialmente, 10 $\mu$ L do extrato foi incubado com 1 $\mu$ L de cada par de iniciador (20 picomol) a 94°C/ 2min., seguido de rápido resfriamento a 4°C/ 2min. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 $\mu$ L contendo 50mM KCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 $\mu$ M de cada dNTP (Invitrogen®) e 0,5U de Taq DNA Polimerase Platinum II (Invitrogen®). A PCR consistiu de 30 ciclos de incubação a 94°C/ 30seg., 55°C/ 2min. e 72°C/ 2min. e extensão final de 10min. a 72°C. Cada reação de PCR foi realizada com um controle positivo (vacina Vanguard<sup>2</sup> e vacina Duramune Max5<sup>3</sup>) e um negativo (água milli-Q autoclavada).

A cada produto da reação de PCR (*amplicon*) foi adicionado 1 $\mu$ L de corante azul de bromofenol e os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®) em tampão TBE 0,5% por 50min a 84 Volts. Utilizou-se como padrão de corrida o DNA Ladder de 100pb (Invitrogen®). O gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5 $\mu$ g/mL, os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador (UV)<sup>5</sup> e fotografados com câmera digital<sup>6</sup>.

---

<sup>2</sup> Pfizer®

<sup>3</sup> FortDodge®

<sup>4</sup> Perkin Elmer®

<sup>5</sup> Labnet® / <sup>6</sup> Sony Cyber-Shot DSC-W90 8.1mp®

### 3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

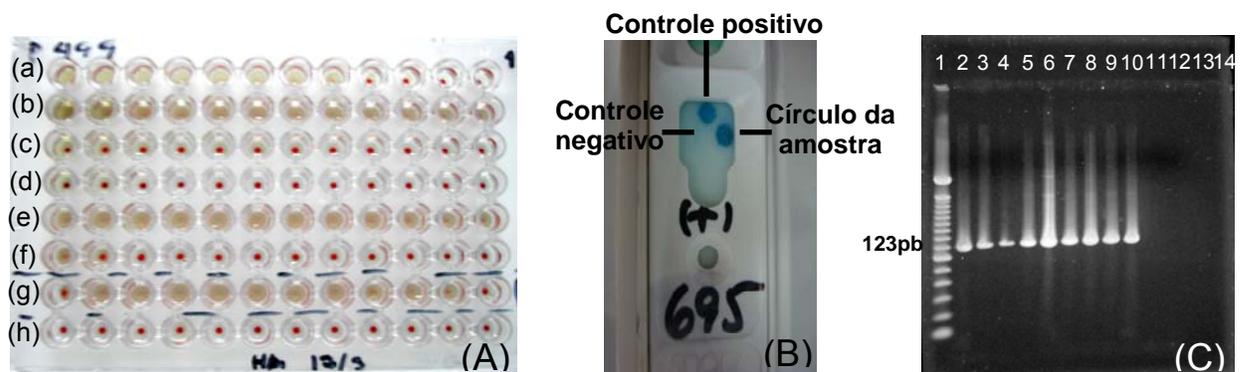
A comparação de sensibilidade e especificidade dos testes de HA/HI e EIE com a de PCR foi realizada através do *screening test* e a significância estatística do quanto eles não são equivalentes foi dada pelo teste de McNemar (programa Bioestat 5.0), e um valor-p inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado significativo.

A comparação das duas populações de cães (Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e Município de Duque de Caxias) em relação a sexo, faixa etária, raça, vacinação e sinais clínicos, foi realizada utilizando o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher quando necessário através da *StatCalc* do programa Epi info 3.5.1, e um valor-p inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado significativo. A significância da diferença entre as proporções (faixa etária, sinais clínicos e vacinação) na infecção pelo CPV foi analisada utilizando o teste  $\chi^2$  e *Odds Ratio* (OR).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Comparação dos métodos rápidos para diagnóstico laboratorial da parvovirose canina

De um total de 108 amostras coletadas no período do estudo, 57 foram testadas por HA/HI, EIE<sup>7</sup> e PCR (Figura 7).



**Figura 7.** Resultado dos métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico laboratorial da parvovirose canina. (A) Reação de hemaglutinação: fileiras a, b, e, g: amostras positivas; c, d, f: amostras negativas; h: controle de hemácias; (B) Ensaio Imunoenzimático: amostra positiva; (C) Reação em cadeia pela polimerase com par de iniciador P2ab: fileiras 1: marcador de PM 123pb; 2-9: amostras positivas; 11-13; amostras negativas; 10 e 14: controles positivo e negativo.

<sup>7</sup> SNAP Parvo Antigen Test - Idexx Laboratories®

Entre as 57 amostras testadas pelos três métodos, 43 apresentaram resultados concordantes para os três testes (13 positivas e 30 negativas), e outras 14 amostras apresentaram resultados discordantes entre os testes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultado dos três testes laboratoriais utilizados para a detecção de CPV em 57 amostras fecais de cães com diarreia.

<b>Nº. de amostras</b>	<b>HA/HI</b>	<b>EIE</b>	<b>PCR</b>
Positivas	17	19	25
Negativas	40	38	32

O teste de EIE foi capaz de detectar o antígeno viral em 19/57 (33,3%) amostras analisadas. Através do HA, 17/57 amostras (29,8%) com títulos  $\geq 32$  foram confirmadas como positivas pelo HI e então consideradas positivas. Por PCR, 25/57 amostras foram positivas (43,8%). Entre as amostras positivas por PCR, 10 foram negativas por HA e seis foram negativas por EIE.

A concordância entre os métodos de EIE e PCR foi de 89,4% ( $p=0,013$ ), e de HA e PCR foi de 78,9% ( $p=0,038$ ). Apenas duas amostras foram consideradas negativas pela PCR e positivas por HA/HI (Figura 8).

		PCR					PCR		
		(+)	(-)	Total			(+)	(-)	Total
HA/HI	(+)	15	2	17	EIE	(+)	19	0	19
	(-)	10	30	40		(-)	6	32	38
Total		25	32	57	Total		25	32	57

Concordância = 78,9% (45/57)	Concordância = 89,4% (51/57)
Sensibilidade = 60,0% (15/25)	Sensibilidade = 76,0% (19/25)
Especificidade = 93,7% (30/32)	Especificidade = 100,0% (32/32)
Valor-p = 0,0386	Valor-p = 0,0313

**Figura 8.** Comparação dos resultados da PCR com HA/HI (a) e EIE (b). Os números indicam amostras positivas (+) e negativas (-) para CPV. A concordância, especificidade, sensibilidade e valor-p do HA/HI e EIE comparados ao PCR foram calculados e estão indicados.

As 40 amostras negativas no HA apresentaram título  $\leq 16$ , sendo que seis foram positivas no EIE e 10 por PCR. Das quatro amostras com títulos hemaglutinantes variando de 32 a 64, uma foi positiva no EIE e três por PCR. Outras 13 amostras com título  $> 64$ , 12 foram positivas por EIE e PCR (Tabela 2).

**Tabela 2.** Comparação entre o título de HA das 57 amostras fecais e os resultados dos testes de EIE e PCR.

Nº amostras	Título HA	HA (+)	EIE (+)	PCR (+)
20	<2	0	3	5
7	2	0	1	2
5	4	0	1	2
5	8	0	1	1
3	16	0	0	0
2	32	2	1	1
2	64	2	0	2
13	>64	13	12	12

#### 4.2 Ocorrência e fatores relacionados à infecção pelo CPV em filhotes de cães com gastroenterite, em duas populações caninas de áreas geograficamente distintas (Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e Município de Duque de Caxias)

Para a realização deste estudo, 90 amostras foram coletadas, sendo 50 amostras na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e 40 amostras coletadas no Município de Duque de Caxias no período de maio de 2007 a maio de 2009. Todas as amostras foram testadas por HA/HI e PCR e foram consideradas positivas nesta análise as amostras nas quais foi detectado o genoma viral pela técnica de PCR.

De acordo com os dados das fichas dos animais, 84% (42/50) das amostras do Rio de Janeiro e 75% (30/40) de Duque de Caxias foram coletadas de animais das seguintes raças: Poodle (12), Pastor Alemão (8), Pit Bull (8), Rottweiler (8), Labrador Retriever (7), Shih-Tzu (6), Yorkshire Terrier (5), Cocker Spaniel Inglês (5), Teckel pêlo curto (2), Pastor branco suíço (2), Lhasa Apso (1), Bulldog Francês (1), Chow-chow (1), Dálmata (1), Maltês (1), Golden Retriever (1), Shar-pei (1), Schnauzer Miniatura (1) e West Highland White Terrier (1). Oito animais do Rio de Janeiro e 10 de Duque de Caxias eram cães sem raça definida (SRD).

A distribuição do número de amostras testadas na Zona Sul do Rio de Janeiro e no Município de Duque de Caxias de acordo com o sexo, faixa etária e histórico de vacinação está demonstrada na tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição das amostras testadas em relação ao sexo, faixa etária e histórico de vacinação dos cães na Zona Sul do Rio de Janeiro e no Município de Duque de Caxias.

	Rio de Janeiro		Duque de Caxias		p <sup>a</sup>
	testados/total	(%)	testados/total	(%)	
<b>Sexo</b>					
Macho	31/50	(62)	21/40	(52)	0,488
Fêmea	19/50	(38)	19/40	(48)	
<b>Faixa etária (meses)</b>					
< 2	2/50	(4)	3/40	(7)	0,721
2 - 4	39/50	(78)	29/40	(73)	
> 4	9/50	(18)	8/40	(20)	
<b>Vacinação</b>					
Sim	37/50	(74)	16/40	(40)	0,0009
Não	11/50	(22)	24/40	(60)	
Sem dados	2/50	(4)	0/0	(0)	

Valor de  $p < 0,05$  é significativo.

Ao comparar a amostragem das duas populações, não se observou diferença significativa em relação ao sexo, raça e faixa etária dos animais. Entretanto, em relação à vacinação dos animais, foi observada diferença significativa entre as populações ( $p=0,0009$ ) (Tabela 3).

Um total de 38 das 90 amostras analisadas neste estudo foi considerado positivo para CPV (42%), sendo 32% (16/50) coletadas na Zona Sul do Rio de Janeiro e 55% (22/40) das amostras de Duque de Caxias. A proporção de casos positivos em Duque de Caxias apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à Zona Sul do Rio de Janeiro ( $p=0,04$ ).

A maioria dos cães estudados nos dois Municípios (68/90) apresentou faixa etária entre dois a quatro meses, e 75% (12/16) destes no Rio de Janeiro e 81% (18/22) em Duque de Caxias tiveram as amostras fecais positivas para CPV.

Dentre as 16 amostras consideradas positivas na Zona Sul do Rio de Janeiro, três foram de cães não vacinados e 13 que receberam uma, duas ou três doses de vacina contra CPV. Das 22 amostras positivas coletadas em Duque de Caxias, 10 foram de cães não vacinados e 12 que receberam uma, duas ou três doses de vacina (Tabela 4).

Das 25 amostras positivas obtidas de filhotes vacinados nas duas populações, a infecção pelo vírus selvagem foi confirmada em 24 amostras. Destes 24 filhotes, 21 haviam recebido uma ou duas doses de vacina e três filhotes, três doses de vacina (Tabela 4). Para três filhotes que receberam três doses de vacina, apenas um apresentava idade superior a quatro meses e era um cão da raça Rottweiler.

**Tabela 4.** Distribuição do número de amostras positivas e testadas para CPV de acordo com o número de doses de vacinas recebidas nos Municípios do Rio de Janeiro e Duque de Caxias.

Nº de doses de vacina	Rio de Janeiro	Duque de Caxias
	Positivas/ testadas	Positivas/ testadas
1	9/29	6/8
2	3/6	4/5
3	1/2	2/3
Total	13/37	12/16

A fim de confirmar a infecção pelo vírus selvagem nestes animais vacinados, analisou-se a constituição da vacina (CPV-2 ou CPV-2b), intervalo entre a vacinação e coleta de amostra (maior ou menor que 15 dias) e o resultado da PCR (amplificação com iniciadores VPF/VPR, P2 e P2ab). Para 15 animais que receberam a vacina constituída de tipo antigo, a detecção do vírus selvagem pode ser confirmada pela amplificação com o par de iniciador específico para os tipos novos do vírus (P2ab). Para cinco animais (um que recebeu vacina contendo CPV-2b e outros quatro sem dados completos) a infecção pelo vírus selvagem foi confirmada por sequenciamento.

Para outros dois animais vacinados com o tipo 2b, considerou-se a infecção pelo vírus selvagem já que o intervalo entre a vacinação e coleta das amostras foi maior que 20 dias.

Somente para um animal que recebera duas doses de vacina, cujos dados sobre a vacina não estavam disponíveis, não se pode confirmar a detecção do vírus selvagem (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise das amostras positivas para CPV obtidas de cães vacinados.

Nº de dias entre a vacinação e coleta de amostras	Nº de amostras	Tipo de CPV na vacina	PCR	Vírus na amostra
0 - 3	0	-	-	
3 - 9	2	CPV2	P2ab (+)	selvagem
10 - 15	3	CPV2	P2ab (+)	selvagem
16-30	4	CPV2	P2ab (+)	selvagem
	2	CPV2b	P2ab (+)	selvagem
	2	ND	P2ab (+) <sup>a</sup>	selvagem
>31	3	CPV2	P2ab (+)	selvagem
	1	CPV2b	P2ab (+) <sup>a</sup>	selvagem
ND	4	CPV2	P2ab (+)	selvagem
	1	CPV2b	P2ab (+) <sup>a</sup>	selvagem
	2	ND	P2ab (+) <sup>a</sup>	selvagem
	1	ND	VPF (+)	inconclusivo

ND = dado não disponível.

<sup>a</sup> Amostra confirmada como selvagem por sequenciamento.

Em relação aos sinais clínicos apresentados observou-se que todos os 16 animais infectados por CPV no RJ e 21/22 animais de Duque de Caxias apresentavam vômito. Entre os 38 animais CPV positivos, 75% (12/16) do Rio de Janeiro e 68%

(15/22) de Duque de Caxias apresentavam vômito associado a diarreia hemorrágica (Tabela 6). Portanto, os sinais de vômito e diarreia hemorrágica mostraram-se associados à infecção por CPV ( $p=0,04$ ), independentemente da região estudada.

**Tabela 6.** Distribuição das amostras positivas e testadas de acordo com os sinais clínicos apresentados pelos cães na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e no Município de Duque de Caxias.

Sinais clínicos	Rio de Janeiro	Duque de Caxias
	positivas/ testadas	positivas/ testadas
V, DH	12/25	15/27
V, D	4/12	6/11
DH	0/2	1/1
D	0/11	0/1
<b>Total</b>	<b>16/50</b>	<b>22/40</b>

V = Vômito; DH = Diarreia Hemorrágica; D = Diarreia não Hemorrágica

## 5 DISCUSSÃO

A gastroenterite viral é uma condição infecto-contagiosa sujeita a determinados fatores de risco de transmissão e a manutenção do agente na população animal e no ambiente (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990). Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro por um período de nove anos (1995-2004) a infecção pelo CPV foi confirmada em 46% dos cães até seis meses de idade com gastroenterite e os sinais clínicos clássicos da parvovirose canina (vômito, anorexia, apatia e diarreia hemorrágica líquida) foram observados em 70% dos animais com CPV e em 60% dos animais negativos para CPV (CASTRO et al., 2007a).

Portanto, a existência de métodos rápidos de diagnóstico para a detecção do vírus é fundamental para esclarecer a etiologia da gastroenterite (CASTRO et al., 2007a) e os métodos de diagnóstico rápido baseiam-se principalmente na detecção do vírus ou genoma viral nas amostras fecais colhidas dos casos agudos da infecção (POLLOCK; COYNE, 1990).

Ao solicitar um teste diagnóstico para confirmação de uma infecção o médico veterinário se vê diante de quatro possibilidades: o exame resultar positivo na presença de infecção (verdadeiro positivo), positivo na sua ausência de infecção (falso positivo), negativo na ausência de infecção (verdadeiro negativo) e negativo na presença de infecção (falso negativo). Portanto, os testes devem ser avaliados quanto a sua sensibilidade (proporção de resultados positivos entre todos os infectados) e especificidade (proporção de resultados negativos entre todos os não infectados) (MEDRONHO et al., 2002).

Além de simples, espera-se que estes métodos rápidos se aproximem do ideal, ou seja, aquele teste no qual sensibilidade e especificidade fossem de 100%. Entretanto, na prática isso não é possível, e existe um contrabalanço nestas duas propriedades, ou seja, quando um teste ganha em sensibilidade, perde em especificidade e vice-versa (MEDRONHO et al., 2002).

Devido à propriedade hemaglutinante dos parvovírus, e a grande quantidade de vírus eliminada nas fezes pelo animal doente durante o estágio agudo da infecção, o HA é um dos testes utilizados para o diagnóstico de rotina, desde que o resultado positivo seja confirmado pelo HI utilizando um soro imune específico anti-CPV (CARMICHAEL; SCHLAFER; HASHIMOTO, 1980; SENDA et al., 1986).

A gastroenterite por CPV é uma infecção de caráter agudo, e a grande maioria das amostras analisadas neste trabalho (84/90) foram coletadas no período de máxima eliminação do vírus nas fezes dos animais infectados (três a cinco dias PI que correspondem a um a três dias de doença), quando é possível se detectar o vírus por HA/HI (CARMICHAEL; SCHLAFER; HASHIMOTO, 1980). O teste de HA/HI foi utilizado para triagem das amostras fecais neste estudo devido à facilidade de execução, baixo custo e por ser empregado rotineiramente no laboratório. Entretanto, conforme observado nos nossos resultados e descrito anteriormente por Desario et al. (2005) esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade.

Os resultados falso negativos no HA/HI também podem ser explicados devido à presença de amostras não aglutinantes de CPV (PARRISH et al., 1988), ou pela presença de anticorpos no lúmen intestinal de cães infectados que podem se ligar aos vírions e impedir a hemaglutinação (DECARO et al., 2005 ; DESARIO et al., 2005; BATTILANI et al., 2007).

Enquanto o HA é um método mais utilizado em laboratórios especializados, o EIE é considerado uma técnica de diagnóstico mais simples e rápida, disponível na forma de teste rápido *in-house* (SNAP) e que pode ser utilizada pelos clínicos durante o atendimento em hospitais e clínicas. Apesar disso, uma vez que a análise do resultado é visual, a interpretação do teste pode ser afetada pela subjetividade do operador. Altos

níveis de anticorpos contra o patógeno no lúmen intestinal também podem mascarar o resultado (KENNEDY, 2005).

Neste estudo o EIE apresentou uma sensibilidade maior que o HA, sendo que seis amostras positivas no EIE e nenhuma negativa. A especificidade do EIE (100%) foi também superior ao HA/HI quando comparada ao PCR, demonstrando que quando o resultado é negativo a segurança do paciente não estar infectado é grande.

A PCR foi escolhida como Padrão Ouro para avaliação dos testes rápidos neste estudo uma vez que trabalhos anteriores já demonstravam sua maior especificidade e sensibilidade na detecção de CPV em fezes de cães quando comparada com HA, EIE e isolamento viral (MOCHIZUKI et al., 1993, SENDA et al., 1995; PEREIRA et al., 2000).

Entretanto, mesmo a PCR pode apresentar resultados falso-negativos pela presença de substâncias inibitórias da Taq polimerase nas fezes dos animais, problemas no processo de extração do DNA viral (SCHUNCK; KRAFT; TRUYEN, 1995) ou ainda por variações nas sequências de nucleotídeos das regiões de anelamento dos iniciadores no genoma viral não permitindo o reconhecimento destas (MIRANDA et al., 2006). Isso poderia explicar os resultados negativos para PCR e positivos por HA, detectados em duas amostras neste estudo.

Os resultados demonstraram que mesmo quando o HA e/ou EIE são utilizados no diagnóstico dos casos suspeitos para CPV, as amostras negativas por estes métodos devem ser testadas por outros mais sensíveis e específicos como a PCR. Da mesma forma, Durigon et al. (1987), já discutiram a importância de se realizar duas técnicas diferentes para se evitar resultados inespecíficos no diagnóstico laboratorial do parvovírus canino.

Conforme demonstrado em um trabalho anterior, o parvovírus canino vem apresentando ampla circulação no estado do Rio de Janeiro (CASTRO et al., 2007a). No decorrer deste estudo o laboratório recebeu amostras de um Hospital localizado na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e de clínicas do Município de Duque de Caxias, o que nos levou a investigar a ocorrência da infecção por este vírus nestas populações.

Neste trabalho não foi observada uma pré-disposição sexual para parvovirose. Estes dados estão em concordância com o estudo de Houston et al. (1996), onde se

observou que cães machos e fêmeas com até seis meses de idade apresentam o mesmo risco de se infectar por CPV.

Glickman et al. (1985) e Houston et al. (1996) relataram que cães das raças Dobermann, Pinscher, Rottweiler e Pastor Alemão, quando infectados por CPV, apresentavam uma maior propensão ao desenvolvimento da forma mais grave da doença se comparados com outras raças. Apesar de 31% das amostras coletadas na Zona Sul do Rio de Janeiro e 58% das amostras coletadas no Município de Duque de Caxias serem provenientes de animais de raça, tal fato não pode ser confirmado neste estudo devido ao pequeno número de amostras obtidas de cada raça.

Diversos autores descreveram uma maior ocorrência da infecção pelo CPV em filhotes com dois a quatro meses de idade (HOUSTON et al., 1996; HOMEM; MENDES; LINHARES, 1999; CUBEL GARCIA et al., 2002). Apesar disto, os nossos resultados demonstraram que a chance de um animal na faixa etária de dois a quatro meses adquirir a infecção pelo CPV não é estatisticamente diferente das outras faixas etárias estudadas até um ano de idade (OR=1,38 (0,46 <OR< 4,19).

A proporção de cães vacinados na Zona Sul do Rio de Janeiro foi significativamente maior que em Duque de Caxias. Uma vez que a enterite por CPV pode ser controlada através da vacinação, tal fato provavelmente contribuiu para uma menor ocorrência da doença neste local (32%), quando comparada com a população de cães em Duque de Caxias (55%).

Sabe-se que animais imunizados com vacinas de vírus atenuado podem eliminar o vírus vacinal nas fezes e o teste de HA é capaz de detectar este vírus até nove dias pós-vacinação (CARMICHAEL et al., 1981). Tal fato pode complicar o diagnóstico laboratorial pela ocorrência de resultados falso-positivos (DECARO et al., 2007). Portanto, a gastroenterite por CPV nos cães que receberam pelo menos uma dose de vacina deve ser investigada uma vez que os testes utilizados no diagnóstico de rotina (HA/HI e EIE) não são capazes de diferenciar o vírus selvagem do vacinal e esta confirmação só pode ser realizada através dos métodos moleculares.

Entretanto, a interpretação do resultado da PCR também depende do conhecimento do protocolo de vacinação do animal. Atualmente, uma vacina

constituída do tipo novo de CPV (CPV-2b) está disponível no Brasil, o que requer mais atenção na análise dos resultados laboratoriais.

A maioria dos animais vacinados nos quais a infecção pelo vírus selvagem foi confirmada (21/24) não havia completado o protocolo de vacinação sugerido de três doses (DAVIS-WURZLER, 2006; MOORE, 1983), o que explica a ocorrência da infecção pelo CPV apesar da vacinação.

Para outros três cães que completaram o protocolo de vacinação, somente um tinha idade superior a quatro meses no momento da terceira dose. Os anticorpos maternos adquiridos via colostro nos primeiros dias de vida do filhote são capazes de bloquear o vírus vacinal, mas não são capazes de proteger o cão da infecção pelo vírus selvagem. Estes anticorpos podem permanecer em circulação no cão até os quatro meses de vida, quando decrescem a níveis indetectáveis. Portanto nesta idade os casos de “falha vacinal” podem ocorrer a despeito do protocolo de vacinação adotado pelo clínico (CHAPPUIS, 1998).

O único filhote que recebeu a terceira dose de vacina após o 4º mês de vida era um filhote da raça Rottweiler. Esta aparente falha vacinal, portanto pode estar relacionada a uma maior suscetibilidade em cães desta raça, que parecem ser refratários à imunização, a despeito do protocolo vacinal recomendado (DAVIS-WURZLER, 2006; MOORE, 1983).

Portanto, a fim de assegurar uma proteção adequada, é necessário completar o protocolo de vacinação recomendado pelos veterinários com a última dose após o 4º mês de vida, tendo em vista que anticorpos maternos podem interferir na resposta imune dos filhotes (POLLOCK; COYNE, 1993).

A associação da infecção pelo CPV com o quadro clínico clássico (vômito, anorexia, apatia e diarréia líquida hemorrágica) em filhotes é uma idéia difundida entre os clínicos veterinários de pequenos animais. E os resultados do presente estudo apontam que a ocorrência de vômito em associação com diarréia hemorrágica são os principais indicativos da enterite por CPV em filhotes até quatro meses de idade.

Além disso, observou-se que os sinais clínicos de vômito e diarréia hemorrágica estiveram presentes em quase todos os animais infectados por CPV, e, portanto a

chance de um animal apresentando vômito com diarreia hemorrágica ter CPV mostrou diferença significativa em relação aos que não apresentavam vômito e diarreia hemorrágica ( $p=0,004$ , O.R= 2,65 (1,00 <OR< 7,12)).

A infecção por CPV continua sendo uma importante causa de enterite hemorrágica em filhotes de cães até quatro meses de idade e mesmo que alguns sinais clínicos sejam indicativos da infecção, somente o diagnóstico laboratorial é capaz de confirmar os casos suspeitos.

## 6 CONCLUSÕES

- A infecção pelo CPV foi confirmada em 42% (38/90) das amostras fecais diarreicas analisadas neste estudo CPV, sendo 32% (16/50) provenientes da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro e 55% (22/40) do Município de Duque de Caxias;
- O teste de EIE apresentou melhor correlação que o teste de HA, quando comparado com a PCR.
- As amostras negativas pelos métodos de HA e/ou EIE devem ser testadas por métodos mais sensíveis e específicos como o PCR;
- A proporção de CPV na população do Município de Duque de Caxias foi significativamente maior que na população da Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro. Ao comparar a amostragem das duas populações, não se observou diferença significativa em relação ao sexo, raça e faixa etária dos animais. Entretanto, a proporção de animais vacinados na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro foi significativamente maior que no Município de Duque de Caxias;
- A ocorrência de vômito em associação com diarreia hemorrágica na população deste estudo foi indicativa de enterite por CPV.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELO, M.J.O.; HAGIWARA, M.K.; JULY, J.R. et al. Isolamento de parvovirus canino no Brasil. *Rev. Fac. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, v.25, p.123-134, 1980.
- APPEL, M.; SCOTT, F.; CARMICHAEL, L.E. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* v.105 p.156-9, 1979.
- APPEL, M.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus type 2. In: Appel MS. *Virus infections of carnivores*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.69-92, 1987.
- BASS, E.P.; GILL, M.A.; BECKENHAUER, W.H. Development of a modified live canine origin parvovirus vaccine. *J.Am. Vet. Med. Assoc.*, v.181, n°9, p.909-913, 1982.
- BATTILANI, M.; CIULLI, S.; TISATO, E.; PROSPERI, S. Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. *Virus Res.* v.83 p.149-57, 2002.
- BATTILANI, M.; GALLINA, L.; VACCARI, F.; MORGANTI, L. Co-Infection with Multiple Variants of Canine Parvovirus Type 2 (CPV-2). *Veterinary Research Communications*, v.31 (1), p.209–212, 2007.
- BINN, L.N.; LAZAR, E.; EDDY, G. A. et al. Recovery and characterization of a minute virus of canides. *Infect. Immunol.*, v.1, p.503-508, 1970.
- BOOM, R.; SOL, C.; SALIMANS, M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* v.28 p.495-503, 1990.
- BUONAVOGLIA, C.; TOLLIS, M.; BUONAVOGLIA, D.; PUCCINI, A. Response of pups with maternal derived antibodies to midified-live canine parvovirus vaccine. *Comp. Immun. Microbio. Infect. Dis.*, v.15 (4), p.281-283, 1992.
- BUONAVOGIA, D.; CAVALLI, A.; PRATELLI, A. Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New. Microbiol.*, v.23, n°1, p.93-96, 2000.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; GRECO, G.; BUONAVOGLIA, D. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* v.82 p.3021-5, 2001.

BURTONBOY, S.; CHARLIER, P.; HERTOOGHS, J.; LOBMANN, M.; WISEMAN, A.; WOODS, S. Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Vet. Rec.*, v.128, p.377-381, 1991.

CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C.; POLLOCK, R.V.H. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, p.784-791, 1980.

CARMICHAEL, L. E.; BINN, L. N. New enteric viruses in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* v.25, p.1-37, 1981.

CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C.; POLLOCK, R.V.H. A modified-live canine parvovirus vaccine II: immune response. *Cornell Vet.*, v.73, p.13-29, 1983.

CARMICHAEL, L. E.; SCHLAFER, D. H.; HASHIMOTO, A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and Seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.6, p.165-174, 1994.

CARMICHAEL, L. E. An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus. *J. Vet. Med. B.*, v.52, p.303-311, 2005.

CASTRO, T.X. *Parvovírus canino (CPV-2) no Estado do Rio de Janeiro: Diagnóstico e fatores relacionados à infecção no período de 1995-2004*. Niterói, 2005. p. 59. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2005.

CASTRO, T.X.; MIRANDA, S.C.; LABARTHE, N.V.; SILVA, L.E.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995-2004. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n°2, p. 333-339, 2007(a).

CASTRO, T.X.; UCHOA, C.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C; LABARTHE, N.V; CUBEL GARCIA, R.C.N. Canine Parvovirus (CPV) and Intestinal Parasites: Laboratorial Diagnosis and Clinical Signs From Puppies With Gastroenteritis. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, v.5, n°2, 2007b.

CASTRO, T.X.; COSTA, E.M. ; LEITE, J.P. ; LABARTHE, N. ; CUBEL GARCIA, R. C N. Partial VP2 sequencing circulating in the state of Rio de Janeiro: Detection of the new variant CPV-2c. In: XX Encontro Nacional de Virologia, Brasília, 2009, Anais. Brasília: Sociedade Brasileira de Virologia, p. 118, 2009.

CHAPPUIS, G. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine*, v.16 n.13 p. 1468-1472, 1998.

COSTA, A.P.; LEITE, J. P.; LABARTHE, N. V.; CUBEL GARCIA, R. C. N. Genomic typing of canine parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay. *Vet. Res. Commun.*, v.29, nº 8, p.735-43, 2005.

COYNE, M. In: Boletim Pfizer. Vacinologia: cães e gatos. 12, 1996.

CUBEL GARCIA, R.C.N.; PINTO, A.; COSTA, A.; MACIEL, B.M.; OLIVEIRA, L.H.S.; NASCIMENTO, J.P; SANTOS, A.O.; CASTRO, M.C.N.; WILLI, L.M.V.; LABARTHE, N.V. Canine parvovirus infection in puppies with gastroenteritis in Niterói, Rio de Janeiro, from 1995 to 1997. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* v.37 n.2 p.132-135, 2000.

CUBEL GARCIA R.C.N.; LEITE J.P.; XAVIER M.P.T. et al. Infecção pelo parvovírus canino no Rio de Janeiro: Um Estudo de 5 anos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.9 (1), p.42-46, 2002.

DAVIS-WURZLER, G, M. Current vaccination strategies in puppies and kittens. *Vet. Clin. Smal.* v.36 p.607-640, 2006.

DECARO, N.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; RICCI, D.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.17, p.133–138, 2005.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; BELLACICCO, A. L.; CAMERO, M.; MANNA, L.; D'ALOJA, D.; BUONAVOGLIA, C. First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in Pups With Haemorrhagic Enteritis In Spain. *J. Vet. Med. B.* v.53, p.468–472, 2006a.

DECARO N.; MARTELLA V.; ELIA G.; DESARIO C.; CAMPOLO M., BUONAVOGLIA D.; BELLACICO A.; TEMPESTA M.; BUONAVOGLIA C. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J. Virol. Methods*, v.138, p.10 – 16, 2006b.

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

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

DECARO, N; DESARIO, C; BEALL, M. J.; CAVALLI, A; DIMARCO, M. C A. A.; AMORISCO, F; COLAIANNI, M. L., BUONAVOGLIA, C. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *The Veterinary Journal*, April, 2009.

DESARIO, C; DECARO, N; CAMPOLO, M; CAVALLI, A; CIRONE, F; ELIA, G; MARTELLA, V; LORUSSO, E; CAMERO, M; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods.*, v.126, nº1 e 2, p.179-85, 2005.

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

GLICKMAN, L. T.; DOMANSKI, M. H. S.; PATRONEK, G. J.; VISINTAINER, F. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.187 (6), p.589-594, 1985.

GORDON, J.C.; ANGRICK, E. J. Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. *Am. J. Vet. Res.*, v.47 (7), p.1464-1467, 1986.

GUILFORD, W. G.; STROMBECK, D. R. Gastrointestinal tract infections, parasites, and toxicoses. In: GUILFORD, W.G.; CENTER, S.A.; STROMBECK, D.R.; WILLIAMS, D.A.; MEYER, D.J. Strombeck's Small Animal Gastroenterology. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: *W.B.Saunders Company*, 1996. Cap.21, p.411-432.

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

HASS, R.; JOHANN, J. M.; CAETANO C. F; FISCHER, G.; VARGAS; G. D.; VIDOR, T.; HÜBNER, S.O. Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, nº1, p.270-274, 2008.

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

HOSKINS, J.D. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. E. 2<sup>a</sup> ed. *Infectious Diseases Of The Dog And Cat*. WB Saunders Company, 1998, Athens, Georgia (USA), p.40-49, 1998.

HOUSTON, D.M.; RIBBLE, C.S.; HEAD, L.L. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.208 (4), p.542-546, 1996.

HUEFFER, K.; PARRISH, C. K. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* v.6 (4), p.392-8, 2003.

KAPIL, S.; COOPER, E.; LAMM, C.; MURRAY, B.; REZABEK, G.; JOHNSTON III, L.; CAMPBELL, G.; JOHNSON, B. Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, p.4044–4047, Dec., 2007.

KENNEDY, M. Methodology in diagnostic virology. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.8, p.7–26, 2005.

LARSON, L. J.; SCHULTZ, R. D. Comparasion of selected canine vaccines for their ability to induce protective immunity against canine parvovirus infection. *Am. J. Vet. Res.*, v.58 (4), p.360-363, 1997.

LARSON, L. J. Do Two Current Canine Parvovirus Type 2 and 2b Vaccines Provide Protection Against the New Type 2c Variant? *Veterinary Therapeutics*, v.9, n°2, summer, 2008.

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

MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I.; THOMPSON, H. et al. Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. *Vet. Rec.*, v.115, p.453-460, 1984.

MACINTIRE, D.K.; SMITH-CARR, S. Canine Parvovirus. Part II Clinical signs, diagnosis and treatment. *Comp. Cont. Educ. Small Animal*, v.19, n°3, p.291-302, 1997.

MARTELLA, V; DECARO, N; ELIA, G; BUONAVOGLIA, C. Surveillance Activity for Canine Parvovirus in Italy. *J. Vet. Med. B.*, v.52, p.312–315, 2005.

MARTIN, V.; NAJBAR, W., GUEGUEN, S. et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo controlled trial. *Vet. Microbiol.*, v.89, p.115-127, 2002.

MASON, M. J; GILLET, N. A; MUGGENBURG, B. A. Clinical, pathological and epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis in a unvaccinated closed beagle colony: 1978-1985. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.23, p.183-192, 1987.

McCANDLISH, A.P., THOMPSON, H., FISHER, et al. Canine parvovirus infection. In *pract*: p.5-14, 1981.

McCAW, D.L.; HOSKINS, J.D. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. E. 2<sup>a</sup> ed. *Infectious Diseases Of The Dog And Cat*. WB Saunders Company, 1998, Athens, Georgia (USA), cap.8, p.63-70, 1998.

MEDRONHO, R. A.; CARVALHO, D. M.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G, L. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu, 2002. 493 p.

MEERS, J.; KYAW-TANNER, M.; BENSINK, Z.; ZWIJNENBERG, R. Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v.85, nº 10, Oct., 2007.

MEHNERT, D.U.; MONEZI, T.A.; PRADO, M.A.; HÁRSI, C.M.; CAVALIERO, M.J.; QUEIROZ, A.P.S.; MÜLLER, N.G.; ANGELO, M.J.O. Canine gastroenteritis in Brazil: Preliminary results of a viral etiological study. *In: VIII Encontro Nacional de Virologia*, São Lourenço, 1996. Anais. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, p.43, 1996.

MIRANDA, S.C. *Caracterização de amostras de parvovírus detectadas em gatos e cães nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro em 2004-2005*. Niterói, 2006. p.83. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

MOCHIZUKI, M.; SAN GABRIEL, M.; NAKATANI, H. et al. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res. Vet. Sci.*, v.55, p.60-63, 1993.

MOON, H. S.; LEE, S. A.; LEE, S. G.; CHOI, R.; JEOUNG, S. Y.; KIM, D.; HYUN, C. Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates. *Veterinary Microbiology*, v.131, p.47-56, 2007.

MOORE, D. J. Canine parvovirus immunoprophylaxis: a review. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.83, nº4, p.258-264, 1983.

MORAES, M. P.; COSTA, P.R.S. Parvoviridae. *In: Flores, E. F. 1ªed. Virologia veterinária*. Ed. da UFSM, 2007, Santa Maria, RS, cap. 14, p. 382, 2007.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P.; HORZINEK, M. C. et al. USA, *Veterinary Virology*. Academic Press, 1999.

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

NELSON, D. T.; EUSTIS, S. L.; MCADARAGH, J. P. et al. Lesions of spontaneous canine viral enteritis. *Vet. Pathol.*, v.16, p.680-686, 1979.

OTTO, C. M.; RIESER, T. M.; BROOKS, M. B.; RUSSELL, M. W. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.217, nº10, November 15, p.1500-1504, 2000.

PARADISE, P.; RHODE, S.; SINGER, I. Canine Parvovirus: a Biochemical and ultrastructural characterization. *J. Gen. Virol.* v.62, p.113-125, 1982.

- PARRISH, C.R.; EVERMANN, J.F.; CARMICHAEL, L.E. Nature variation of canine parvovirus. *Science*, v.230, p.1046-1048, 1985.
- PARRISH, C. R; HAVE, P.; FOREYT, W. J, et al. The global spread and replacement of canine parvovirus strain. *J. Gen. Virol*, v.69, p.111-116, 1988.
- PARRISH, C.R. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Adv. Virus Res.* v.38, p. 403-449, 1990.
- PARRISH, C.R.; AQUADRO, C.F.; STRASSHEIM, M.L. et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.*, v.65, n°12, p.6544-6552, 1991.
- PARRISH, C. R. The emergence and evolution of canine parvovirus - an example of recent host range mutation. *Seminars in Virology*, v.5, p.121-132, 1994.
- PARRISH, C. R. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillière's Clinical Haematology*, v.8 (1), March, 1995.
- PARRISH, C.R. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.*, v.69, p.29-40, 1999.
- PARRISH, C.R.; KAWAOKA, Y. The origins of new pandemic viruses: The Acquisition of New Host Ranges by canine Parvovirus and Influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* v.59, p.553-86, 2005.
- 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. Microbiol.*, v.75, p.127-33, 2000.
- PÈREZ, R.; FRANCIÀ, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LOPEZ, I.; HERNANDEZ, M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology*, v.124, p.147-152, 2007.
- POLLOCK, R.V; CARMICHAEL, L.E. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. Infections diseases of the dog and cat. WB Saunders Company. 268-287, 1990.
- POLLOCK, R.V.; COYNE, M.J. Gastroenterology: Canine Parvovirus. In: *Veterinary Clinics of North America: Small animal practice*. Pennsylvania, v.23: p.555-569, 1990.
- POLLOCK, R.V.H.; COYNE, M.J. Canine Parvovirus. *Vet. Clin. North. Am.: Small Anim. Pract.*, v.23 (3), p.555-569, 1993.
- PRATELLI A, BUONAVOGLIA D, MARTELLA V, TEMPESTA M, LAVAZZA A, BOUNAVOGLIA C. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. *J. Virol. Methods*, v.84, p.91-94. 2000.

- PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.14 (3), p.167-176, 2004.
- REED, A.; JONES, E.; MILLER, T. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.*, v.62, p.266-276, 1988.
- RODENBUSCH, C.; SOUZA, C.; GONÇALVES, K.; STRECK, A.; CANAL, C. Detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. In: XIX Encontro Nacional de Virologia, Caxambú, MG, Brazil, 2008, Anais. Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Virologia, 2008.
- SANTOS, P.; PINTO, A.M.V.; CUBEL GARCIA, R.C.N.; LABARTHE, N.V.; OLIVEIRA, L.H.S. Padronização de reagentes e métodos utilizados na técnica de hemaglutinação para o diagnóstico laboratorial da parvovirose canina. *Rev. Bras. Ciência Vet. UFF*, v.4, nº3, p.101-115, 1997.
- SCHUNCK, B.; KRAFT, W.; TRUYEN, U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods*. v. 55, p. 427-33, 1995.
- SENDA, M.; HIRAYAMA, N.; YAMAMOTO, H. et al. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Vet. Microb.*, v.12, p.1-6, 1986.
- SENDA, M.; PARRISH, C.; HIRASAWA, R. et al. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J. Clin. Microb.*, v.33, nº1, p.110-113, 1995.
- SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. v.102 n.2 p.379-384, 2005.
- SHERDING RG. Small bowel disease. In: ETTINGER S.J. 3<sup>a</sup> ed. *Textbook of veterinary medicine*. WB Saunders Company, 1989, Philadelphia. v.2, p.1351-3, 1989.
- SIEGL, G. Canine Parvovirus: Origin and Significance of a "New" Pathogen. In: Berns, KI. *The Parvoviruses*. Plenum Publishing Corp., New York, p.363-388, 1984.
- SMITH-CARR, S.; MACINTIRE, D.; SWANGO, L. Canine parvovirus: part 1. Pathogenesis and vaccination. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.19, p.125-133, 1997.
- TERAMOTO, Y. A.; MILDBRAND, M. M.; CARLSON J.; COLLINS, J. K.; WINSTON, S. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination, and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, v.20, p.373-378, 1984.

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

TRUYEN, U.; PLATZER, G.; PARRISH, C. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet. Rec.*, v.138, p.365-366, 1996.

TRUYEN, U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.*, v.69, p.47-50, 1999.

TSAO, J.; CHAPMAN, M.; AGBANDJE, M. et al. The three dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. v.251, p.1456-1464, 1991.

VAN REGENMORTEL, M.H.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H. et al. *Virus Taxonomy. San Diego, Academic Press*, p.1167, 2000.

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

WILLI, L.M.V. *Estudo de eliminação de Parvovírus vacinal nas fezes de cães (Canis Familiaris) primovacinação*. Niterói, 1998. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 1998.

WU, H.; ROSSMAN, M. The Canine Parvovirus empty capsid structure. *J. Mol. Biol.*, v.223, p.231-244, 1993.

## 8 APÊNDICE

## 8.1 Ficha de identificação dos animais (Apêndice 1)

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
 INSTITUTO BIOMÉDICO  
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

**PROCOLO DE PARVOVIROSE CANINA**

<b>Registro</b>	<b>Data de coleta</b>
	/ /

## 1 – CLÍNICA

Nome: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

## 2 – PROPRIETÁRIO DO ANIMAL

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

## 3 – ANIMAL

Nome: \_\_\_\_\_ Idade (meses): \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Moradia: ( ) casa ( ) apto Finalidade do cão: ( ) guarda ( ) companhia ( ) outros

Local predominante de passeio do cão: ( ) rua ( ) praia ( ) praça ( ) outros ( ) Não passeia

## 4 – VACINAÇÃO

Nome da vacina	Data	Nome da vacina	Data
	/ /		/ /
	/ /		/ /
	/ /		/ /
	/ /		/ /

## 5 – SINAIS CLÍNICOS

OCORRÊNCIA EM DIAS:		TEMPERATURA: °C	
VÔMITO ( ) sim ( ) não	ANOREXIA ( ) sim ( ) não	APATIA ( ) sim ( ) não	
DIARRÉIA ( ) Ausente ( ) Hemorrágica ( ) Outra		CONSISTÊNCIA DAS FEZES ( ) Líquida ( ) Pastosa	

## 6 – RESULTADO

Data: / /	( ) negativo	( ) positivo	Título de HA:
-----------	--------------	--------------	---------------

## 7 – OBSERVAÇÕES


## 9 ANEXO

## 9.1 Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (Anexo 1)



Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa Animal

*C*ertificamos que o projeto nº 0082/09, intitulado “ DETECÇÃO DO PARVOVÍRUS CANINO (CPV) EM AMOSTRAS FECAIS DE FILHOTES DE CÃES COM GASTREENTERITE NO MUNICÍPIO DE DUQUE DE CAXIAS” sob a **orientação** da Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA N. C. GARCIA, (pesquisador responsável) da FACULDADE DE VETERINÁRIA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em dezesseis de abril de 2009.

Niterói, 16 de abril de 2009.



Presidente do C.E.P.A.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)