

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA**

**CORONAVÍRUS CANINO (CCoV): ISOLAMENTO E
DETECÇÃO MOLECULAR EM AMOSTRAS CLÍNICAS**

Flávia Volpato Vieira
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA – FMVA**

**CORONAVÍRUS CANINO (CCoV): ISOLAMENTO E
DETECÇÃO MOLECULAR EM AMOSTRAS CLÍNICAS**

Flávia Volpato Vieira

Orientadora: Prof. Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba – SP
2015

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Vieira, Flávia Volpato

V888c

Coronavírus canino (CCoV): isolamento e detecção molecular em amostras clínicas / Flávia Volpato Vieira .

Araçatuba: [s.n], 2015

62f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientadora: Prof. Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

1. Cães. 2. Diarreia. 3. Gastroenterite, 4. Parvo vírus canino. 5. PCR. I. T.

CDD 574.87328



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: Coronavirus canino (CCoV): isolamento e detecção molecular em amostras clínicas.

AUTORA: FLÁVIA VOLPATO VIEIRA

ORIENTADORA: Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO


Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA


Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

DATA DA REALIZAÇÃO: 29 de outubro de 2015.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Flávia Volpato Vieira - nascida em 17 de novembro de 1988 na cidade de Dois Córregos – SP. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, campus de Araçatuba – SP no ano de 2011. Ingressou em 2012 no programa de residência na área de Clínica e Cirurgia, com ênfase em Clínica Médica de Pequenos Animais pela mesma universidade, tendo-o concluído em 2014. Iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, campus de Araçatuba – SP, em março de 2014, sob orientação da Professora Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Sueli (*in memoriam*), por todo amor, incentivo e carinho dedicados a mim desde o início da minha vida. Por ser exemplo de mulher perseverante e guerreira. Por ter sido minha primeira professora, aquela que me ensinou as primeiras palavras, o gosto pela leitura e me mostrou o quão longe podemos chegar quando acreditamos nos nossos ideais. Principalmente por ter me ensinado que por mais árduo que seja o caminho a percorrer, desistir nunca será o melhor caminho. Você é minha heroína! Te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sei que Ele está sempre ao meu lado me guiando e fortalecendo. Obrigada por nunca me desamparar e por sempre colocar tantas coisas e pessoas especiais em meu caminho.

Aos meus pais, Odilon e Sueli, por TUDO que sou hoje. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui. Obrigada por cada renúncia que sei que fizeram para que eu pudesse ir mais longe. Obrigada por me ensinarem o amor e mais que isso, por terem me permitido crescer em um lar de amor. Por todo apoio, incentivo e também por cada cobrança. Minha vontade de crescer e ser sempre melhor é fruto de tudo que aprendi com vocês. Amo vocês.

À minha irmã, Marília, por ser minha companheira nessa vida. Aquela que eu sei que sempre estará ao meu lado haja o que houver! Obrigada pelo apoio, pelas conversas, por sempre estar ao meu lado por maior que seja a distância (física) que nos separe. Você é e sempre será muito importante para mim.

Ao meu noivo, Daniel,..ah quanto tenho a te agradecer! Obrigada por ser meu companheiro, meu amigo, meu amor! Por estar sempre ao meu lado, independentemente do quão difícil foi o dia. Por sempre estar pronto para me ouvir, ajudar, acalmar e partilhar todos os momentos comigo. Obrigada por todo carinho dedicado a mim diariamente e todo o apoio para que eu nunca desista e conquiste meus objetivos. Sem você seria muito mais difícil. Que esta seja mais uma das várias coisas que já conquistamos e conquistaremos juntos. Eu te amo!

Aos meus avós, Odilon e Enny, por se fazerem tão presentes e se alegrarem com cada conquista. Por me darem "aquele" colo que só os avós tem quando eu mais preciso!

À minha orientadora, professora Tereza Cristina, por ser exemplo de pesquisadora e por todos os ensinamentos desde a época da iniciação científica. Obrigada por mais uma vez ter aceitado me orientar, pela paciência e pela confiança depositadas em mim.

Às “minhas meninas”, Susi e Polly, por me presentear todos os dias como o amor mais puro que uma pessoa pode receber. E claro que também ao Astor, Ágatha e Tevez! Ter vocês em minha vida me faz querer ser uma pessoa e profissional sempre melhor...

Aos meus amigos da Dezoituma e colegas de profissão: Arthur, Leo, Mamá, Laris, Ju...a amizade de vocês faz toda diferença! Obrigada por cada risada, cada conversa e pelo companheirismo desde os tempos de graduação.

Aos amigos Acácio e Karina, profissionais que eu tanto admiro. Obrigada por essa amizade conquistada nos tempos de residência e pós-graduação, por se fazerem presentes no meu dia-a-dia e estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigada por todas as conversas, discussões de casos clínicos, mas principalmente por tantas risadas! É muito bom poder contar com vocês!

A todos que direta ou indiretamente tornaram a execução desse projeto possível, contribuindo das mais variadas formas.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida (Processo nº 2013/24951-4).

E, para finalizar, a todos os cães que participaram do projeto.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Coronavírus Canino.....	16
2.1.1 Caracterização e Classificação.....	18
2.1.2 Patogenicidade e Epidemiologia.....	18
2.1.3 Manifestações Clínicas e Lesões.....	19
2.1.4 Diagnóstico, Profilaxia e Controle.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Amostras.....	21
3.2 Triagem para CPV-2, CAV, CDV.....	22
3.3 Extração de DNA (CPV-2a e CPV-2b).....	22
3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
3.4 Isolamento Viral.....	23
3.5 Detecção de CCoV-I e CCoV-II.....	24
3.5.1 Extração do RNA.....	24
3.5.2 Transcrição Reversa (cDNA).....	24
3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
3.6 Sequenciamento e análise filogenética do CPV-2.....	26
3.6.1 Alinhamento e árvore filogenética.....	26
3.6.2 Número de Acesso do <i>GenBank</i>	27
3.7 Sequenciamento e análise filogenética do CCoV.....	27
3.7.1 Alinhamento e árvore filogenética.....	27
3.7.2 Número de Acesso do <i>GenBank</i>	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Detecção do CPV-2a e CPV-2b.....	28
4.2 Isolamento Viral.....	29
4.3 Detecção de CCoV-I e CCoV-II.....	29
4.4 Sequenciamento e análise filogenética do CPV-2.....	29
4.5 Sequenciamento e análise filogenética do CCoV.....	30
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38
8. ARTIGO CIENTÍFICO - Primeiro relato e caracterização molecular do Parvovírus Canino tipo C em Araçatuba, São Paulo, Brasil.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

µg – micrograma

µl – microlitro

Asp - Aspartato

CAV – Adenovirus Canino

CCoV – Coronavirus Canino

CCoV-I – Coronavirus Canino tipo I

CCoV-IIa – Coronavirus Canino tipo II subtipo IIa

CCoV-IIb - Coronavirus Canino tipo II subtipo IIb

CDV – Vírus da Cinomose Canina

CPV- Parvovirus Canino

CPV-2a – Parvovirus Canino variante 2a

CPV-2b – Parvovirus Canino variante 2b

CPV-2c – Parvovirus Canino variante 2c

CRV – Rotavirus Canino

DMEM-F12 – Meio de Dulbecco Modificado

ELISA – ensaio imunoenzimático

et al. – e colaboradores

FCoV – Coronavirus Felino

FCoV-II – Coronavirus Felino tipo II

FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

g – grama

Glu – Glutamato

HA - Hemaglutinação

HV – Hospital Veterinário

kb - kilobyte

IgA – Imunoglobulina A

mg – miligrama

min - minuto

mL – mililitro

nm – nanometro

PBS – solução salina tamponada

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pmol – Picomol

pb – pares de base

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotação por minuto

RT-PCR - reação da transcriptase reversa seguida de PCR

SAS - Statistical Analysis System

SP – São Paulo

TGEV – Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UV - Ultravioleta

LISTA DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. Alterações clínicas observadas em filhotes positivos para CPV e grupo controle	60
Quadro 2. Resultado do hemograma, proteína plasmática total e glicemia no momento do primeiro atendimento dos animais que sobreviveram e vieram à óbito positivos para CPV	61

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Micrografia eletrônica de um Coronavirus	16
Figura 2. A) Representação esquemática do genoma do CCoV/ B) Ilustração esquemática de um vírion com os seus componentes.....	17
Figura 3. Prevalência da infecção por CPV de acordo com as variantes (CPV-2a e CPV-2b) na população estudada.....	28
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando peso molecular de 1 Kb plus. A) Produto amplificado de 681 pb, correspondente ao CPV 2a/ B) Produto amplificado de 427 pb, respectivo ao CPV 2b.....	30
Figura 5. Fotomicrografia em contraste de fase dos principais efeitos citopáticos observados no processo de isolamento viral.....	31
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando peso molecular de 1 Kb plus. A) Produto amplificado de 409 pb, correspondente ao CCoV/ B) Produto amplificado de 409 pb e 694 pb respectivamente, correspondente ao CCoV II.....	31
Figura 7. Árvore filogenética do Parvovirus Canino utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> , realizada no MEGA4.....	32
Figura 8. Alinhamento das sequências 2c. Em amarelo, a mutação D-426-E. As sequências foram alinhadas utilizando o Editor de alinhamento de sequência BioEdit V.7.0.9.0	32
Figura 9. Árvore filogenética do Coronavirus Canino, para o gene S utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> , realizada no MEGA4.....	33

Coronavírus Canino (CCoV): isolamento e detecção molecular em amostras clínicas.

RESUMO - Até o momento, a doença causada pelo coronavírus canino (CCoV) não foi totalmente elucidada, e o papel que o CCoV desempenha na patogenia da enfermidade não está bem estabelecido. Somente após o aparecimento da SARS (Síndrome Respiratória Aguda) em seres humanos causada por um coronavírus em 2002 isolado de um mamífero selvagem, foram desenvolvidos vários estudos com coronavírus de diversas espécies na busca de variantes circulantes. Poucos estudos têm reportado a presença dos CCoV e suas variabilidades no Brasil. Enterites virais são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade na clínica de pequenos animais e, embora existam diversos agentes etiológicos descritos, o CCoV e o CPV ainda são considerados uns dos principais patógenos causadores de gastroenterite aguda em cães jovens. Para o presente estudo, foram colhidas 100 amostras de fezes de cães atendidos em uma rotina hospitalar veterinária com sinais clínicos de gastroenterite (hemorrágica ou não). Foram amplificados RNA do CCoV e o DNA do CPV nas amostras testadas. Alguns dos produtos da amplificação para CPV foram purificados, sequenciados, alinhados e submetidos ao *GenBank* para detecção do CPV-2c e caracterização do CCoV. O CCoV mostrou-se presente em 6% das amostras analisadas, enquanto o CPV-2a foi identificado em 43% das amostras e o CPV- 2b em 18% do total. Um *pool* de amostras submetidas ao sequenciamento e análise filogenética identificou o CPV-2c, revelando que a nova variante já está presente em Araçatuba – SP. A análise filogenética para o CCoV evidenciou que as amostras analisadas pertencem ao subtipo CCoV-IIa (pantrópica), reforçando a importância da identificação desse agente na população canina, uma vez que as vacinas disponíveis atualmente não possuem as novas variantes e de modo que os cães do Brasil estão susceptíveis a graves surtos, como já descritos em outros países.

Palavras-chave: Cães, Diarreia, Gastroenterite, Parvovirus Canino, PCR

Canine Coronavirus (CCoV): isolation and molecular detection in clinical samples.

SUMMARY - Until now, the disease caused by the canine coronavirus (CCoV) was not fully elucidated, the CCoV role in the pathogenesis of the illness is not quite established. Only after the SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) appearance in human beings caused by a coronavirus in 2002, isolated of a wild mammal, many studies were developed with coronavirus of different species in search of circulating variants. Few studies had reported the presence of CCoV and his variability's in Brazil. Viral enteritis are responsible by high morbidity taxes and mortality in the small animals clinic and, although there are several etiologic agents described, the CCoV and the CPV are not yet considered a major cause of acute gastroenteritis pathogens in young dogs. For the present study, were collected 100 stool samples from dogs attended in a veterinary hospital routine with clinical signs of gastroenteritis (hemorrhagic or not). The CCoV and CPV RNA were amplified in the tested samples. Some of the by-products from the CPV amplification were purified, sequenced, aligned and subjected to the *GenBank* for the detection of CPV-2c and characterization of CCoV. The CCoV was present in 6% of the analyzed samples, while CPV-2a was identified in 43% of samples and CPV-2b in 18% of the total. A sample pool submitted to the sequencing and filogenetic analysis identified the CPV-2c, reveling that the new variant is already present in Araçatuba – SP. The phylogenetic analyses for CCoV revealed that the studied samples belong to the Subtype CCoV-IIa (pantropic), strengthening the agent identification importance in the canine population, once that the actual available vaccines don't have the new variants so that the dogs from Brazil are susceptible to severe outbreaks, as described in other countries.

Key-words: Hemorrhagic gastroenteritis, Dogs , Diarrhea , PCR, RT -PCR.

1. INTRODUÇÃO

As gastroenterites são responsáveis por grande parte da casuística de doenças encontradas na clínica médica de pequenos animais. As enterites virais são consideradas uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em filhotes e compõem um grupo de doenças de extrema importância na rotina clínica devido às altas taxas de morbidade e mortalidade observadas, apesar do advento da vacinação. Entre os principais agentes etiológicos estão o parvovirus canino (CPV-2), o coronavírus canino (CCoV), o rotavirus canino (CRV) e o vírus da cinomose canina (CDV).

Isolado em 1978 (APPEL et al., 1979) o parvovirus canino possui destaque entre os agentes etiológicos responsáveis por gastroenterite em cães jovens, uma vez que além de possuir uma elevada frequência na população canina, possui grande resistência no ambiente, de modo que está amplamente difundido na população canina mundial, na qual o vírus original foi substituído por novas variantes antigênicas denominadas CPV-2a e CPV-2b (DECARO et al., 2006). É importante considerar ainda que, uma nova variante do CPV-2, denominada CPV-2c foi descrita por Buonavoglia et al. (2001) na Itália, já havendo relatos em outros países (NAKAMURA et al.; 2004; DECARO et al., 2006). Na América do Sul foi descrito pela primeira vez no Uruguai por Pérez et al. (2007). No Brasil, Streck et al. (2009) identificaram o tipo 2c em amostras provenientes de fezes de cães da região metropolitana de Porto Alegre e trabalhos recentes tem mostrado o CPV-2c como o subtipo mais prevalente nas infecções por CPV-2 no país (Pinto et al., 2012; Fontana et al. 2013).

Por sua vez, o Coronavírus canino (CCoV) é considerado um dos principais patógenos causadores de gastroenterite aguda em cães jovens. A enterite por coronavírus é tipicamente menos grave que a enterite clássica por parvovirus e raramente causa diarreia hemorrágica, septicemia e morte (NELSON E COUTO, 2010). A infecção por CCoV facilita a infecção por outros vírus, de modo que a co-infecção pode agravar a intensidade da diarreia. São

conhecidos dois genótipos: CCoV-I e CCoV-II, amplamente distribuídos pelo continente europeu (DECARO et al., 2010), onde vários surtos já foram relatados, principalmente em locais como canis e abrigos. Ainda, o subtipo CCoV-II é dividido em dois subtipos, CCoV-IIa e CCoV-IIb, os quais possuem recombinação genética com FCoV-II e o TGEV, respectivamente (DECARO et al., 2010). Buonavoglia et al. (2006), relataram um surto fatal de CCoV-IIa na Itália, no qual filhotes com menos de 60 dias vieram a óbito. Este subtipo (pantrópico) é altamente patogênico e é responsável pela doença sistêmica em infecções naturais e experimentais (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al.; 2008), sendo encontrado em diversos órgãos parenquimatosos.

O CCoV-II tem distribuição mundial, com destaque na Europa (DECARO et al., 2009) e Ásia (SOMA et al., 2010). No Brasil, um estudo recente identificou o CCoV-II na população canina (PINTO, 2013) e sua posterior caracterização e análise filogenética identificou que os subtipos IIa e IIb encontrados nas amostras brasileiras, são similares ao já descritos em outros países (COSTA et al., 2014; PINTO et al., 2014).

Desse modo, identificação do CCoV e suas variantes é importante para o monitoramento deste agente na população canina brasileira, contribuindo para o estudo de suas filogenias e epidemiologia. Ademais, as vacinas amplamente utilizadas não possuem as novas variantes de tal patógeno, deixando a população canina susceptível aos surtos, como já relatados em vários países, comprometendo a sanidade e levando ao óbito diversos animais.

Frente ao exposto, a presente pesquisa visou identificar a presença do material genético RNA viral do coronavírus canino tipo I e II e suas variantes: CCoV-IIa, CCoV-IIb (TGEV-like), bem como a presença de infecções e co-infecções por outros agentes virais em cães com quadro de gastroenterite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Coronavirus Canino

2.1.1 Caracterização e classificação

Os coronavirus são classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*; pertencem ao gênero *Alphacoronavirus* e a espécie *Alphacoronavirus-1*, juntamente com o coronavirus felino (FCoV) e o vírus da gastroenterite transmissível suína (TGEV), uma vez que tais agentes possuem mais 96% de similaridade genética (GONZÁLEZ et al., 2003; CARSTENS, 2010). Os principais sinais clínicos associados à infecção gastrointestinal dos animais acometidos pelo vírus incluem letargia, anorexia, êmese e diarreia, durando de uma a duas semanas (DECARO et al., 2008). Observa-se uma variação de cor amarelo a esverdeado na diarreia, que em algumas vezes também pode ser hemorrágica. O CCoV (Figura 1) replica-se primariamente na extremidade das vilosidades do intestino delgado, causando infecção lítica, seguida de descamação e encurtamento das mesmas, com consequente diarreia em 18 a 72 horas pós-infecção. Ainda, esse vírus geralmente é encontrado em co-infecções com bactérias, parasitos e outros vírus como o adenovírus e parvovirus canino (CAV e CPV-2), respectivamente (PRATELLI et al., 2001).

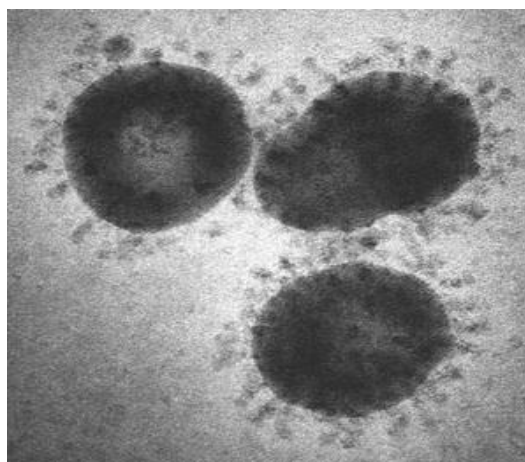


FIGURA 1 - Micrografia eletrônica de um coronavírus. Fonte: <http://blogs.discovermagazine.com>

Os coronavírus são envelopados, pleomórficos, aproximadamente arredondados com até 220nm de diâmetro. Possuem RNA fita simples não segmentado, sentido positivo com 27 a 31 kb de comprimento (Figura 2A), nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N (LAI e HOLMES, 2001). Seu genoma é composto por genes codificadores de proteínas estruturais: proteína de nucleocapsídeo (N), proteína de matriz (M), proteína de envelope (E) e proteína de espícula (S) (MASTERS, 2006) (FIGURA 2B). A proteína S é a principal proteína estrutural de envelope do coronavirus, a qual forma projeções de 20nm de comprimento, sendo responsável pela atividade hemaglutinante e o principal alvo para anticorpos neutralizantes. Há ainda, uma segunda espécie denominada de coronavirus respiratório canino (CRCV), formalmente conhecido como *Betacoronavirus 1*, gênero *Betacoronavirus* (CARSTENS, 2010), a qual foi relatada causando afecções respiratórias em cães (ERLES et al., 2003).

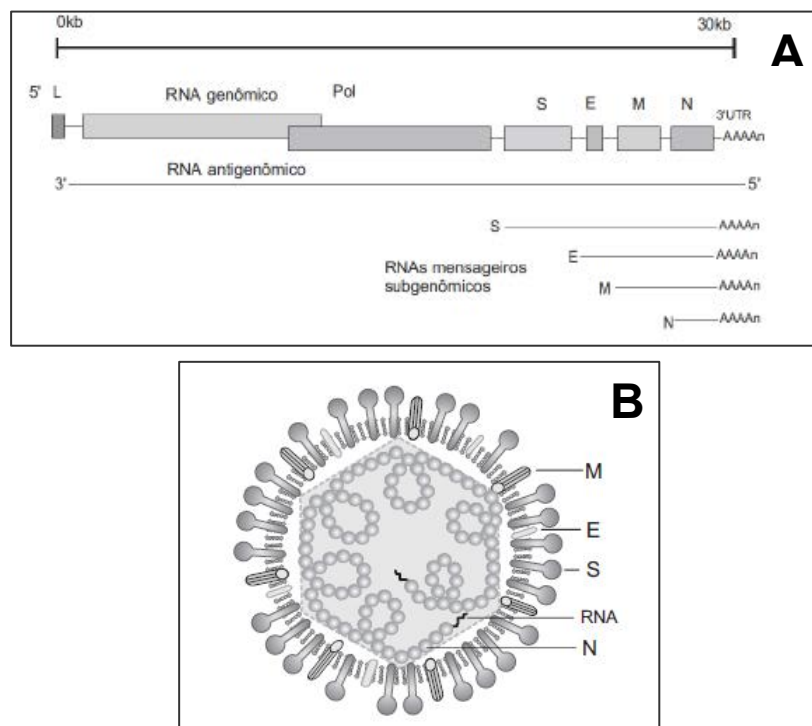


FIGURA 2 - A) Representação esquemática do genoma do CCoV; B) Ilustração esquemática de um vírion com os seus componentes. M: proteína de membrana; E, S: glicoproteínas do envelope; N: nucleoproteína.; RNA: genoma. Fonte: Lovato e Dezengrine (2007).

2.1.2 Patogenia e Epidemiologia

A infecção por CCoV é restrita ao trato gastrointestinal e ocorre principalmente em canis e abrigos para cães, uma vez que por se tratar de um vírus altamente contagioso se difunde rapidamente pela população canina. A principal via de infecção é oral, sendo as fezes e fômites as principais fontes de infecção. O CCoV é eliminado nas fezes por até 2 semanas pós-infecção, prolongando-se por até 180 dias em alguns casos. Cães saudáveis podem excretar o vírus nas fezes por longos períodos (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

O CCoV é classificado em dois genótipos: CCoV tipo 1 (CCoV-I) e o CCoV tipo 2 (CCoV-II) (DECARO et al., 2008). O CCoV-II foi descrito após a ocorrência de um surto de doença severa em filhotes de cães (BUONAVOGLIA et al., 2006). O vírus foi encontrado nas fezes e em vários órgãos parenquimatosos, sendo isolado em cultivo celular e inoculado em cães livres de patógenos específicos (SPF), reproduzindo doença. Os animais vieram à óbito, confirmando a virulência do novo tipo.

O CCoV-II embora descrito em diversos países de todo o mundo, mostra-se mais prevalente em países do continente europeu (DECARO et al., 2009) e asiático (SOMA et al., 2010). O CCoV-II pode ser classificado em dois subtipos: CCoV-IIa e CCoV-IIb (DECARO et al., 2009). O subtipo CCoV-IIb tem sido relatado em vários países europeus (ERLES e BROWLIE, 2009; DECARO et al., 2010), entretanto ainda que tenha sido detectado em órgãos, não se mostrou estar relacionado a doença sistêmica em cães (DECARO et al., 2009). Já o CCoV-IIa é responsável pela ocorrência de diversos surtos fatais da doença.

No Brasil, o primeiro estudo que identificou o CCoV-II na população canina é recente (PINTO, 2013). Neste estudo, o CCoV-IIa foi encontrado nas fezes e em diversos órgãos como cérebro, coração, pulmão, baço, fígado, rim, entre outros, em 3 de um total de 5 cães com até 6 meses de idade que vieram à óbito com gastroenterite hemorrágica no sul do país. Ainda, a análise

filogenética mostrou que os subtipos circulantes no sul do país são similares aos já descritos em outros países (PINTO et al., 2014). Outro estudo conduzido por Costa et al. (2014), no estado do Rio de Janeiro, analisou amostras de fezes de 250 animais atendidos em um período de 6 anos, das quais 30 foram positivas para CCoV após RT-PCR. Destas, 19 foram caracterizadas como CCoV-II baseado nas alterações dos aminoácidos encontradas na proteína M. Ademais, ainda que 6 dessas amostras analisadas apresentassem substituições não descritas previamente, o estudo também mostrou a similaridade genética das amostras brasileiras com as encontradas na literatura, fazendo-se necessário estudos futuros para esclarecer a importância e consequência dessas alterações encontradas apenas nas amostras brasileiras.

2.1.3 Manifestações Clínicas e Lesões

Enquanto os animais infectados por CCoV-I manifestam sinais clínicos leves a moderados, a infecção por CCoV-II é caracterizada por sintomas e lesões mais graves, independentemente da co-infecção por outros agentes. Os animais apresentam febre, letargia, anorexia, êmese, diarreia (hemorrágica ou não), sinais neurológicos (ataxia, convulsões) e acentuada leucopenia, principalmente por linfopenia. O óbito pode ocorrer de 2 a 3 dias após o início dos sintomas. Buonavoglia et al. (2006), relataram severas lesões no trato gastrointestinal, fígado, baço, pulmões e rins. A via de infecção é fecal-oral e a replicação ocorre nas vilosidades, assim que o vírus atinge o intestino delgado. Após dois dias da infecção as partículas virais já são excretadas pelas fezes e os sinais clínicos tem início de 1 a 4 dias pós-infecção.

Macroscopicamente, observa-se enterite leve a moderada nas infecções por CCoV, com conteúdo líquido de coloração amarela ou esverdeada, além de dilatação do intestino delgado e evidenciação das placas de Peyer. A mucosa intestinal encontra-se hemorrágica e/ou hiperêmica e os linfonodos mesentéricos podem estar edemaciados. Já os achados microscópicos caracterizam-se por atrofia das vilosidades intestinais, achatamento das células

epiteliais e aumento de celularidade da lâmina própria. (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012). Além desses achados, animais com infecção por CCoV-II, apresentam outros órgãos comprometidos com diversas alterações, tais como: severa necrose hepática e renal, aumento e congestão esplênica com severa depleção linfóide e ainda, congestão pulmonar (ZICOLA et al., 2012).

2.1.4 Diagnóstico, profilaxia e controle.

A detecção do vírus nas fezes ou intestino é a forma mais utilizada para o diagnóstico, diferenciando-a de outros agentes causadores de enterite (CPV, CAV, rotavirus e o vírus da cinomose canina). A microscopia eletrônica é utilizada para visualização do agente nas fezes, entretanto outros métodos diagnósticos como a técnica de RT-PCR realizada diretamente das fezes, tem sido utilizados principalmente em pesquisas, mostrando-se capaz de detectar menores quantidades de vírus excretados nas fezes, por maiores períodos de tempo (PRATELLI et al., 2006).

O isolamento viral tem sido utilizado com sucesso por alguns laboratórios e as células de linhagem de fibrossarcoma canino A-72 mostraram-se particularmente susceptíveis ao CCoV, nas quais o vírus produz efeito citopático caracterizado pela formação de sincícios (RUGGIERI et al., 2007). Além dessa linhagem, outras células como as de embrião e a linhagem de rim felino mostraram-se susceptíveis (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

Entre as técnicas sorológicas temos a soroneutralização (SN), imunoperoxidase (IPX) e o ELISA. Deve-se considerar, no entanto, que sorologia tem pouca utilidade diagnóstica, haja vista a distribuição do vírus na população canina e a grande quantidade de infecções subclínicas (PINTO, 2013). Ademais, a detecção de anticorpos no soro não indica necessariamente exposição recente ao agente. Há um *kit* de ELISA que detecta IgM disponível comercialmente para uso em clínicas e consultórios. Alguns estudos com inoculações experimentais demonstraram a presença de IgM no plasma 3 dias

após a inoculação, assim, pode-se inferir que a presença de tal imunoglobulina no soro indica infecção recente pelo CCoV (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

Com relação ao controle e profilaxia, o primordial é que se evite o contato de cães soronegativos com animais infectados. Condições de estresse ocasionadas por superpopulação, desmame precoce e infecções concomitantes por outros agentes, causam imunossupressão e favorecem o desenvolvimento de enterite nos animais infectados. (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012). Por se tratar de um vírus envelopado, no ambiente é facilmente inativado por calor e solventes lipídicos. Em temperaturas baixas pode manter-se viável por longos períodos.

O tratamento baseia-se na restituição do equilíbrio hidro-eletrolítico e controle das infecções secundárias (NELSON E COUTO, 2010). As vacinas atenuadas forma testadas com bons resultados e cães vacinados por via oral apresentaram títulos mais altos de IgA dos que os vacinados por via intramuscular, além de não excretarem o vírus nas fezes como foi observado nos animais que receberam a vacina por via intramuscular. É sabido que as vacinas disponíveis no mercado não apresentam os subtipos em sua formulação e alguns trabalhos mostram que subtipos de CCoV-II tem uma limitada reação cruzada com o genótipo CCoV-I presente nas vacinas comerciais disponíveis atualmente, comprometendo a eficiência vacinal (DECARO et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram colhidas 100 amostras de fezes de cães atendidos no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – SP, apresentando sinais clínicos de gastroenterite (hemorrágica ou não). No grupo experimental foram incluídos animais com até

1 ano de idade, de diferentes raças, de ambos os gêneros, com ou sem histórico prévio de vacinação. Após anamnese, os animais foram submetidos ao exame físico e avaliação laboratorial (hemograma) conforme as normas do HV. As fezes (aproximadamente 1g) colhidas, por vezes com sondas e/ou por eliminação espontânea, foram mantidas em freezer a -20°C até o momento de seu processamento. Imediatamente ao chegar ao Laboratório de Virologia e Cultivo Celular, da FMVA, as fezes foram diluídas a 20% (p/v) em DMEM-F12 adicionado de uma solução antibiótico e antimicótico na proporção de 10% (Sigma-Aldrich).

3.2 Triagem para CPV-2, CAV e CDV

Conforme descrito anteriormente, as mesmas amostras foram submetidas a reação em cadeia da polimerase para parvovirus tipo 2 (CPV-2) (BUONAVOGLIA et al., 2001), adenovírus canino tipo 1 e 2 (CAV-1 e CAV-2) (Hu et al., 2001) e RT-PCR (*canine distemper* vírus-CDV) (FRISK et al., 1999), a fim de que outras gastroenterites virais e possíveis co-infecções fossem identificadas.

3.3 Extração de DNA (CPV-2a e CPV-2b)

O DNA viral foi extraído do sobrenadante da suspensão fecal pelo método do Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) com algumas modificações. Em tubos cônicos de 1,5 ml foram adicionados 700 µl de cada amostra e, posteriormente 500 µl do tampão Viral Lysis Buffer do Kit comercial RNA/DNA PureLink™ (Invitrogen®). Essa suspensão ficou 15 min em temperatura ambiente e após esse tempo foi centrifugada durante 5 min a 13.000 rpm, aproximadamente 7,500 x g (centrifuga 5415, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e ao sedimento remanescente no tubo foram adicionados 500 µl do mesmo tampão e 50 µl de proteinase K (10 mg/

Invitrogen[®]). Os tubos foram então colocados em banho-maria a 56 °C, por cerca de 1 h para desintegração de possíveis fragmentos da mucosa intestinal. Em seguida, foram adicionados 500 µl da solução de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich[®]) a cada amostra com agitação manual leve. Após 2 min, a 4 °C uma nova centrifugação foi realizada durante 2 min a 7,500 x g, como descrito anteriormente. Após a centrifugação, a parte superior aquosa foi gentilmente removida e transferida a um novo tubo e adicionado 1 ml de etanol a 100% (Merck[®]). Após nova centrifugação por 5 min a 7,500 x g o etanol foi removido e visualizado o pellet (DNA) que foi ressuspendido e 10 µl de água ultra pura livre de RNA/DNA (Invitrogen[®]).

3.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase ou PCR foi conduzida em conformidade com o kit Jumpstart[™] (Sigma-Aldrich) sem nenhuma modificação. Os *primers* para CPV-2a e CPV-2b foram os mesmos descritos por Buonavoglia et al. (2001) e amplificam 681pb e 427pb, respectivamente. Para a reação de PCR foram adicionados a tubos de 0,2 ml 12 µl do Jumpstart ReadyMix, 1 µl de cada primer (10 pmol), 1µl MgSO₄, 2,5 µl de água ultrapura e 7 µl de DNA (± 10 ng). As condições de ciclagem foram: 94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 56 °C por 1min e 72 °C por 2 min por 34 vezes, e a extensão final 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1% em transluminador UV e documentados.

3.4 Isolamento Viral

As suspensões fecais foram submetidas ao isolamento em monocamadas de células de adenofibrossarcoma canino - A72 (ATCC CRL 1542) gentilmente cedidas pelo laboratório Biovet. Para tanto, as suspensões já diluídas em 1:20 em DMEN-F12 foram submetidas a filtração 75-µm para

remoção de debris celulares, em seguida submetidas em 45- μ m e 25- μ m. Monocamadas de células com 80% de confluência foram cobertas com 1 ml da suspensão viral, e após 90 min (adsorção) o inóculo foi removido e adicionado meio DMEM-F12 com antibióticos e sem soro fetal. As garrafas de células foram incubadas em estufa de CO₂ por 5 dias consecutivos. Os efeitos citopáticos foram observados e documentados após 3 passagens consecutivas para todas as amostras. Para a confirmação da presença viral foi realizada a análise molecular para CCoV.

3.5 Detecção de CCoV-I e CCoV-II

3.5.1 Extração do RNA

RNA viral foi extraído do sobrenadante da suspensão fecal pelo método TRIzol[®] LS (Invitrogen[®], USA). Em tubos cônicos de 1,5 ml foram adicionados 700 μ l de TRIzol[®] e, posteriormente 350 μ l de cada amostra. Essa suspensão ficou 10 min a 4 °C e, após esse período, foi acrescido 200 μ l de clorofórmio a cada amostra com agitação manual leve. Posteriormente, os tubos foram centrifugados durante 15 min a 7,500 x g (centrifuga 5415, Eppendorf). Após a centrifugação, a parte superior aquosa foi gentilmente removida e transferida a um novo tubo ao qual foi adicionado 700 μ l de álcool isopropílico a 4 °C. Os tubos foram então acondicionados em freezer -86 °C até a próxima etapa.

3.5.2 Transcrição Reversa (cDNA)

Para a realização da transcrição reversa, o RNA extraído na etapa anterior foi primeiramente precipitado, lavado e ressuspendido. Para tanto, o material ainda congelado foi centrifugado a 7,500 x g (centrifuga 5415, Eppendorf) durante 15 min, a fim de que o RNA precipitado formasse um pellet em forma de gel no fundo e nas paredes do tubo. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1 ml de etanol a 100 % (Merck[®]), sendo novamente centrifugado a 7,800 x g (centrifuga 5415, Eppendorf) durante 5

min. Após essa etapa, o etanol foi descartado, o pellet ressuspendido em 10 µl de água ultra pura livre de RNA/DNA (Invitrogen®) e incubado a 4°C durante 5 min.

Para a transcrição reversa foi utilizado o kit Enhanced Avian Reverse Transcriptase [eAMV™ RT] (Sigma-Aldrich®). Em tubos de 0,2 ml foram adicionados 5 µl do RNA, 1 µl de 10 mM dNTP mix, 1 µl do primer Oligo (dT)₂₃ e 3 µl de água. Os tubos foram incubados a 70 °C durante 10 min. Após, foram adicionados 2 µl de 10x Buffer para AMV RT, 1 µl de RNase Inhibitor e 6 µl de água. Após um *spin* foi adicionado 1 µl da enzima Enhanced Avian RT em cada tubo, os quais foram incubados por 46 °C durante 50 min. Imediatamente após foi realizada a reação de PCR.

3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida em conformidade com o kit Jumpstart™ (Sigma-Aldrich) sem nenhuma modificação. O par de *primers* CCoV1, CCoV2 (HERREWEGH et al., 1998) que amplifica 409 pb foi utilizado para detecção do Coronavírus canino (CCoV) nas amostras. EL1F, EL1R e S5, S6 foram os pares de *primers* utilizados para diferenciação de CCoV I (346 pb) e CCoV II (694 pb), respectivamente conforme descrito por Pratelli et al. (2004). Para a identificação do subtipo CCoV IIb (TGEV-like) foi utilizado o par de *primers* CEPol-1, TGSP-2 (370 pb) descrito por Erles e Brownlie (2009). Para a reação de PCR foram adicionados a tubos de 0,2 ml 12 µl do Jumpstart ReadyMix, 1 µl de cada primer (10 pmol), 1 µl MgSO₄, 4,5 µl de água ultrapura e 5 µl de cDNA (± 10 ng). As condições de ciclagem foram: 94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 56 °C por 1min e 72 °C por 2 min por 34 vezes, e a extensão final 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1% em transluminador UV e documentados.

3.6 Sequenciamento e análise filogenética do CPV-2

3.6.1 Alinhamento e árvore filogenética

O kit QIA quick PCR Purification (Qiagen TM) foi utilizado de acordo com o protocolo do fabricante para purificar os produtos amplificados na PCR. Antes de iniciar a marcação fluorescente da sequência de interesse, foi realizada a desnaturação da molécula de DNA por aquecimento do mesmo a 95 °C por 10 min. A reação de marcação fluorescente foi realizada através de 30 ciclos de 95 °C por 20 seg e 60 °C por 1 min, de uma solução composta por: 4 µl de DNA, 10 pmol do primer, 3 µl de água destilada e 4 µl do mix de PCR Dye; contendo tampão, Taq polimerase, dNTP normal e dNTP marcado com fluoroforo Kit Big Dye U2.0 (Applied Biosystem TM). Terminada a reação de marcação fluorescente para o sequenciamento, foram adicionados nas placas 2 µl do tampão acetato de sódio de sódio-EDTA e 80 µl de etanol a 95%. Estes foram levados ao vortex e posteriormente centrifugados a 2,500 g a 25 °C por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 100 µl de etanol a 70% e as placas centrifugadas a 2,500 g a 25 °C por 1 min. O sobrenadante foi novamente removido. O processo de precipitação foi finalizado por meio de uma centrifugação adicional a 2,500 g a 25 °C com as placas invertidas. Por fim, as placas, protegidas da luz, foram deixadas à temperatura ambiente por cerca de 30 min. A estocagem foi realizada a -20 °C.

As reações foram submetidas ao sequenciador ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, USA). A análise das sequências foi realizada com o emprego dos programas de bioinformática Bio-Edit (HALL, 1999) e ClustalW, versão 1.83 (THOMPSON et al., 1997) para alinhamento e edição das sequências, MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) para a confecção da árvore filogenética e o suíte de aplicativos.

3.6.2 GenBank accession numbers

As sequências geradas nesse estudo para o Parvovirus Canino foram submetidas ao Banco de Dados *GenBank* e a elas foram atribuídos os seguintes números de acesso (AN ou número de acesso): KP694302, KP694303, KP694304, KP694305, KP604306. Sequências de referência foram utilizadas nesse estudo de construção de árvore filogenética sob os números de acesso para Parvovirus Canino 2a (JX898891, JX898892, JX898893, JX898894, JX898895, JX898896 e JX898897), Parvovirus Canino 2b (JX898898, JX898899, JX898900 e JX898901) e Parvovirus Canino 2c (JF796185, JF796206, JF796207, JF796208 e JF796209). Para executar o alinhamento do 2c, as sequências de referência utilizadas foram: nucleotídeos (U72696, M74852, U22896) e aminoácidos (AIW27672, AIW67583, AIW67587, AIW67523).

3.7 Sequenciamento e análise filogenética do CCoV

3.7.1 Alinhamento e árvore filogenética

O alinhamento das sequências foi realizado com o aplicativo ClustalW, versão 1.83 (THOMPSON et al. 1997). Imperfeições nos alinhamentos e artefatos presentes nas sequências foram editados minimamente usando a versão V.7.0.9.0 do aplicativo Bio-Edit (HALL, 1999). Previamente à reconstrução filogenética, foi analisado o modelo de substituição de nucleotídeos através do Modeltest. A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de *neighbor-joining*, Kimura-2 parâmetros através do programa de computador MEGA 4 (Tamura et al. 2007). As sequências obtidas foram comparadas com sequências nucleotídicas dos genes M e S de outros isolados de CCoV existentes no GenBank.

3.7.2 GenBank accession numbers

As sequências geradas nesse estudo para o Coronavirus Canino foram submetidas ao Banco de Dados *GenBank* e a elas foram atribuídos os

seguintes números de acesso (AN ou número de acesso): KR105599, KR105600, KR105601 e KR105604 para o gene M e KR105602 e KR105603 para o gene S. As sequências de referência para CCoV-I, CCoV-IIa e CCoV-IIb foram utilizadas no estudo para a construção da árvore filogenética do gene S.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção do CPV-2a e CPV-2b

Os resultados obtidos após a reação em cadeia da polimerase para CPV estão demonstrados na figura 3. Foram consideradas positivas para CPV-2a as amostras cuja amplificação resultou em um produto de 681 pb (Figura 4A). Para detecção CPV-2b, considerou-se a visualização de produtos de 427 pb (Figura 4B). Ainda foi observada a presença de co-infecção (CPV-2a e CPV-2b) nas amostras analisadas.

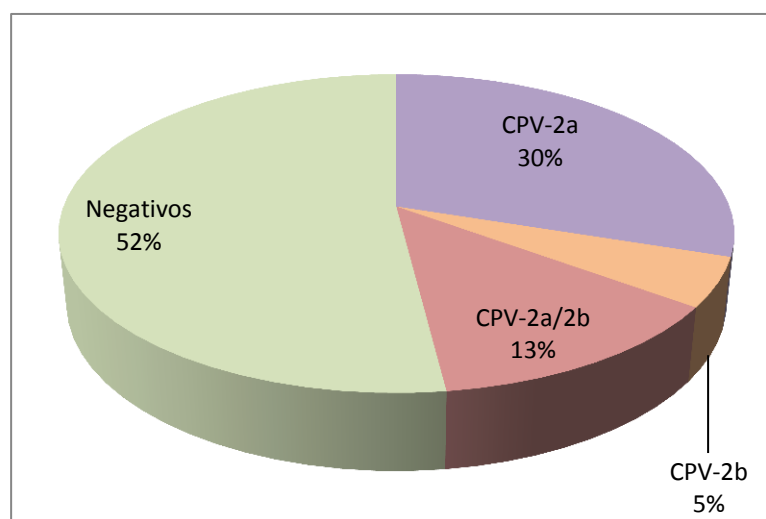


FIGURA 3 – Prevalência da infecção por CPV de acordo com as variantes (CPV-2a e CPV-2b) na população estudada.

4.2 Isolamento Viral

As amostras colhidas foram submetidas ao isolamento viral com três passagens (cegas) consecutivas. Em relação ao controle negativo foram observados efeitos citopáticos de lise celular, arredondamento celular, presença de células no sobrenadante (Fig. 5A e B). Na literatura consultada, há poucos relatos (PINTOS et al., 2011; PARK et al., 2012) do isolamento de CPV neste sistema biológico, em contrapartida o isolamento de CCoV só foi descrito usando esse tipo celular, entretanto sem nenhuma fotodocumentação dos efeitos citopáticos.

4.3 Detecção do CCoV-I e CCoV-II

Das 100 amostras colhidas, todas foram submetidas à detecção do CCoV-I e CCoV-II. Um total de 6% das amostras foram consideradas positivas quanto a presença de CCoV, com a visualização de produtos de 409 pb (Figura 6A). Ainda, 1 das 100 amostras foi considerada positiva para o CCoV-II por revelar um produto de 694 pb (Figura 6B). Com relação à co-infecção por CCoV e CPV, 2 das 100 amostras foram positivas tanto para o CCoV e quanto para o CPV (CPV-2b).

4.4 Sequenciamento e análise filogenética do CPV-2

As sequências KP694304 e KP694306 foram agrupadas, respectivamente, dentro de *clusters* contendo as sequências 2a e 2b, sugerindo que essas amostras tiveram origem nos tipos 2a e 2b. A sequência KP694305 foi agrupada entre as sequências 2c, o que confirma os resultados do alinhamento (Figura 7). O alinhamento mostra que essa sequência apresenta uma substituição de aminoácido (Asp-426 por Glu-426) o que caracteriza o tipo 2c (Figura 8) (DECARO et al., 2009; STRECK et al., 2009).

4.5 Sequenciamento e análise filogenética do CCoV

As sequências KR105602 e KR105603 foram agrupadas, respectivamente, dentro de *clusters* contendo as sequências CCoV-IIa (Figura 9).

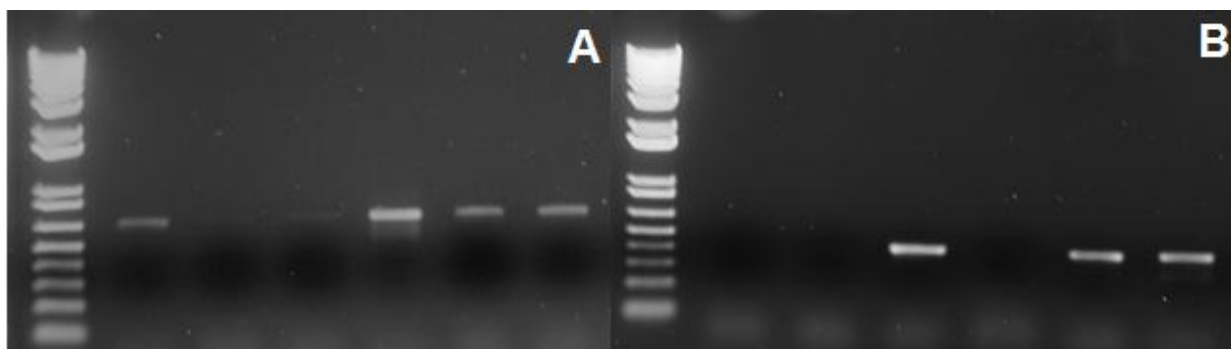
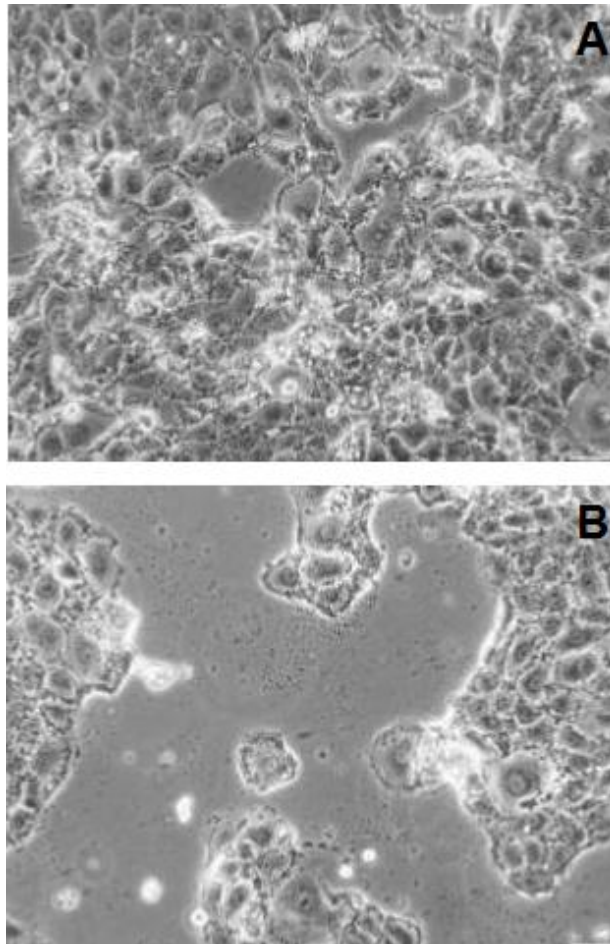


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% revelando peso molecular de 1 Kb plus. A) Produto amplificado de 681 pb, correspondente ao CPV 2a; B) Produto amplificado de 427 pb, respectivo ao CPV 2b.



FIGURAS 5 - Fotomicrografia em contraste de fase dos principais efeitos citopáticos observados no processo de isolamento viral.

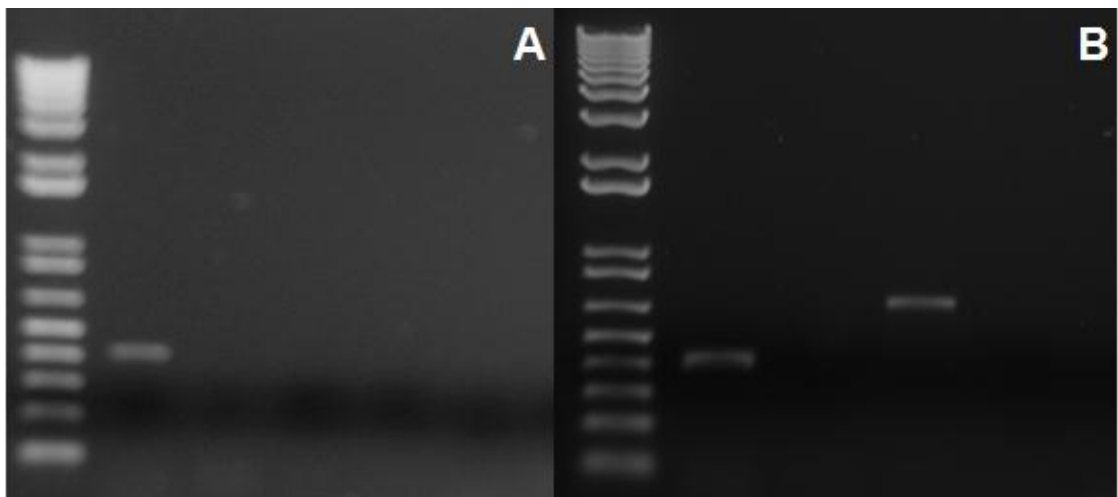


FIGURA 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% revelando peso molecular de 1 Kb plus. A) Produto amplificado de 409 pb, correspondente ao CCoV; B) Produto amplificado de 409 pb e 694 pb respectivamente, correspondente ao CCoV II.

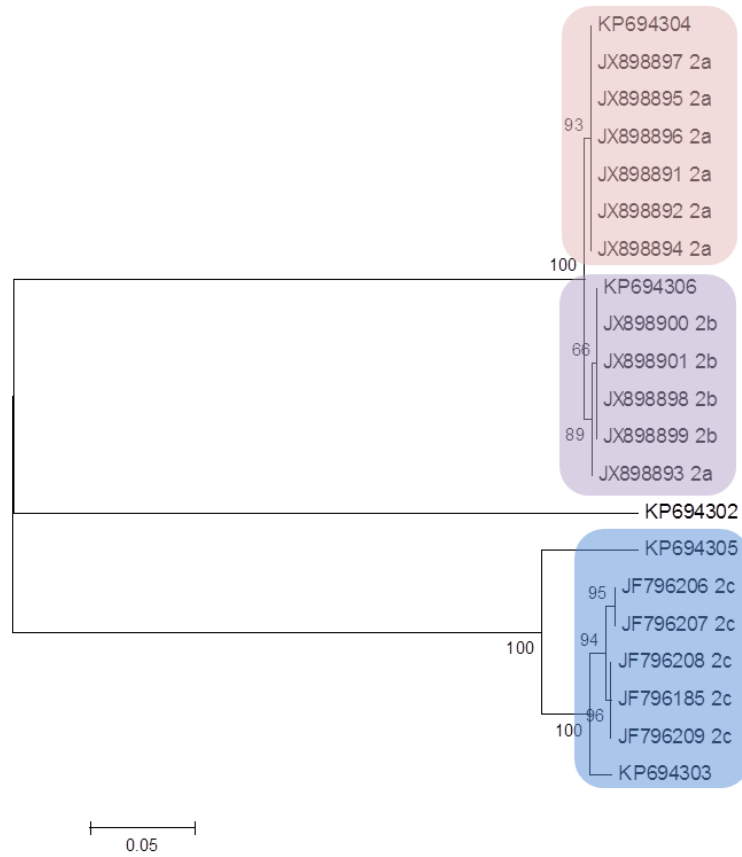


FIGURA 7 - Árvore filogenética do Parvovirus Canino utilizando o método *Neighbor-Joining*, realizada no MEGA4.

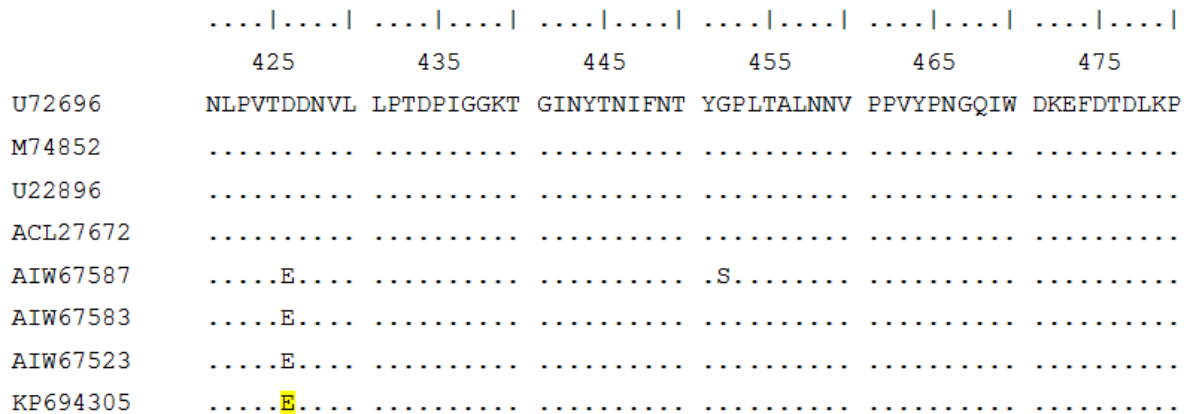


FIGURA 8 - Alinhamento das sequências 2c. Em amarelo, a mutação D-426-E. As sequências foram alinhadas utilizando o Editor de alinhamento de sequência BioEdit V.7.0.9.0

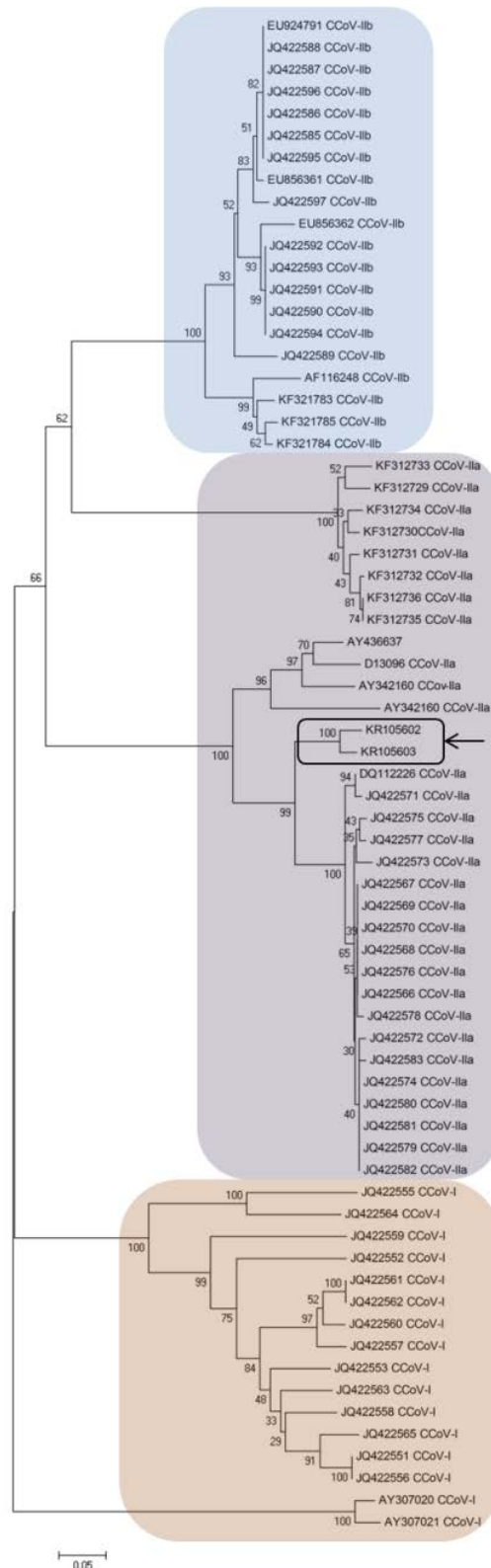


Figura 9 - Árvore filogenética do Coronavírus Canino, para o gene S utilizando o método *Neighbor-Joining*, realizada no MEGA4.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a prevalência de agentes virais em filhotes de cães com gastroenterite visto as altas taxas de morbidade e mortalidade observadas ainda após o advento da vacinação. É sabido que o coronavírus canino é frequentemente encontrado em co-infecções com bactérias, parasitos ou mesmo outros vírus como o parvovirus (CPV), vírus da cinomose canina (CDV) e o adenovírus canino (CAV) (PRATELLI et al., 2001). Embora não tenham sido detectados animais com resultados positivos para o CDV e CAV, houve um número expressivo de amostras positivas para o CPV. As co-infecções (CPV/CCoV), descritas na literatura em países da Europa Ocidental, Grécia, França, Bélgica e Brasil (DECARO et al., 2009; NTAFIS et al., 2010; ZICOLA et al.; 2012; PINTO et al., 2013) também foram confirmadas na presente pesquisa em 33,3% das amostras positivas para CCoV.

As técnicas de PCR e RT-PCR, conforme descrito na literatura, se mostraram eficazes para o diagnóstico dos agentes virais pesquisados, por serem mais específicas e sensíveis quando comparadas a outras técnicas como ELISA, HA e isolamento viral. A PCR tem sido utilizada como método de escolha para detecção do CPV em fezes de cães (MOCHIZUKI et al., 1993; DE MARI et al., 2003). Ainda, embora existam diversos métodos diagnósticos, a técnica de RT-PCR realizada diretamente das fezes se mostrou capaz de detectar menores quantidades de partículas virais de CCoV excretadas nas fezes, por maiores períodos (PRATELLI et al., 2004) e, por esse motivo foi utilizada neste estudo.

A prevalência da infecção por CPV-2a (43%) na presente pesquisa é um resultado relevante, uma vez que a variante CPV-2b tem sido descrita na literatura como a mais observada em várias regiões do Brasil a partir de 1990, segundo um estudo conduzido por Pereira et al. (2000). No Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, entre os anos de 2005 e 2007, foram observados resultados semelhantes, mostrando o subtipo CPV-2b como o mais frequente nas

amostras de fezes obtidas de cães daquela região nesse período (COSTA et al., 2005; DEZENGRINE et al., 2007). Um recente trabalho realizado no Brasil por Pinto et al. (2012), mostrou que entre os anos de 2008 e 2010 o CPV-2c já se mostrava como o tipo mais prevalente no país, presente em 78,6% das amostras positivas para CPV-2, sugerindo uma provável substituição do CPV-2a e CPV-2b na população canina brasileira, já observada em outros países. Todavia, Pérez et al. (2012) e Calderón et al. (2015) revelaram que em países da América do Sul como Uruguai e Argentina, houve o reaparecimento do subtipo 2a na população canina, que desde a emergência da variante 2c em tais países não era observado. Em 2010 Pérez et al. (2012), constataram a prevalência do CPV-2a em 38% dos casos, sendo este o primeiro relato em que a frequência da variante 2a foi maior em uma população canina em que o CPV-2c era prevalente.

Ainda, o resultado do sequenciamento e análise filogenética revelou que além dos subtipos CPV-2a e CPV-2b, o CPV-2c encontra-se presente nas amostras analisadas. O recente aparecimento da variante CPV-2c aliado ao ressurgimento do CPV-2a é evidência de uma elevada taxa de mutação para este vírus de DNA equivalente ao observado em vírus RNA (SHACKELTON et al., 2005; DECARO et al., 2007). Semelhantemente ao constatado por Castro et al. (2010) no Rio de Janeiro e por Fontana et al. (2013) no centro-oeste do país, a mutação descrita possui na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo a substituição do aminoácido Asp pelo Glu, idêntica a relatada na Itália por Buonavoglia et al. (2001). Contudo, mais amostras devem ser analisadas a fim de se investigar a ocorrência de outras mutações, como já foram descritas na América do Norte (HONG et al., 2007).

Com relação ao CCoV, a frequência observada nas amostras analisadas, ainda que menor quando comparada ao CPV, revela que tal patógeno encontra-se presente na população canina de Araçatuba-SP, sendo o agente etiológico responsável por casos de gastroenterite, uma vez que, dos 6 animais com resultados positivos, apenas 2 apresentaram co-infecção com CPV. É importante ressaltar, que em 50% dos cães que apresentaram

amplificação de RNA do vírus pela técnica de RT-PCR foram observados sinais clínicos mais severos, como anorexia, êmese e diarreia hemorrágica, diferindo dos comumente descritos na infecção por CCoV-I. Por outro lado, é sabido que as infecções ocasionadas pelo CCoV-II costumam ser mais graves, estando ou não correlacionadas a outros agentes (BUONAVOGLIA et al., 2006).

O CCoV-II foi identificado após um surto de doença clínica severa em cães (BUONAVOGLIA et al., 2006) e embora seja mais frequente na Europa e Ásia, foi recentemente descrito no Brasil (COSTA et al., 2014; PINTO et al., 2014). Vários estudos demonstram a importância do Coronavirus Canino (CCoV) como agente de diarreia em filhotes de cães, e a alta diversidade genética destes vírus tem propiciado o aparecimento de variantes altamente virulentas que causam doença sistêmica e fatal em filhotes de cães (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2009; PINTO et al., 2014). O resultado do sequenciamento e análise filogenética revelou que as amostras analisadas pertencem ao subtipo CCoV-IIa, denominado pantrópico, o que justifica o quadro clínico severo observado em metade da população avaliada.

Todas as amostras foram submetidas ao isolamento viral em monocamadas de células A72 (ATCC CRL 1542) e os resultados positivos foram confirmados por RT-PCR. A observação dos isolados em microscópio de fase invertido permitiu a visualização de efeitos citopáticos de lise celular, arredondamento celular e presença de células no sobrenadante, semelhante ao descrito por outros autores que conduziram estudos com o isolamento do CCoV nesse tipo de cultura celular (MARSILIO et al., 2002; RUGGIERI et al., 2006).

É importante ressaltar que, no início do projeto, as primeiras amostras foram submetidas aos processos de congelamento e descongelamento diversas vezes, até que as técnicas de extração do DNA e RNA estivessem bem estabelecidas e que, por esse motivo pode ter ocorrido degradação enzimática do RNA viral em tais amostras, apesar de estarem estocadas em freezer -80 °C. Ainda sabe-se que o vírus é frágil e se rompe facilmente quando

as amostras são manipuladas de maneira inadequada (NELSON E COUTO, 2010).

Ainda, as amostras foram colhidas dos pacientes atendidos no Hospital Veterinário da Unesp – Araçatuba sendo necessário um acompanhamento da rotina clínica, que nem sempre foi possível, tendo em vista a necessidade do processamento das amostras. Outro fator a se considerar é que, tratando-se de um Hospital Veterinário Universitário de uma instituição pública de ensino, o público alvo tem menor poder aquisitivo e os cães atendidos muitas vezes chegam à instituição dias após o início dos sinais clínicos, quando há uma menor quantidade de partículas virais excretadas pelas fezes, além de infecções secundárias. Nesse aspecto, a utilização de outras técnicas como a qPCR poderiam produzir um resultado diferente do observado, haja vista a maior sensibilidade quando comparada à PCR convencional.

Uma das amostras positivas para CCoV-II foi proveniente de um animal com esquema vacinal completo, o que reforça o sugerido por Decaro et al. (2009) de que há possibilidade dos subtipos de CCoV-II terem uma limitada reação cruzada com o genótipo CCoV-I presente nas vacinas comerciais disponíveis atualmente, comprometendo a eficiência vacinal.

Em todos os animais foi descrito quadro clínico de gastroenterite, salientando-se a importância do diagnóstico diferencial entre a enterite causada pelo CPV e CCoV, haja vista a similaridade observada muitas vezes na manifestação clínica de ambas as doenças. Estudos futuros são necessários para avaliar o comportamento desses agentes na população canina, bem como a eficiência das vacinas já disponíveis no mercado atualmente, uma vez que as mesmas não contem as novas variantes descritas.

6. CONCLUSÕES

O estudo permite concluir que o Parvovirus canino é o vírus mais prevalente na população canina estudada, sendo o subtipo CPV-2a o agente

etiológico responsável pela maioria dos casos de gastroenterite. Ainda, o sequenciamento parcial dos produtos de amplificação e a análise filogenética identificaram que o subtipo CPV-2c está presente nas amostras analisadas e que há similaridade das variantes observadas com as já descritas em outros países., sendo este o primeiro relato em Araçatuba – SP.

Com relação ao CCoV, o resultado do sequenciamento e análise filogenética revelou que as amostras analisadas pertencem ao subtipo CCoV-IIa (pantrópica), reforçando a importância da identificação desse agente na população canina, uma vez que as vacinas disponíveis atualmente não possuem as novas variantes e de modo que os cães do Brasil estão susceptíveis a graves surtos, já descritos em outros países.

7. REFERÊNCIAS

APPEL, M.J.G.; COOPER, B.J.; GREISEN, H.; SCOTT, F.W.; CARMICHAEL, L.E. Canine viral enteritis. Status report on corona and parvo-like viral enteritis. **Cornell Veterinary**, v.69, p.123-133, 1979.

BRANDÃO, P.E.; LOVATO, L.T.; SLHESARENKO, R.D. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, 2.ed da UFSM, 2012.

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

BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, E.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CASTAGNARO, M.; TEMPESTA, M. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.3, p. 492-494, 2006.

CALDERÓN, M.G.; ROMANUTTI, C.; WILDA, M.; D'ANTUONO, A.; KELLER, L.; GIACOMODONATO, M.N.; MATTION, N.; LA TORRE, J. Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. **Journal of Virological Methods**, v.222, p.145–149, 2015.

CARSTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Archives of Virology**, v.155, p.133-146, 2010.

CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.G.; LABARTHE, N.V.; GARCIA, R.C.N. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.1093-1098, 2010.

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

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

COSTA, E.M.; DE-CASTRO, T.X.; BOTTINO, F.O.; GARCIA, R.C.N.C. Molecular characterization of canine coronavirus strains circulating in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.168, p. 8-15, 2014.

DE MARI, K.; MAYNARD, L.; EUN, H.M.; LEBREUX, B. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. **Veterinary Record**, v. 152, p. 105-108, 2003.

DECARO, N.; MARTELLA, C.; 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 enteritidis Spain. **Journal Veterinary Medicine**, v.53, p. 468-472, 2006.

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

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; DESARIO, C.; MARI, V.; COLAIANNI, M.L.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. **Veterinary Microbiology**, v.128, p.253-260, 2008.

DECARO, N.; MARI, V.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; CAMERO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; CORDIOLI, P.; ENJUANES, L.; BUONAVOGLIA, C. Recombinant canine coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. **Journal of Virology**, v.83, p. 1532-1537, 2009.

DECARO, N.; DESARIO, C.; PARISI, A.; MARTELLA, V.; LORUSSO, A.; MICCOLUPO, A.; MARI, V.; COLAIANNI, M. L.; CAVALLI, A.; TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. **Virology**, v. 385, p.5-10, 2009.

DECARO, N.; MARI, V.; ELIA, G.; ADDIE, D.D.; CAMERO, M.; LUCENTE, M.S.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.41-46, 2010.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovirus, adenovirus, coronavirus canino e virus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p. 183-189, 2007.

ERLES, K.; TOOMEY, C.; BROOKS, H.W.; BROWNLIE, J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, v.310, n.2, p. 216-223, 2003.

ERLES, K.; BROWNLIE, J. Sequence analysis of divergent canine corona vírus strains present in a UK dog population. **Virus Research**, v.141, p.21-25, 2009.

FONTANA, D. S.; ROCHA, P. R. D.; CRUZ, R. A.S., LOPES, L. L.; MELO, A. L.T.; SILVEIRA, M. M.; AGUIAR, D. M.; PESCADOR, C. A. A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in midwestern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33(2), p.214-218, 2013.

FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal Clinical Microbiology**, v.37, p.3634-3643, 1999.

GONZÁLEZ, J.M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A.E.; ENJUANES, L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the Family *Coronaviridae*. **Archives of Virology**, v.148, n.11, p.2207-2235, 2003.

HERRWEGH, A.A.P.M.; SMEEK, I.; HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P.J.M.; GROOT, R.J. Feline Coronavirus Type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between Feline Coronavirus Type I and Canine Coronavirus. **Journal Virology**, v.72, p.4508-4514, 1998.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, M.C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J.T. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p.535–539, 2007.

HU, R.L.; HUANG, G.; ZHONG, Z.H.; XIA, X.Z; YIN, Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v.25, n.1, p. 77-84, 2001.

LAI, M.M.; HOLMES, K.V. *Coronaviridae*.the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.;

ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. P.1163-1185, 2001.

MARSILIO, F.; PRATELLI, A.; ELIA, G.; RICCI, L. Enterite da Coronavirus del cane: caratterizzazione del virus isolato. **Veterinaria**, n.2, p.59-62, 2002.

MASTERS, P.S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v.66, p. 193-292, 2006.

MOCHIZUKI, M.; HARASAWA, R.; NAKATANI, H. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.60-63, 1993.

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

NELSON, R.; COUTO, C.G. Distúrbios do trato intestinal. In: **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap.33, p. 417-447.

NTAFIS, V.; MARI, V.; DANIKA, S.; FRAGKIADAKI, E.; BUONAVOGLIA, C. An outbreak of Canine coronavirus in puppies in a Greek kennel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.320–323, 2010.

PARK, S.A.; PARK, S.Y.; SONG, C.S.; CHOI, I.S.; KIM, H.Y.; LEE, J.B.; LEE, N.H. Development of a novel vaccine against canine parvovirus infection with a clinical isolate of the type 2b strain. **Clinical Experimental Vaccine Research**, v.1, p. 70-76, 2012.

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

PINTO, L.D.; STRECK, A.F.; GONÇALVES, K.R.; SOUZA, C.K.; CORBELLINI, A.O.; CORBELLINI, L.G.; CANAL, C.W. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, v. 165, p. 29-33, 2012.

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

PEREZ, R.; BIANCHI, P.; CALLEROS, L.; FRANCIA, L., HERNANDEZ, M.; MAYA, L.; PANZERA, Y.; SOSA, K.; ZOLLER, S. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. **Veterinary Microbiology**, v.155, p.214–219, 2012.

PINTO, L.D. Detecção e Caracterização de Parvovirus Canino e Coronavírus Canino. 2013. 73f. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

PINTO, L.D.; BARROS, I.N.; BUDASZESKI, R.F.; WEBER, M.N.; MATA, H.; ANTUNES, J.R.; BOABAID, F.M.; WOUTERS, A.T.B.; DRIEMEIER, D.; BRANDÃO, P.E.; CANAL, C.W. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 659-662, 2014.

PINTOS, A.B.; LARRAMA, C.B.N.; BARATTA, E.E.R.; BARTHE, M.B.B.; RODONZ, J.R.A. Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.8, p.1436-1440, 2011.

PRATELLI, A.; MARTELA, V.; ELIA, G.; TEMPESTA, M.; GUARDA, F.; CAPUCHIO, M.T.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus, **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.48, p 385-392, 2001.

PRATELLI, A.; DECARO, N.; TINELLI, A.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; TEMPESTA, M.; CIRONE, F.; BUONAVOGLIA, C. Two Genotypes of Canine Coronavirus Simultaneously Detected in the Fecal Samples of Dogs with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p. 1797-1799, 2004.

PRATELLI, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. **Veterinary Research**, v.37, n.2, p.191-200, 2006.

RUGGIERI, A.; Di TRANI, L.; GATTO, I.; FRANCO, M.; VIGNOLO, E.; BEDINI, B.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. *Canine coronavirus* induces apoptosis in cultured cells. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p.64-72, 2007.

SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, W.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 379-384, 2005.

SOMA, T.; OHINATA, T.; ISHI, H. Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan. **Research in Veterinary Science**, v.90, p. 205-207, 2010.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p.4876-4882, 1997.

ZICOLA, A.; JOLLY, S.; MATHIJS, E.; ZIANT, D.; DECARO, N.; MARI, V.; THIRY, E. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, p. 297–300, 2012.

8. ARTIGO CIENTÍFICO

Primeiro relato e caracterização molecular do Parvovirus Canino tipo C em Araçatuba, São Paulo, Brasil¹

Flávia V. Vieira², Daniel J. Hoffmann², Deriane D. Gomes³, Wagner L. Ferreira⁴,
Silvia Helena V. Perri³, Eduardo F. Flores⁵, Tereza C. Cardoso^{3*}

ABSTRACT.- Vieira F.V., Hoffmann D.J., Ferreira W.L., Perri, S.H.V., Flores, E.F. & Cardoso T.C. 2015. **First occurrence and molecular characterization of Canine Parvovirus type C in Araçatuba, São Paulo, Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp- Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 793, CEP 16050-680, Araçatuba, SP Brasil. E-mail: tcardoso@fmva.unesp.br

Clinical and hematological findings were correlated with the diagnosis of Canine Parvovirus in naturally infected puppies. 100 stool samples were collected and subjected to polymerase chain reaction for parvovirus type 2 (CPV- 2). The amplification products were purified, sequenced and aligned using MEGA version 4.1 package. The samples analyzed were compared with CPV- 2

¹Recebido em

Aceito para publicação em

² Discente do curso de pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp – Araçatuba, SP, CEP 16050-680- Brasil.

³ Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp-Araçatuba, SP, CEP 16050-680, Brasil. * Autor para correspondência: tcardoso@fmva.unesp.br.

⁴Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp-Araçatuba, SP, CEP 16050-680, Brasil.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Santa Maria, RS, CEP 97105-000, Brasil.

existent sequences in GenBank. 48 % of the animals were positive for CPV by PCR of which 30% were positive for CPV- 2a and 5 % CPV -2b. It was still observed the presence of co-infection (CPV- 2a and CPV- 2b) by 13% samples. A pool of samples subjected to sequencing and phylogenetic analysis detected the presence of CPV- 2c variant . Anemia and leukopenia were associated with CPV infection . It was also observed that leukopenia and hypoglycemia are correlated with a worse prognosis for these animals.

INDEX TERMS: Gastroenteritis · complete blood count · CPV · PCR.

RESUMO.-[**Primeiro relato e caracterização molecular do Parvovirus Canino tipo C em Araçatuba, São Paulo, Brasil**] Alterações clínicas e laboratoriais foram correlacionadas com o diagnóstico de Parvovirose Canina em filhotes naturalmente infectados. 100 amostras de fezes foram colhidas e submetidas a reação em cadeia da polimerase para parvovirus tipo 2 (CPV-2). Os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados e alinhados com a utilização do pacote MEGA versão 4.1. As amostras analisadas foram comparadas com sequências de CPV-2 existentes no *GenBank*. 48% dos animais foram positivos para CPV por PCR dos quais 30% foram positivos para CPV-2a e 5% para CPV-2b. Ainda foi observada a presença de co-infecção (CPV-2a e CPV-2b) em 13% das amostras. Um *pool* de amostras submetido ao sequenciamento e análise filogenética detectou a presença variante CPV-2c. Anemia e leucopenia foram associadas com a infecção por CPV. Ainda foi observado que associação de leucopenia e hipoglicemia estão correlacionadas com um pior prognóstico para os animais doentes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Gastroenterite, hemograma, CPV, PCR.

INTRODUÇÃO

As enterites virais são consideradas uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em filhotes e compõem um grupo de doenças de extrema

importância na rotina clínica devido às altas taxas de morbidade e mortalidade observadas, apesar do advento da vacinação. Entre os principais agentes etiológicos estão o parvovirus canino (CPV-2), o coronavírus canino (CCoV), o rotavirus canino (CRV) e o vírus da cinomose canina (CDV).

Isolado em 1978 (Appel et al. 1979) o parvovirus canino possui destaque entre os agentes etiológicos responsáveis por gastroenterite em cães jovens, uma vez que além de possuir uma elevada frequência na população canina, possui grande resistência no ambiente, de modo que está amplamente difundido na população canina mundial na qual o vírus original foi substituído por novas variantes antigênicas denominadas CPV-2a e CPV-2b (Decaro et al. 2006). É importante considerar ainda que, uma nova variante do CPV-2, denominada CPV-2c foi descrita por Buonavoglia et al. (2001) na Itália, já havendo relatos em outros países e também no Brasil (Nakamura et al. 2004, Decaro et al. 2006, Pinto et al. 2012). Tal variante diferencia-se das demais por apresentar na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo uma substituição do aminoácido Asp pelo Glu.

Diversas técnicas são utilizadas para o diagnóstico da parvovirose canina, entre elas, a avaliação das alterações hematológicas dos animais doentes. Embora não seja suficiente para especificar o agente etiológico da gastroenterite, essa avaliação fornece informações importantes como os principais diagnósticos diferenciais a serem considerados, a resposta do paciente frente ao tratamento e prognóstico. Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar o CPV na população canina estudada além de correlacionar as alterações clínicas e hematológicas nos animais que apresentaram amplificação de DNA do vírus pela técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos clínicos. Foram colhidas 100 amostras de fezes de cães atendidos no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – SP, entre os anos de 2013 e 2014,

apresentando sinais clínicos de gastroenterite (hemorrágica ou não). No grupo experimental foram incluídos animais com até 1 ano de idade, de diferentes raças, de ambos os gêneros, com ou sem histórico prévio de vacinação. Após anamnese, os animais foram submetidos ao exame físico geral e avaliação laboratorial (hemograma). As fezes (aproximadamente 1g) colhidas com sondas e/ou por eliminação espontânea foram mantidas em freezer a -20°C até o momento de seu processamento.

Avaliação hematológica e Glicemia. O sangue colhido por venopunção de jugular no primeiro atendimento foi armazenado em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético 10 % (EDTA) para a realização do hemograma. A contagem total de células foi realizada em contador automatizado (CC 530 - CELM®, Brasil). A contagem diferencial de células de cada amostra foi obtida após a análise do esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido (Laborclin®). A glicemia foi mensurada no momento em que se procedeu a colheita do sangue, com a utilização do glicosímetro Accu-Chek Performa Nano (Accu-Chek®).

Extração do DNA viral. O DNA viral foi extraído do sobrenadante da suspensão fecal pelo método do Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) com modificações. Em tubos cônicos de 1,5 ml foram adicionados 700 µl de cada amostra e, posteriormente 500 µl do tampão Viral Lysis Buffer do Kit comercial RNA/DNA PureLink™ (Invitrogen®). Essa suspensão ficou 15 min em temperatura ambiente e após esse tempo foi centrifugada durante 5 min a 13.000 rpm, aproximadamente 7,500 x g (centrifuga 5415, Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e ao sedimento remanescente no tubo foram adicionados 500 µl do mesmo tampão e 50 µl de proteinase K (10 mg/Invitrogen®). Os tubos foram então colocados em banho-maria a 56 °C, por cerca de 1 h para desintegração de possíveis fragmentos da mucosa intestinal. Em seguida, foram adicionados 500 µl da solução de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich®) a cada amostra com agitação manual leve. Após 2 min, a 4 °C uma nova centrifugação foi realizada durante 2 min a 7,500 x g, como descrito anteriormente. Após a centrifugação, a parte superior

aquosa foi gentilmente removida e transferida a um novo tubo e adicionado 1 ml de etanol a 100% (Merck®). Após nova centrifugação por 5 min a 7,500 x g o etanol foi removido e visualizado o pellet (DNA) que foi ressuspendido e 10 µl de água ultra pura livre de RNA/DNA (Invitrogen®).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR foi conduzida em conformidade com o kit Jumpstart™ (Sigma-Aldrich) sem nenhuma modificação. Os *primers* para CPV-2a e CPV-2b foram os mesmos descritos por Buonavoglia et al. (2001) e amplificam fragmentos de 681pb e 427pb, respectivamente. Para a reação de PCR foram adicionados a tubos de 0,2 ml 12 µl do Jumpstart ReadyMix, 1 µl de cada primer (10 pmol), 1µl MgSO₄, 2,5 µl de água ultrapura e 7 µl de DNA (± 10 ng). As condições de ciclagem foram: 94 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 56 °C por 1min e 72 °C por 2 min por 34 vezes, e a extensão final 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1% em transluminador UV e documentados.

Sequenciamento Nucleotídico. Os amplicons gerados na PCR foram purificados pelo *kit* GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckingham, Reino Unido), de acordo com instruções do fabricante. Utilizou-se para o sequenciamento o BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster city, USA), cuja reação consistiu de adição de 2µL de Big Dye; 2µL do tampão Save Money 5x; 1 pmol de cada iniciador senso e antisenso em reações separadas; 1 ou 2µL de cada amostra, dependendo da intensidade da banda gerada com os produtos purificados, água ultra-pura q.s.p. para um volume final de 10µL. A solução foi aquecida a 92°C por 1 min e 30 ciclos de 96°C por 30 s; 50°C por 15 s e 60°C por 4 min, seguido de resfriamento até 4°C até retirada do termociclador. As amostras foram precipitadas utilizando 30 µL de água ultra pura livre de DNAses e 60µL de isopropanol P.A., mantidas em temperatura ambiente por 15 min, centrifugadas a 20000xG a 17°C por 25 min. O sobrenadante foi descartado e 150µL de isopropanol 75% foram adicionados. Novamente as amostras foram centrifugadas a 20000xg a 17°C por 10 min e secas. A sequência de nucleotídeos foi determinada através de um

sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, USA).

Análise Filogenética. O alinhamento das sequências foi realizado com o aplicativo ClustalW, versão 1.83 (Thompson et al. 1997). Imperfeições nos alinhamentos e artefatos presentes nas sequências foram editados minimamente usando a versão 7.01 do aplicativo Bio-Edit (Hall 1999). Previamente à reconstrução filogenética, foi analisado o modelo de substituição de nucleotídeos através do Modeltest (Posada & Crandall 1998). A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de *neighbor-joining*, Kimura-2 parâmetros através do programa de computador MEGA 4 (Tamura et al. 2007). As sequências obtidas foram comparadas com sequências nucleotídicas do gene VP2 de outros isolados de CPV existentes no GenBank . Às sequências geradas nesse estudo para o Parvovirus Canino foram atribuídos os seguintes números de acesso: KP694302, KP694303, KP694304, KP694305, KP604306. Sequências de referência foram utilizadas nesse estudo de construção de árvore filogenética sob os números de acesso para Parvovirus Canino 2a (JX898891, JX898892, JX898893, JX898894, JX898895, JX898896 e JX898897), Parvovirus Canino 2b (JX898898, JX898899, JX898900 e JX898901) e Parvovirus Canino 2c (JF796185, JF796206, JF796207, JF796208 e JF796209). Para executar o alinhamento do 2c, as sequências de referência utilizadas foram: nucleotídeos (U72696, M74852, U22896) e aminoácidos (AIW27672, AIW67583, AIW67587, AIW67523).

Análise Estatística. Utilizou-se o programa estatístico SAS[®] (Statistical Analysis System), versão 9.4. Para as alterações clínicas e laboratoriais nos animais infectados foi calculado odds ratio e intervalo de confiança de 95%. A diferença dos sinais clínicos entre os animais positivos e negativos foi calculada pelo teste exato de Fisher, enquanto a diferença entre os valores dos exames laboratoriais entre os animais que vieram à óbito e sobreviveram foi calculada pelo teste de Mann-Whitney. Para todas as comparações $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

PCR. Das 100 amostras analisadas, 48% foram positivas para CPV por PCR. Todas foram submetidas à detecção tanto do CPV-2a quanto do CPV-2b, com posterior sequenciamento e análise filogenética de um *pool* de amostras para detecção da variante CPV-2c. 30% amostras foram positivas para CPV-2a na reação de PCR, considerando a amplificação de 681 pb (Fig. 1A). Já o CPV-2b se mostrou presente em 5% das amostras analisadas, considerando a visualização de produtos de 427 pb (Fig. 1B). Ainda foi observada a presença de co-infecção (CPV-2a e CPV-2b) em 13% amostras. As amostras negativas foram agrupadas em um único grupo, utilizado como grupo controle da presente análise.

Imunização e Sinais Clínicos. Dados obtidos através dos prontuários dos animais mostraram que 56% receberam pelo menos 1 dose da vacina polivalente. Os sinais clínicos avaliados (Quadro 1) foram observados tanto no grupo de animais com resultados positivos, quanto no grupo controle e embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), pode-se sugerir que existe associação de desidratação e diarreia nos animais com gastroenterite por CPV ($p = 0,098$ e $p = 0,086$), respectivamente.

Avaliação hematológica e Glicemia. Com relação às alterações laboratoriais, a ocorrência de anemia foi estatisticamente significativa nos animais com infecção por CPV ($p < 0,05$), mostrando que há relação de tal alteração hematológica com o diagnóstico de CPV. Quanto aos demais parâmetros hematológicos, observa-se uma tendência a linfopenia e hipoproteinemia nos animais positivos quando comparados ao grupo controle ($p = 0,051$ e $p = 0,058$), respectivamente. Os valores dos exames laboratoriais das amostras colhidas no momento do primeiro atendimento do animal no hospital veterinário estão representados no quadro 2. Os valores de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e glicose foram menores nos animais que vieram à óbito devido à infecção por CPV.

Sequenciamento e análise filogenética molecular. As sequências KP694304 e KP694306 foram agrupadas, respectivamente, dentro de *clusters* contendo as sequências 2a e 2b, sugerindo que essas amostras tiveram origem nos tipos 2a e 2b. A sequência KP694305 foi agrupada entre as sequências 2c, o que confirma os resultados do alinhamento (Fig. 2). O alinhamento mostra que essa sequência apresenta uma substituição de aminoácido (Asp-426 por Glu-426) o que caracteriza o tipo 2c (Fig. 3) (Decaro et al. 2009, Streck et al. 2009).

DISCUSSÃO

Desde o seu surgimento no final de 1970, o CPV foi responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, no entanto, inicialmente a severidade das infecções foi atribuída à falta de imunidade natural contra o vírus. Após, o início da vacinação dos cães e a exposição natural à infecção promoveu imunidade satisfatória, entretanto, a doença continuou com uma alta taxa de incidência principalmente em filhotes entre 1 e 6 meses de idade (Moraes & Costa 2012). Trabalhos recentes realizados no país revelaram que 75,7% e 69,2% dos animais infectados pelo CPV estavam nessa faixa etária (Castro et al., 2011, Fontana et al., 2013). O presente estudo constatou uma incidência ainda maior nesses pacientes, uma vez que 87,5% dos animais positivos tinham entre 1 a 6 meses de idade. A ocorrência da infecção em animais mais jovens provavelmente se deve aos baixos níveis de anticorpos maternos circulantes ou ainda a um sistema imune imaturo, incapaz de obter uma resposta adequada à vacinação (Calderón et al., 2011). A interferência dos anticorpos maternos residuais que neutralizam o antígeno vacinal na primovacinação também pode explicar os casos de infecção por CPV em cães vacinados (Decaro et al., 2006).

O diagnóstico precoce e definitivo da etiologia das gastroenterites caninas torna-se essencial para o tratamento e controle da disseminação do agente etiológico, principalmente se o CPV estiver envolvido e para a alocação

adequada de cães com outras infecções gastroentéricas. Nesse aspecto, a PCR vem sendo utilizada como método eficaz para o diagnóstico de inúmeras doenças de etiologia viral. Estudos anteriores demonstram que a PCR é mais específica e sensível para a detecção de CPV em fezes de cães, quando comparada com HA, ELISA e isolamento viral (Mochizuki et al. 1993).

Sabe-se que o CPV possui afinidade pelas células de rápida divisão do intestino, da medula óssea e dos tecidos linfóides, causando necrose da cripta intestinal, diarreia intensa, leucopenia e esgotamento linfóide (Sherding 2008). Na maioria dos casos de parvovirose canina aguda, é observada leucopenia no exame hematológico, no entanto, muitas vezes tal alteração não está presente no momento do primeiro atendimento (Prittie 2004), sendo observada em 100% dos casos, entre o segundo e terceiro dia de evolução da doença (Hagiwara et al. 1984), com normalização ou tendência à leucocitose entre o quinto e oitavo dia, indicando-se, assim, o caráter agudo do processo inflamatório decorrente da infecção. Desse modo, a avaliação hematológica dos animais infectados é de grande valia para que a provável etiologia seja estabelecida e para que o tratamento seja prontamente instituído.

O presente estudo confirmou a ocorrência de leucopenia nos animais positivos para CPV, revelando ainda que a mesma foi mais severa nos animais que vieram à óbito, podendo-se inferir que a intensidade da leucopenia está relacionada ao prognóstico do animal. Além da leucopenia, a diminuição do número de neutrófilos e linfócitos, também mostrou estar relacionada com um pior prognóstico para esses animais.

É importante considerar que dos 48 animais positivos para CPV, 31,25% vieram à óbito, sendo que desses, 54% estavam hipoglicêmicos. Sabe-se que em filhotes as reservas limitadas de glicogênio, os sistemas enzimáticos imaturos e as exigências metabólicas elevadas restringem a euglicemia. Se a estes fatores somarmos a anorexia, o vômito e a diarreia, o risco de hipoglicemia aumenta consideravelmente (Savigny & Macintire 2007). Ainda, há relação direta entre hipoglicemia e sepse, uma complicação comum nos animais doentes.

Com relação aos sinais clínicos, sabe-se que a principal manifestação da parvovirose é a gastroenterite, hemorrágica ou não (Moraes & Costa 2012). Neste estudo foi observado que a ocorrência de diarreia com consequente desidratação foi um achado frequente nos animais com resultado positivo, assim, pode-se sugerir que embora não específicos tais sinais clínicos associados com as alterações hematológicas descritas anteriormente podem sugerir infecção por CPV. Ainda, considerando tais alterações, a terapia de suporte deve ser rapidamente instituída para que o equilíbrio hidro-eletrolítico seja mantido nesses filhotes.

A prevalência da infecção por CPV-2a (43%) nas amostras analisadas é um resultado expressivo, uma vez que a variante CPV-2b era descrita como a mais observada em várias regiões do Brasil a partir de 1990, segundo um estudo conduzido por Pereira et al. (2000). No Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, entre os anos de 2005 e 2007, foram observados resultados semelhantes, mostrando o subtipo CPV-2b como o mais frequente nas amostras de fezes obtidas de cães daquela região nesse período (Costa et al. 2005, Dezengrine et al. 2007). Um recente trabalho realizado no Brasil por Pinto et al. (2012), mostrou que entre os anos de 2008 e 2010 o CPV-2c já se mostrava como o tipo mais prevalente no país, presente em 78,6% das amostras positivas para CPV-2, sugerindo uma provável substituição do CPV-2a e CPV-2b na população canina brasileira, já observada em outros países. Todavia, Pérez et al. (2012) e Calderón et al. (2015) revelaram que em países da América do Sul como Uruguai e Argentina, houve o reaparecimento do subtipo 2a na população canina, que desde a emergência da variante 2c em tais países não era observado. Em 2010 Pérez et al. (2012), constataram a prevalência do CPV-2a em 38% dos casos, sendo este o primeiro relato em que a frequência da variante 2a foi maior em uma população canina em que o CPV-2c era prevalente.

Ainda, o resultado do sequenciamento e análise filogenética revelou que além dos subtipos CPV-2a e CPV-2b, o CPV-2c encontra-se presente nas amostras analisadas. O recente aparecimento da variante CPV-2c aliado ao

ressurgimento do CPV-2a é evidência de uma elevada taxa de mutação para este vírus de DNA equivalente ao observado em vírus RNA (Shackelton et al. 2005, Decaro et al. 2007). Semelhantemente ao constatado por Castro et al. (2010) no Rio de Janeiro e por Fontana et al. (2013) no centro-oeste do país, a mutação descrita é idêntica a relatada na Itália por Buonavoglia et al. (2001). Contudo, mais amostras devem ser analisadas a fim de se investigar a ocorrência de outras mutações, como já foram descritas na América do Norte (Hong et al. 2007).

CONCLUSÃO

Pode-se inferir diante do exposto, que a avaliação das alterações hematológicas aliada aos sinais clínicos, são indicadores de enterite por CPV em filhotes. Ainda, a gravidade de tais alterações permite que o prognóstico seja estabelecido, alertando o clínico da necessidade urgente de intervenção terapêutica, com um protocolo adequado. Além disso, os resultados enfatizam mudanças dinâmicas nas variantes do CPV, destacando a necessidade de estudos que permitam uma melhor compreensão da epidemiologia do vírus. Com relação ao sequenciamento e análise filogenética das amostras, embora já existam relatos da existência da variante antigênica CPV-2c no país, esse é o primeiro trabalho que mostra a ocorrência da tal estirpe no noroeste de São Paulo, reforçando a importância do diagnóstico diferencial entre as doenças de etiologia viral

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2013/24951-4).

Referências

- Appel, M.J.G., Cooper, B.J., Greisen, H., Scott, F.W. & Carmichael, L.E. 1979. Canine viral enteritis. Status report on corona and parvo-like viral enteritis. *Cornell Veterinary*. 69:123-133.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N. & Carmichael, L. 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus 2 in Italy. *Journal General Virology*. 82:3021-3025.
- Calderón M.G., Romanuttia C., D'Antuonoa A., Kellerb L., Mattiona N. & La Torre J. 2011. Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res*. 157:106-110.
- Calderón, M.G., Romanutti, C., Wilda, M., D' Antuono, A., Keller, L., Giacomodonato, M.N., Mattion, N. & La Torre, J. 2015. Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. *Journal of Virological Methods* 222:145–149
- Castro T.X., Costa E.M., Leite J.P.G., Labarthe N.V. & Cubel Garcia R.C.N. 2010. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. *Braz. J. Microbiol.* 41:1093-1098.
- Castro T.X., Costa E.M., Leite J.P., Labarthe N.V. & Cubel Garcia R.C. 2011. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 90:336-340.
- Costa, A.P., Leite, J.P.G., Labarthe, N.V. & Garcia, R.C.N.C. 2005. Genomic Typing of Canine Parvovirus Circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 Using Polymerase Chain Reaction Assay. *Veterinary Research Communications*.29:735-743.
- Decaro, N., Martella, C., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., D'aloja, D & Buonavoglia, C. 2006. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritidis Spain. *Journal Veterinary Medicine*. 53:468-472.

- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V. & Buonavoglia, C. 2007. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 25:1161-1166.
- Decaro, N., Desario, C., PARISI, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M. L., Cavalli, A., Trani, L. & Buonavoglia, C. 2009. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology*. 385:5-10.
- Dezengrini, R., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2007. Soroprevalência das infecções por parvovirus, adenovirus, coronavirus canino e virus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 37 (1): 183-189.
- Fontana, D. S., Rocha, P. R. D., Cruz, R. A.S., Lopes, L. L.; Melo, A. L.T., Silveira, M. M., Aguiar, D. M. & Pescador, C. A. (2013). A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in midwestern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(2), 214-218.
- Hagiwara, M. K., Larsson, M.H.M.A. & Pereira, D.A. 1984. Estudo das variações hematológicas na parvovirose canina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 6(2):52-55.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 41:95-98
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C. & Saliki, J.T. 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 19:535–539.
- Mochizuki, M., Harasawa, R. & Nakatani, H. 1993. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Research in Veterinary Science*. 55:60-63.
- Moraes, M.P. & Costa, P.R. 2012. Parvoviridae. In: Flores, E.F *Virologia Veterinária*. UFSM, 2 ed., Santa Maria, 1008 p.

- Nakamura, M., Ikeda, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H.T., Nguyen, N.P., Huynh, L.M., Nguyen, L.T., Nguyen, P.N., Nguyen, P.V., Nguyen, N.P. & Akashi, H. 2004. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Archives of Virology*. 149: 2261-2269.
- Perez, R., Bianchi, P., Calleros, L., Francia, L., Hernandez, M., Maya, L., Panzera, Y., Sosa & K., Zoller, S., 2012. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol.* 155, 214–219.
- Pinto, L.D., Streck, A.F., Gonçalves, K.R., Souza, C.K., Corbellini, A.O., Corbellini, L.G. & Canal, C.W. 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research*. 165:29-33.
- Posada D. & Crandall K. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Prittie, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. 2004. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 14(3):167-176
- Streck, A.F., Souza, C.K., Gonçalves, K.R., Zang, L., Pinto, L.D. & Canal, C.W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. 2009. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40:465-469.
- Savigny, M. & Macintire, D.K. 2007. Canine parvoviral enteritis. *Standards of Care: Emergence and critical care medicine*. 9(11): 1-6.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R. Truyen, W. & Holmes, E.C. 2005 High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102:379-384.
- Sherding, R.G. Virus intestinais. In: *Manual Saunders - Clínica de pequenos animais*. 2008. 3 ed. São Paulo:Roca, 2072 p.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple

sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

Legenda das figuras

Fig.1. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando peso molecular de 1 Kb plus. A) Produto amplificado 681 pb, correspondente ao CPV 2a; B) Produto amplificado de 427 pb, respectivo ao CPV 2b.

Fig.2. Árvore filogenética enraizada utilizando a sequência de nucleotídeos de um segmento do gene que codifica a proteína VP2 do capsídeo do CPV confeccionada pelo método *Neighbor-Joining*, realizada no MEGA4.

Fig.3. Alinhamento das sequências 2c. Em amarelo, a mutação D-426-E. As sequências foram alinhadas utilizando o Editor de alinhamento de sequência BioEdit V.7.0.9.0.

Quadro 1. Alterações clínicas observadas em filhotes positivos para CPV e grupo controle.

Alterações Clínicas	CPV Positivo (%)	OR	CPV Negativo (%)
Desidratação	29	2,169	19
Anorexia	46	1,605	43
Êmese	46	1,605	43
Hipertermia	10	1,082	9
Diarreia Hemorrágica	26	0,6928	29
Diarreia	21	2,204	12
Hipoglicemia	22	1,587	16
Óbito	15	3,030*	6

CPV – Parvovirus Canino; OR – odds ratio; *p<0,05.

Quadro 2. Resultado do hemograma, proteína plasmática total e glicemia no momento do primeiro atendimento dos animais que sobreviveram e vieram à óbito

Parâmetros Laboratoriais	Sobreviventes			Óbito		
	Média \pm SD	Md	Min-Max	Média \pm SD	Md	Min-Max
RBC ($5,5-8,5 \times 10^5/\mu\text{L}$)	$5,92 \pm 1,45$	5,9	2,79-10,17	$5,87 \pm 1,66$	5,63	1,92-8,17
WBC ($6,0-17,0 \times 10^3/\mu\text{L}$)	$5,69 \pm 1,41^*$	4,5	0,5-19,4	$4,66 \pm 6,15^*$	1,3	0,5-23,6
Neutrófilos ($3,0-11,5 \times 10^3/\mu\text{L}$)	$3,80 \pm 3,69$	2,28	0,24-13,52	$3,00 \pm 4,12$	0,78	0,15-12,94
Linfócitos ($1,0-4,5 \times 10^3/\mu\text{L}$)	$1,20 \pm 1,26$	0,82	0,03-7,0	$1,00 \pm 1,81$	0,43	0,07-8,5
Plaquetas ($180-400 \times 10^3/\mu\text{l}$)	220 ± 128	200	20-600	199 ± 109	160	80-420
PPT ($60-80 \text{ g/dL}$)	$60,16 \pm 10,78$	62	32-90	$58,38 \pm 9,63$	60	42-78
Glicemia ($70-110 \text{ mg/dL}$)	$79,88 \pm 22,47$	83	18-151	$68,71 \pm 33,48$	70	20-132

Valor

es de referência entre parênteses; valores da tabela são $\times 10^6$ e $\times 10^3$; SD - desvio padrão; Md - Mediana; RBC - Red blood cells; WBC - White blood cells. * $p < 0,05$.

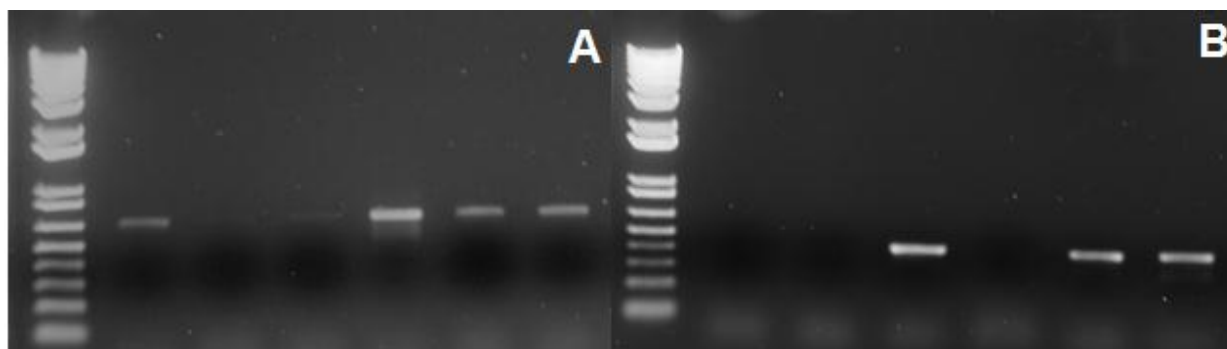


Fig.1. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando peso molecular de 1 Kb plus. A) Produto amplificado 681 pb, correspondente ao CPV 2a; B) Produto amplificado de 427 pb, respectivo ao CPV 2b.

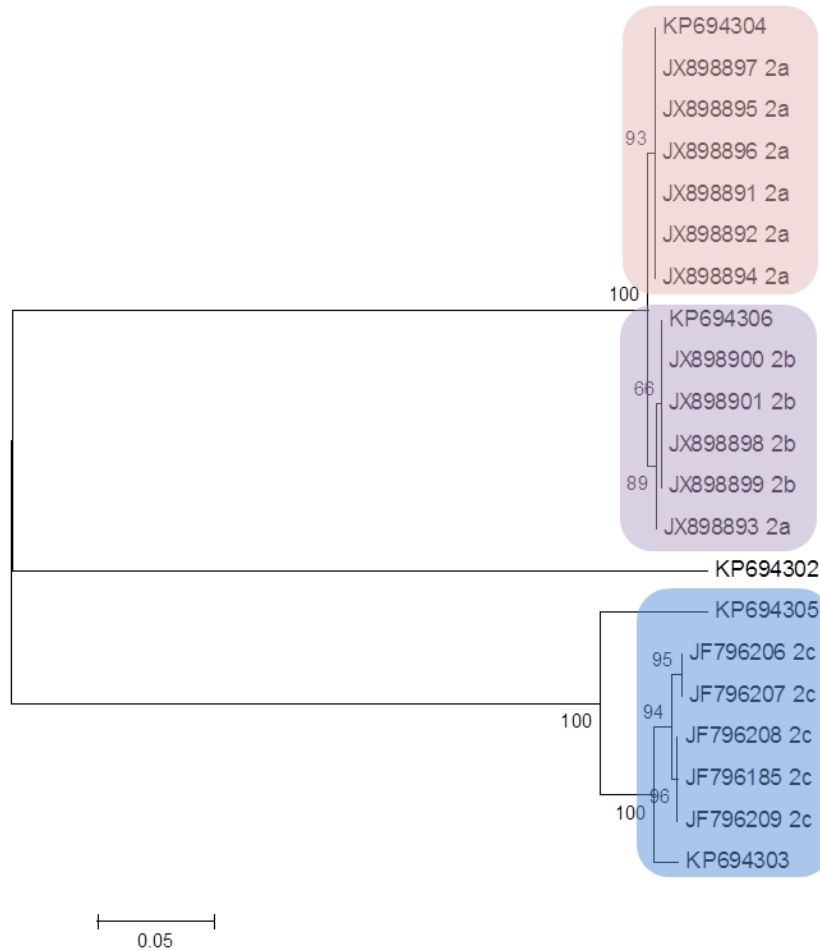


Fig.2. Árvore filogenética enraizada utilizando a sequência de nucleotídeos de um segmento do gene que codifica a proteína VP2 do capsídeo do CPV confeccionada pelo método *Neighbor-Joining*, realizada no MEGA4.

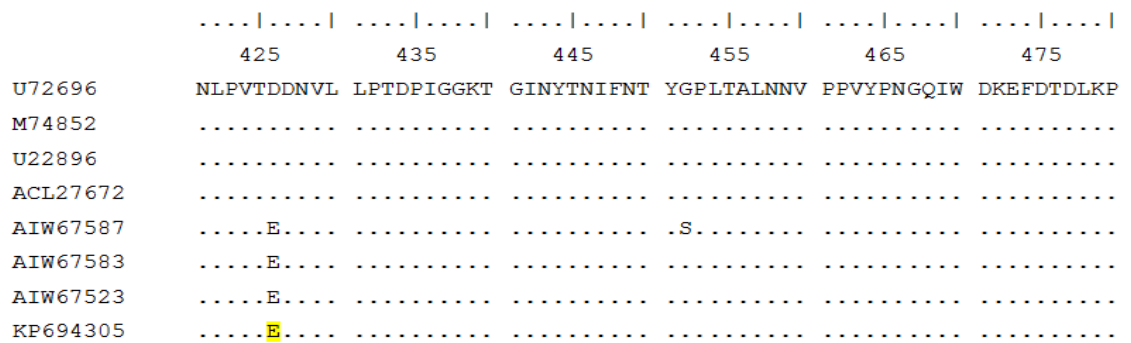


Fig.3. Alinhamento das sequências 2c. Em amarelo, a mutação D-426-E. As sequências foram alinhadas utilizando o Editor de alinhamento de sequência BioEdit V.7.0.9.0.