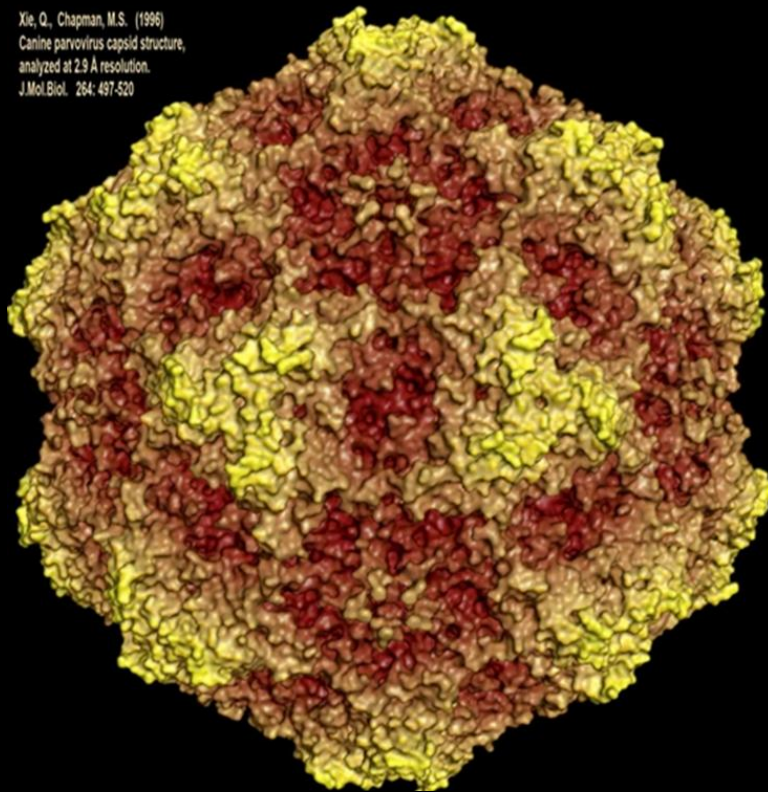


PARVOVIROSE CANINA

Xie, Q., Chapman, M.S. (1996)
Canine parvovirus capsid structure,
analyzed at 2.9 Å resolution.
J.Mol.Biol. 264: 497-520



MARIA JOÃO NOBRE DE MATOS PEREIRA VIEIRA

Tese de doutoramento em Ciências Veterinárias

2011

MARIA JOÃO NOBRE DE MATOS PEREIRA VIEIRA

PARVOVIROSE CANINA

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador - Professora Doutora Gertrude Averil Thompson

Categoria - Professora Associada com Agregação

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador - Professor Doutor Júlio Gil Vale Carvalheira

Categoria - Professor Associado com Agregação

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

“Não sou nada

Nunca serei nada

Não posso querer ser nada

À parte disso, tenho em mim todos os sonhos do mundo”

Fernando Pessoa

As conclusões apresentadas nesta dissertação são baseadas nos seguintes artigos científicos:

Decaro N, Desario C, Addie D, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C, 2007. "Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe". **Emerging Infectious Diseases** 13(8):1222-1224.

Vieira MJ, Silva E, Desario C, Decaro N, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008. "Natural co-infection with 2 parvovirus variants in dog". **Emerging Infectious Diseases** 14(4):678-679.

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Decaro N, Desario C, Muller A, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008 "Canine Parvovirus 2c infection in central Portugal". **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 20(4):488-491.

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G, 2011. "Parvovirose Canina em Portugal". **Veterinary Medicine** (Aceite para Publicação).

Vieira MJ, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G. "Canine hematologic values: reference values in young dogs and the effects of immunization with multivalent vaccines". **The Veterinary Journal** (Submetido).

Comunicações em Congressos Nacionais e Internacionais:

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Decaro N, Desario C, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2007. "Canine Parvovirus type 2c in Portugal". International Parvovirus Meeting. Bari, Itália. **(Painel)**

Vieira MJ, Silva E, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2007. "Evidence of co-infection with two subtypes of parvovirus in a pup with gastrointestinal signs". International Parvovirus Meeting. Bari, Itália. **(Painel)**

Vieira MJ, Oliveira J, Vieira AL, Silva E, Carvalheira J, Thompson G, 2008. "Parvovirus Canino em Portugal". IV Congresso Ciências Veterinárias/I Congresso Ibérico de Epidemiologia. Santarém, Portugal. **(Comunicação Oral)**

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G, 2009. "Parvovirus Canino em Portugal". V Congresso do Hospital Veterinário Montenegro. Santa Maria da Feira, Portugal. **(Painel)**

Vieira MJ, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G, 2010. "Influência da vacinação multivalente nos valores hematológicos de cães jovens". VI Congresso do Hospital Veterinário Montenegro. Santa Maria da Feira, Portugal. **(Painel)**

Vieira MJ, Silva E, Carvalheira J, Thompson G, 2010. "Emerging Canine Parvovirus: natural co-infections detection". 1st Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Lelystad, Holanda. **(Painel)**



O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas do Departamento de Clínicas Veterinárias do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto, Vila do Conde, Portugal; no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade de Medicina Veterinária de Bari, Itália e no Hospital Veterinário Clínico, Figueira da Foz, Portugal.

O Programa de Doutoramento foi realizado no contexto de uma Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/23101/2005) financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), assim como da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB).

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Portugal

Dedico esta tese a meu avô, Francisco João de Figueiredo Matos

AGRADECIMENTOS

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho...
Porque cada pessoa é única para nós,
e nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,
mas não vai só...
Levam um pouco de nós mesmos
E nos deixam um pouco de si mesmos.

Há os que levam muito,
mas não há os que não levam nada.
Há os que deixam muito,
mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela realidade da vida...
A prova tremenda de que cada um é importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

A todas essas pessoas que ao longo do meu projecto de doutoramento se cruzaram comigo, o meu sincero obrigada.

Não posso, no entanto, deixar de agradecer de uma forma especial:

À Professora Gertrude Thompson, minha orientadora, pelo seu incentivo e presença constante. Por ser para mim um modelo a seguir, tanto a nível científico, como pessoal. Os obstáculos durante este percurso não teriam sido ultrapassados sem o seu apoio, amizade e disponibilidade.

Ao Professor Júlio Carvalheira, meu co-orientador, pela infinita paciência e ajuda na organização e interpretação de dados. Conteí sempre com o seu incentivo. Todas as sugestões dadas e metodologia seguida foram importantes na progressão do trabalho.

À Eliane e à Sara pela sua amizade e apoio no trabalho de laboratório. Incentivaram-me sempre a progredir e a dar o melhor de mim nas tarefas a executar.

Aos restantes colegas de doutoramento, Alexandra e Luís, pela amizade, troca de saberes científicos e bons momentos passados no laboratório.

Às instituições e aos grupos científicos, que me apoiaram, Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), Associação para promoção e gestão de Campus Agrários de Vairão e Instituto de Ciências Agrárias de Vairão da Universidade do Porto (ACAV-ICAV), Universidade de Medicina Veterinária de Bari (Itália), Bioportugal e Intervet-Schering Portugal.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), pelo apoio financeiro prestado, que permitiu a realização deste projecto e a deslocação a Itália (Faculdade de Medicina Veterinária de Bari).

Aos colegas das várias Clínicas e Hospitais Veterinários do país que contribuíram na recolha e envio das amostras.

A toda a equipa do Hospital Veterinário Clinicão (Ana, Ana Neves, Ana Borges, David, D. Júlia, Helena, João e Rita) pelo apoio incondicional, amizade, ajuda e compreensão. Sem vocês não teria sido possível.

Aos meus AMIGOS que permitiram o equilíbrio entre a minha vida pessoal e profissional e que relevaram sempre com paciência as minhas ausências. VOCÊS SABEM QUEM SÃO !!!

À minha família:

Aos meus pais pelo apoio incondicional, por todos os valores que me inculcaram ao longo da vida. Espero nunca vos desiludir. Obrigada, Pai, por me fazeres acreditar que o trabalho e dedicação são sempre recompensados. Obrigada, Mãe, por seres um exemplo de iniciativa, energia e altruísmo.

À minha irmã Ana pelo seu exemplo de força, organização e espírito de aventura!

Ao meu cunhado João, um amigo sempre presente e disponível.

À avó Lena, a minha primeira professora.

À tia Vera pela sua amizade e incentivo pelo gosto do raciocínio matemático.

Ao meu avô Chico pelo carinho, amor e brincadeiras partilhadas. Sinto sempre a tua presença.

À minha família do Porto, os meus sogros, Maria José e Augusto, e aos meus cunhados, Margarida, Ana, Zé Miguel e Pedro, por todo o carinho sempre demonstrado.

Ao João por me ajudar a ter asas para voar. Obrigada por todo o teu amor.

Ao Joãozinho. Ao olhar para ti, tudo o resto perde importância.

Obrigada a todos por compreenderem as minhas ausências. Sem a vossa ajuda e suporte, este trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

A Parvovirose Canina é uma das doenças infecciosas mais significativas do cão. Esta doença assume grande importância em Medicina Veterinária, dada a sua ubiquidade, grande morbidade e mortalidade. Manifesta-se por uma gastroenterite hemorrágica, mais frequente em cães jovens e é causada pelo Parvovírus Canino (CPV), que é um vírus de ADN de pequenas dimensões.

O CPV apresenta características únicas no seu processo evolutivo. A capacidade deste vírus, de se adaptar a novos hospedeiros, surgiu como resultado de mutações do seu genoma, tendo ultrapassado a barreira inter-espécies, o que o coloca como um potencial agente patogénico para outras espécies. O CPV representa um dos poucos exemplos, onde o processo de transmissão vírica inter-espécies foi observada em “tempo real”. O aparecimento de vários subtipos antigénicos (que variam entre si apenas num único nucleótido), torna necessário o seu estudo e acompanhamento epidemiológico, pois o resultado das mutações pode apresentar-se com efeitos desastrosos nas populações animais não imunes. Actualmente, existem em circulação três subtipos de CPV (CPV2a, CPV2b e CPV2c). A distribuição geográfica dos três subtipos não é uniforme a nível mundial e não é totalmente conhecido o significado deste facto. Dado o seu rápido processo evolutivo, este vírus é um importante modelo de evolução para outras viroses.

O presente trabalho descreve a caracterização genética do CPV em circulação no país, determina os subtipos existentes e destaca a presença do novo subtipo CPV2c. Os resultados evidenciaram que as estirpes em circulação em Portugal são o CPV2b e o CPV2c, de uma forma equitativa, com uma tendência significativa, na zona Centro do país, para um aumento da parvovirose canina provocada pelo novo subtipo CPV2c.

Neste estudo foi não só possível identificar a presença de casos de parvovirose canina causados por co-infecção dos subtipos de CPV2b/CPV2c, como também se concluiu que estes casos ocorriam com uma elevada frequência no nosso país.

Nesta investigação, em casos de infecção pelos subtipos de vírus CPV2b, CPV2c e co-infecção CPV2b/CPV2c, não foram determinadas diferenças de apresentação clínica, alterações hematológicas, títulos de anticorpos, produção de citocinas, de prognóstico e da capacidade de detecção do vírus com o uso de testes rápidos de diagnóstico.

O controlo desta doença na população canina passa obrigatoriamente por medidas imunoproláticas, pela via da vacinação, como forma de estimular uma protecção específica. Na imunização contra CPV, a causa mais importante de “falha vacinal” em cachorros está associada à supressão da resposta imune induzida pelos anticorpos maternos. Para ultrapassar este problema, desenvolveram-se estratégias de imunização que assentam em múltiplos reforços vacinais. No entanto, é questionada a necessidade real desta sobre-estimulação imunitária, bem como as suas consequências. No presente estudo, comparou-se a eficácia de três protocolos vacinais que se diferenciaram na idade de início da primovacinação e número de reforços vacinais. Apesar das taxas de seroconversão serem superiores quando a última dose de vacina ocorreu às 16 semanas de idade, não se verificaram diferenças de títulos protectores nos diferentes protocolos. Em todos os protocolos utilizados, os animais apresentaram aos 6 meses de idade e ao fim de um ano da última vacina taxas de protecção perto dos 100%.

Existe informação escassa sobre as alterações hematológicas induzidas pela vacinação e desconhece-se o seu significado. Refere-se que as vacinas podem induzir um estado de imunossupressão, embora o reflexo clínico das alterações dela resultante continue por determinar. Neste estudo, caracterizaram-se as alterações hematológicas provocadas nos cães após aplicação de uma vacina multivalente. O objectivo deste estudo foi o de estabelecer os valores hematológicos de referência em cachorros até um ano de idade, usando um método de contagem celular automático. Verificou-se que ocorrem alterações hematológicas significativas, tais como a diminuição da contagem de glóbulos brancos em geral, de linfócitos em particular e plaquetas, mas apenas após a aplicação da primeira dose de vacina multivalente.

Actualmente existe alguma controvérsia sobre a eficácia do uso das vacinas que são baseadas na estirpe original CPV2, a qual não se encontra presentemente em circulação, assim como a protecção por esta conferida em relação aos vírus de campo heterólogos. Neste estudo, a totalidade dos animais incluídos foi vacinada com uma vacina multivalente contendo o subtipo CPV2. A titulação de anticorpos pós-vacinal determinada pelo método de inibição de hemaglutinação, utilizando como antígenos o vírus homólogo (CPV2) e os vírus heterólogos (CPV2b, CPV2c e de co-infecção CPV2b/CPV2c), demonstrou que os títulos detectados, quando foi usado o vírus homólogo, foram muito superiores aos obtidos quando usados os

vírus heterólogos e muito inferiores, quando usado a combinação de co-infecção, CPV2b/CPV2c.

A monitorização contínua dos subtipos de vírus em circulação na população canina é essencial. A sua caracterização deve ser considerada num contexto regional, de forma a melhor compreender a virulência relativa, o impacto da vacinação, a alteração das características epidemiológicas, a relação com os países vizinhos e a distribuição mundial deste agente. O presente projecto de investigação permitiu adquirir informação sobre os dados epidemiológicos do CPV em Portugal. Neste estudo foram avaliados e relacionados aspectos da epidemiologia, com a apresentação e gravidade clínica da doença e a validade dos testes rápidos de diagnóstico para identificar a doença. As alterações hematológicas, a resposta imune humoral e os factores de prognóstico da infecção por CPV foram igualmente avaliados.

SUMMARY

Canine Parvovirus enteritis is one of the most significant infectious diseases affecting dogs. Its ubiquity and high rates of morbidity and mortality have granted great importance to this disease in Veterinary Medicine. Canine parvovirus (CPV) is a small sized DNA virus responsible for hemorrhagic gastroenteritis occurring more frequently in puppies.

This virus shows some unique features in its evolutionary process. Its capacity to adapt to new hosts arose as a result of genome mutations, which led to the surpassing of the interspecies barrier and turning this virus into a potential pathogen for other species. CPV represents one of the few examples in which viral interspecies transmission was observed in “real time”. The emergence of several antigenic subtypes (differing from each other only by a single nucleotide) has emphasized the need for epidemiologic monitoring and studying of this virus, because such mutations can result in disastrous consequences in an unprotected population.

Nowadays there are three circulating subtypes of CPV (CPV2A, CPV2b and CPV2c). Geographic distribution of the three known subtypes is not uniform worldwide, and the consequences of this fact are not totally understood.

Due to its rapid evolutionary process, this virus became an important model of evolution for other viral diseases.

The present work depicts the genetic characterization of CPV subtypes circulating in the country, determines which subtypes are present and highlights the presence of the newer subtype CPV2c. The results have shown that CPV2b and CPV2c were the strains circulating in Portugal and that they are equitably distributed. They also reveal a strong tendency for the appearance of the new subtype CPV2c on the central region of the country.

In this study it was possible not only to identify parvovirus co-infections caused by CPV2b/CPV2c, but also to conclude that these cases occurred in high rates in our country.

In this investigation we found no differences in clinical presentation, hematologic findings, antibody titers, citoquine production, prognosis and detection ability of the rapid antigen tests between both CPV2b infection, CPV2c infection and CPV2b/CPV2c co-infection.

An effective control plan against this disease in the canine population must rely mainly on immunoprophylactic actions, through vaccination, as a way of

stimulating specific protection. The high mortality rates associated with parvovirus infection have laid emphasis on understanding the advantages of each vaccination program available, as well as the causes for failure of these programs. During immunization against CPV, the main cause of “vaccine failure” is the suppression of immune response due to circulating maternal antibodies. To overcome this issue, new strategies of immunization have been developed, relying on multiple booster vaccines. However, questions have been raised about this overstimulation of the immune system as well as its consequences. In this project, we compared the efficacy of three different vaccination protocols, each with different starting ages and number of booster vaccines. Although seroconversion rates have proven to be superior when the last booster vaccine occurred at 16 weeks, the differences in protection provided to the puppy was not significant. In fact, for every vaccination program used, when animals reached 6 months and one year since the last booster vaccine, protection rates approached 100%.

Hematologic changes induced by vaccination have been scarcely studied and their clinical significance is unknown. It's been proposed that vaccination induces immune suppression, but the clinical implications of this suppression are still undetermined. During this study we characterized the hematologic changes that followed the administration of a multivalent vaccine. During the course of this work we have set normal reference hematologic values for puppies younger than one year old using automated cell counting methods. We verified that important hematologic changes occur (lower white blood cell, lymphocyte and platelet counts) but only after the first multivalent vaccination dose.

A current controversy lies in the effectiveness against field strains of vaccines based on the original CPV2 strain, not circulating nowadays. All the animals included in this study were vaccinated with a multivalent vaccine containing subtype CPV2 with subsequent titration of antibodies by hemagglutination inhibition method, using as antigens the homologous virus (CPV2) and heterologous viruses (CPV2b, CPV2c and co-infection viruses CPV2b/CPV2c). The antibody titers detected when we used the homologous virus were much higher than those obtained when we used heterologous viruses, and even higher than when we used the combination of co-infection CV2b/CPV2c.

A continuous monitoring of circulating virus subtypes is essential. Their characterization should be considered in a regional context, in order to better understand its relative virulence, the impact of vaccination, the changes in

epidemiological characteristics, connection with neighboring countries and worldwide distribution of this agent.

The results of this research project allowed to acquire knowledge about the epidemiology of CPV in Portugal. We were able to evaluate and relate epidemiological findings with clinical presentation and severity, validity of rapid diagnostic tests in the detection of different variants of the virus, hematological changes, humoral immune response and prognostic factors.

ÍNDICE GERAL

Sumário.....	I
Summary.....	V
Índice.....	IX
• Geral.....	IX
• Figuras.....	XIII
• Quadros.....	XV
• Tabelas.....	XVII
• Gráficos.....	XIX
Lista de Unidades.....	XXI
Lista de Abreviaturas.....	XXIII
 Capítulo I – Parvovirose Canina - Revisão Bibliográfica.....	 1
• 1 – Agente Etiológico – Parvovírus Canino.....	3
1.1 – Taxonomia – Família <i>Parvoviridae</i>	3
1.1 – Estrutura dos Parvovírus.....	5
1.1 – Infecção e Replicação.....	12
• 2 – Evolução e Caracterização Genética do Parvovírus Canino.....	17
2.1 – Origem do Parvovírus Canino.....	17
2.2 – Emergência e Características Genéticas.....	19
2.3 – Evolução do Parvovírus Canino.....	21
2.4 – Hospedeiros do Parvovírus Canino.....	24
• 3 – Epidemiologia Mundial.....	25
3.1 – Europa.....	25
3.2 – Ásia.....	26
3.3 – Estados Unidos da América.....	26
3.4 – América do Sul.....	27
3.5 – África.....	27
3.6 – Austrália.....	27
3.7 – Portugal.....	28

• 4 – Patogenia.....	29
4.1 – Formas de Apresentação Clínica.....	30
4.2 – Patogenia da Forma Intestinal.....	31
4.3 – Transmissão.....	34
4.4 – Alterações Patológicas.....	35
• 5 – Imunidade.....	36
5.1 – Imunidade Inespecífica.....	36
5.1.1 – Cinética Leucocitária.....	36
5.1.2 – Mediadores Inflamatórios.....	37
5.2 – Imunidade Específica.....	39
5.2.1 – Humoral.....	39
5.2.2 – Local.....	39
• 6 – Incidência e Factores Predisponentes.....	40
• 7 – Sinais Clínicos.....	41
• 8 – Prognóstico.....	43
8.1 – Associação a outras infecções.....	44
8.2 – Relação entre subtipos de Parvovírus Canino.....	45
• 9 – Diagnóstico.....	45
9.1 – Diagnóstico Clínico.....	46
9.2 – Diagnóstico Laboratorial.....	47
9.2.1 – Métodos de Detecção do Parvovírus Canino.....	48
9.2.1.1 – Isolamento do vírus.....	48
9.2.1.2 – Microscopia electrónica.....	48
9.2.1.3 – Teste de Hemaglutinação.....	48
9.2.1.4 – Teste de ELISA e Teste de Imunocromatografia	49
9.2.2 – Métodos de Caracterização do Parvovírus Canino.....	50
9.2.2.1 – Anticorpos Monoclonais.....	50
9.2.2.2 – PCR Convencional e Sequenciação.....	51
9.2.2.3 – PCR com enzimas de restrição (RFLP).....	54
9.2.2.4 – PCR em Tempo Real.....	55

• 10 – Profilaxia.....	62
10.1 – Imunidade Humoral.....	62
10.1.1 – Imunidade Passiva.....	63
10.1.2 – Imunidade Activa.....	64
10.1.2.1 – Tipo de vacina.....	65
10.1.2.2 – Duração de Imunidade.....	68
10.1.2.3 – Protocolo vacinal.....	68
10.1.2.4 – Falhas vacinais.....	70
10.1.2.5 – Testes Serológicos.....	71
10.1.2.6 – Alterações Imunitárias provocadas pela vacina.....	73
10.2 – Imunidade Celular.....	75
Capítulo II – Trabalho Experimental.....	77
• 1 - Caracterização genética do Parvovírus Canino e suas implicações.....	79
1.1 – Introdução.....	81
1.1 – Resultados	81
1.2.1 – Artigo 1 - “Canine parvovirus 2c infection in central Portugal”.....	83
1.2.2 – Artigo 2 - “Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe”.....	89
1.2.3 – Artigo 3 - “Natural co-infections with 2 parvovirus variants in dogs”.....	95
1.2.4 – Artigo 4 - “Parvovirose canina em Portugal”.....	99
• 2 – Estratégias de Imunização.....	119
2.1 – Introdução.....	121
2.2 – Material e Métodos.....	122
2.3 – Resultados.....	126
2.4 – Conclusões.....	134
• 3 – Valores Hematológicos.....	139
3. 1 – Introdução.....	141
3. 2 – Resultados	141

3.2.1 – Artigo 5 - “Canine hematologic values: reference values in young dogs and the effects of immunization with multivalent vaccines”.....	143
• 4 – Caracterização da resposta imunológica à infecção natural	163
4.1 – Introdução.....	165
4.2 – Animais.....	166
4.3 – Amostras.....	167
4.4 – Detecção e Tipificação do vírus.....	167
4.5 – Imunidade Inespecífica.....	168
4.5.1 – Valores Hematológicos.....	168
4.5.2 – Citocinas.....	173
4.6 – Imunidade Específica.....	174
4.6.1 – Titulação de anticorpos.....	174
4.7 – Conclusões.....	178
• 5 – Pesquisa de reservatórios de CPV	181
5.1 – Introdução.....	183
5.2 – Material e Métodos.....	183
5.3 – Resultados.....	184
5.4 – Conclusões.....	184
Capítulo III – Conclusões e Perspectivas Futuras	187
Capítulo IV - Referências Bibliográficas	197
Capítulo V – Anexos	219
Anexo I.....	221
Anexo II.....	227

ÍNDICE FIGURAS

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

Figura 1	Esquema da estrutura do Parvovírus Canino-----	5
Figura 2	Representação esquemática da proteína VP2-----	6
Figura 3	Estrutura do Parvovírus Canino por cristalografia de Rx-----	6
Figura 4	Cristalografia de Rx: arranjo topográfico do CPV -----	7
Figura 5	Sequência nucleotídica do genoma do Parvovírus Humano B19---	8
Figura 6	Esquema da estratégia de tradução genética do CPV-----	9
Figura 7	Diagrama da estrutura da ligação do ssADN à cápside-----	11
Figura 8	Representação dos mecanismos de entrada na célula pelo CPV---	14
Figura 9	Esquema da replicação segundo o modelo <i>Rolling Hairpin</i> -----	15
Figura 10	Esquema do ciclo de replicação do CPV-----	16
Figura 11	Relações filogenéticas entre os parvovírus dos carnívoros-----	18
Figura 12	Representação do gene que codifica a proteína estrutural VP2---	20
Figura 13	Representação esquemática da evolução do CPV-----	22
Figura 14	Modelo de evolução genotípica do CPV-----	23
Figura 15	Distribuição geográfica dos subtipos de CPV na Europa-----	26
Figura 16	Patogenia da forma intestinal de parvovirose canina-----	32
Figura 17	Relação da quantidade de vírus no sangue e nas fezes nos primeiros dias pós-infecção-----	33
Figura 18	Patogenia da diarreia nos casos de enterite por CPV representada ao nível das vilosidades intestinais-----	36
Figura 19	Comparação da resposta imune humoral após a administração de uma vacina inactivada e de uma vacina viva modificada-----	66
Figura 20	Esquema da variação da concentração de anticorpos de origem materna ao longo de vacinações sucessivas-----	71

ÍNDICE QUADROS

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

Quadro 1	Taxonomia da subfamília Parvovirinae-----	4
Quadro 2	Reactividade dos anticorpos monoclonais aos diferentes subtipos de CPV-----	51
Quadro 3	Variações dos aminoácidos da proteína VP2 nos subtipos de CPV e FPV-----	52
Quadro 4	Sequência de primers para detecção de CPV por PCR Convencional-----	53
Quadro 5	Tipos de restrição por PCR-RLFP (<i>Mbol</i> I) dos diferentes subtipos de CPV-----	54
Quadro 6	Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) na detecção genérica do CPV- -----	57
Quadro 7	Primers usados na detecção genérica de CPV por RealT-PCR com SyberGreen-----	57
Quadro 8	Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para identificação do subtipo de CPV (sonda tipo 2a/2b)-----	59
Quadro 9	Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para identificação do subtipo de CPV (sonda tipo 2b/2c)-----	59
Quadro 10	Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para diferenciar a estirpe vacinal (CPV2) das estirpes de campo de CPV-----	60
Quadro 11	Resumo dos resultados do RealT-PCR de acordo com os subtipos de CPV-----	61
Quadro 12	Comparação dos tipos de vacinas disponíveis para a imunização activa de cães contra enterite por CPV-----	67
Quadro 13	Recomendações da vacinação canina – 2006 AAHA-----	70

Capítulo II – Estratégias de Imunização

Quadro 1	Critérios de inclusão de animais no estudo-----	122
Quadro 2	Descrição dos três protocolos usados no estudo-----	124

Capítulo IV – Caracterização da Resposta Imunológica

Quadro 1	Resultados da genotipagem molecular das estirpes de CPV, resultado do teste rápido (ELISA) e prognóstico, nos animais com infecção por CPV-----	168
Quadro 2	Doseamento da IL10 e INF- γ em animais com infecção por CPV-----	173

Capítulo V – Anexo 2

Quadro 1	Resultado da titulação de anticorpos por técnicas de IHA, usando como antigénios os vírus CPV2, CPV2b e CPV2c-----	227
----------	--	-----

ÍNDICE TABELAS**Capítulo II – Estratégias de imunização**

Tabela 1	Comparação entre as médias ajustadas de anticorpos para o modelo ($Y = \text{média} + \text{visita} + \text{protocolo} + \text{vírus (protocolo)} + e$)-----	127
Tabela 2	Médias geométricas obtidas nos três protocolos, referentes ao dia 1 de amostragem (anticorpos maternos) de acordo com o vírus usado no teste de IHA--	129
Tabela 3	Percentagem de seroconversão em cada protocolo, em relação ao tipo de vírus usado no teste de IHA-----	129
Tabela 4	Percentagem de protecção em cada protocolo, por vírus usado no teste de IHA até aos 6 meses de idade-----	132
Tabela 5	Percentagem de protecção em cada protocolo, por vírus usado no teste de IHA a partir dos 6 meses de idade-----	133

Capítulo IV – Caracterização da Resposta Imunológica

Tabela 1	Comparação entre as médias ajustadas para o modelo ($y = \text{média} + \text{dia de internamento} + \text{vírus (dia)} + e$), por dia de internamento, em animais com infecção por CPV-----	176
Tabela 2	Comparação entre as médias ajustadas para o modelo ($y = \text{média} + \text{dia de internamento} + \text{vírus (dia)} + e$), por dia de internamento, em animais com infecção por CPV2b e CPV2c-----	177

Capítulo V – Anexo 1

Tabela 1	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação A, utilizando o vírus CPV2-----	221
Tabela 2	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação A, utilizando o vírus CPV2b-----	221
Tabela 3	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação A, utilizando o vírus CPV2c-----	222

Tabela 4	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação A, utilizando co-infecção CPV2b/2c-----	222
Tabela 5	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2-----	223
Tabela 6	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2b-----	223
Tabela 7	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2c-----	224
Tabela 8	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando co-infecção de CPV2b/2c-----	224
Tabela 9	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando o vírus CPV2-----	225
Tabela 10	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando o vírus CPV2b-----	225
Tabela 11	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando o vírus CPV2c-----	226
Tabela 12	Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando co-infecção 2b//2c-----	226

ÍNDICE GRÁFICOS

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

Gráfico 1	Tipificação das amostras fecais de animais com gastroenterite por CPV em Portugal-----	28
Gráfico 2	Distribuição relativa dos subtipos de CPV pelas diferentes zonas de Portugal-----	29

Capítulo II – Estratégias de Imunização

Gráfico 1	Evolução ao longo do tempo das médias geométricas dos títulos de anticorpos dos animais do protocolo A, de acordo com o antigénio usado nos testes de IHA-----	127
Gráfico 2	Evolução ao longo do tempo das médias geométricas dos títulos de anticorpos dos animais do protocolo B, de acordo com o antigénio usado nos testes de IHA-----	128
Gráfico 3	Evolução ao longo do tempo das médias geométricas dos títulos de anticorpos dos animais do protocolo C, de acordo com o antigénio usado nos testes de IHA-----	128
Gráfico 4	Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano, de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus CPV2-----	130
Gráfico 5	Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano, de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus CPV2b-----	130
Gráfico 6	Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano, de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus CPV2c-----	131
Gráfico 7	Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano, de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus co-infecção CPV2b/2c-----	131

Capítulo IV – Caracterização da Resposta Imunológica

Gráfico 1	Contagem de WBC, de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos dias de internamento-----	169
Gráfico 2	Relação entre a percentagem de animais com leucopénia (ligeira ou severa) e a percentagem de animais com contagem WBC normal, ao longo do tempo de internamento-----	170
Gráfico 3	Contagem total de Gra, de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos dias de internamento-----	170
Gráfico 4	Relação entre a percentagem de animais com granulocitopénia e a percentagem de animais com contagem de Gra normal, ao longo do tempo-----	171
Gráfico 5	Contagem total de Linf, de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos dias de internamento-----	171
Gráfico 6	Contagem de RBC, de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos dias de internamento-----	172
Gráfico 7	Relação entre a percentagem de animais com anemia e a percentagem de animais com contagem de RBC normal, ao longo do tempo-----	172
Gráfico 8	Evolução ao longo dos dias de internamento do título de anticorpos, usando como antigénio nos testes de IHA os vírus CPV2, CPV2b e CPV 2c-----	176
Gráfico 9	Evolução ao longo dos dias de internamento, dos animais com infecção pela estirpe CPV2b, do título de anticorpos, usando como antigénio nos testes de IHA os vírus CPV2, CPV2b e CPV 2c-----	177
Gráfico 10	Evolução ao longo dos dias de internamento, dos animais com infecção pela estirpe CPV2c, do título de anticorpos, usando como antigénio nos testes de IHA os vírus CPV2, CPV2b e CPV 2c-----	177

LISTA DE UNIDADES INTERNACIONAIS

%	Percentagem
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
Å	Angstrong
bp	Par de bases
fL	Fentolitro
g	Grama
h	Hora
Kb	Quilo Base
KDa	Quilo Dalton
L	Litro
Min	Minuto
nm	Nanómetro
° C	Grau Celsius
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogénio iónico
Seg	Segundo

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

Ac	Anticorpo
Ag	Antigénio
ARDS	Síndrome de stress respiratório agudo
CAV-2	Adenovírus canino tipo 2
CCoV	Coronavírus canino
CDV	Vírus da Esgana
CID	Coagulação intravascular disseminada
CPI	Vírus da parainfluenza canina
CPV	Parvovírus canino
CPV2	Parvovírus canino subtipo 2 (original)
CPV2a	Parvovírus canino subtipo 2a
CPV2b	Parvovírus canino subtipo 2b
CPV2b/2c	Co-infecção com subtipos CPV2b e CPV2c
CPV2c	Parvovírus canino subtipo 2c
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
Ex:	Exemplo
Fase S	Fase de síntese do ciclo celular
FPV	Vírus da Panleucopénia Felina
Gra	Granulócitos
HA	Hemaglutinação
ICTV	“International Committee on Taxonomy of Virus”
IF	Imunofluorescência
Ig	Imunoglobulina
IHA	Inibição de Hemaglutinação
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
INF	Interferão
Mabs	Anticorpos monoclonais
MCH	Hemoglobina corpuscular média

MCV	Volume corpuscular médio
MEV	Vírus da enterite da Marta
MGB	“Minor groove binding”
NLS	Sequência de Localização Nuclear
NPC	Complexo poro nuclear
NS	Proteína não estrutural
ORF	Região de Leitura -“Open Reading Frame”
P (valor P)	Probabilidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Hematócrito
PI	Pós-infecção
PLA2	Fosfolipase A2
PLT	Plaqueta
ProtCR	Proteína C reactiva
RBC	Eritrócitos
RealT-PCR	Reacção em cadeia da polimerase em tempo real
RFLP	“Restriction fragment length polymorphism”
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RPV	Parvovírus do Guaxinin
RX	Raio X
SAA	Proteína amilóide A
SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistémica
Spp.	Espécie
ssADN	ADN de cadeia simples
Tfr	Receptor da Transferrina
TNF	Factor de necrose tumoral
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
VP	Proteína Viral
WBC	Leucócitos
α -1AG	α - 1 glicoproteína

CAPÍTULO I – PARVOVIROSE CANINA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde os finais dos anos 70 que a enterite vírica causada pelo Parvovírus Canino (CPV) é uma das principais causas de diarreia infecciosa em cães jovens (McCaw e Hoskins, 2006). Esta doença apresenta como sinais clínicos mais frequentes a presença de anorexia, vômito e diarreia hemorrágica e está associada a elevada mortalidade e morbidade na população canina (Prittie, 2004).

1 – AGENTE ETIOLÓGICO – PARVOVÍRUS CANINO

1.1 - Taxonomia - Família *Parvoviridae*

Os *Parvoviridae* são vírus que infectam uma gama muito ampla de hospedeiros naturais, nomeadamente humanos, macacos, suínos, cães, gatos, martas, ratos, entre outros. Estes vírus podem originar doenças graves, especialmente nos indivíduos jovens das espécies que infectam (Govindasamy et al., 2003).

A família *Parvoviridae* engloba os vírus de ADN (ácido desoxirribonucléico) mais pequenos e contém duas subfamílias:

- *Parvovirinae*, que infecta animais vertebrados e inclui cinco géneros, respectivamente:
 - *Dependovirus* - dependem de um adenovírus ou de um herpesvírus para que se possam replicar. Apesar de conseguirem infectar o hospedeiro de forma eficiente, não conseguem completar a replicação sem a intervenção de outro vírus.
 - *Erythrovirus* - necessitam da célula na fase S do ciclo celular para a replicação do seu ADN.
 - *Parvovirus* - tal como os *Erythrovirus*, a replicação do seu material genético está dependente da fase S do ciclo celular.
 - *Bocavirus*
 - *Amdovirus*
- *Densovirinae*, que só afecta os animais invertebrados (Vihinen-Ranta et al., 2004).

De acordo com o “International Committee on taxonomy of virus (ICTV)”, a taxonomia da subfamília *Parvovirinae* rege-se pela classificação representada no Quadro 1.

Subfamília <i>Parvovirinae</i>	
Género	Espécie
<i>Parvovírus</i>	➔ Vírus da Panleucopenia Felina • Subtipo Parvovírus Canino (CPV) • Subtipo Vírus da Panleucopenia (FPV) • Subtipo Vírus da enterite da Marta (MEV) • Subtipo Parvovírus do Guaxinin (RPV) ➔ Parvovírus da Galinha ➔ Parvovírus H1 ➔ Parvovírus HB ➔ Vírus da ratazana Kilham ➔ Parvovírus dos Leporídeos ➔ Vírus Lull ➔ Minute Vírus do Ratinho ➔ Parvovírus do Rato ➔ Parvovírus do Porco ➔ Parvovírus RT ➔ Vírus tumoral X
<i>Dependovírus</i>	➔ Vírus adeno-associado (1-5) ➔ Vírus adeno-associado das aves ➔ Vírus adeno-associado dos bovinos ➔ Vírus adeno-associado dos caninos ➔ Vírus adeno-associado dos equinos ➔ Vírus adeno-associados dos ovinos ➔ Parvovírus dos patos ➔ Parvovírus dos gansos
<i>Erythrovírus</i>	➔ Parvovírus humano B19 ➔ Parvovírus do macaco Rhesus ➔ Parvovírus do macaco Cauda de porco ➔ Parvovírus dos Símios
<i>Bocavírus</i>	➔ Parvovírus Bovino ➔ Minute Vírus Canino ou Parvovírus Canino Tipo 1
<i>Amdovírus</i>	➔ Vírus da doença Aleutian da Marta

Quadro 1: Taxonomia da subfamília *Parvovirinae*. ICTV (<http://ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>) e ICTVdb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>, Acesso 28.08.2010).

O CPV é um membro do subgrupo parvovírus felino (FPV) e é classificado como um parvovírus autônomo da família *Parvoviridae* (gênero *parvovirus*, subfamília *parvovirinae*).

1.2 - Estrutura dos Parvovírus

Os parvovírus são um grupo de vírus de ADN que infecta células eucariotas. Estes vírus têm sido isolados a partir de uma variedade de hospedeiros, mas as suas propriedades são muito similares (Paradiso et al., 1982).

O CPV é um vírus de cadeia simples de ADN (polaridade negativa), com cerca de 5 kb (quilobases), de pequenas dimensões e sem envelope. Possui uma cápside proteica, icosaédrica e com 26 nm de diâmetro (Figura 1) (Parker e Parrish, 1997).

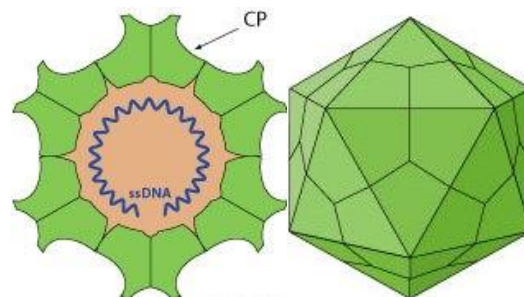


Figura1: Esquema da estrutura do Parvovírus Canino.

Legenda: CP- Cápside; ssADN – cadeia simples de ADN

http://expasy.org/viralzone/all_by_species/199.html).

Cápside

A estrutura da cápside do CPV foi determinada por cristalografia de Raio X (Rx), o que permitiu uma abordagem tridimensional à partícula vírica (Tsao et al., 1991). Esta é uma partícula esférica formada a partir do arranjo de proteínas víricas (VP), que estão repetidas em cerca de 60 cópias, formando uma estrutura icosaédrica. Estas proteínas estruturais, designadas por VP1, VP2 e VP3, englobam o genoma do vírus na sua totalidade. Estas proteínas diferem apenas na sua porção inicial (amino-terminal), ou em modificações que ocorrem após a tradução (Simpson et al., 2002).

A proteína com maiores dimensões é a VP1 (83 KDa) e encontra-se em menor quantidade na cápside (Paradiso et al., 1982). A VP1 possui um domínio adicional N-terminal de 143 aminoácidos.

A VP2 (64KDa) é a constituinte principal da cápside (Turiso et al., 1992). A estrutura secundária da proteína VP2 é composta por oito filamentos com disposição antiparalela em forma de folha tipo beta (cadeias polipeptídeas associam-se, formando uma estrutura achatada e rígida) (Tsao et al., 1991; Govindasamy et al., 2003). Dois terços da sequência polipeptídica formam ansas (Figura 2) que se inserem entre os filamentos da folha tipo beta (Govindasamy et al., 2003; Vihinen-Ranta et al., 2004).

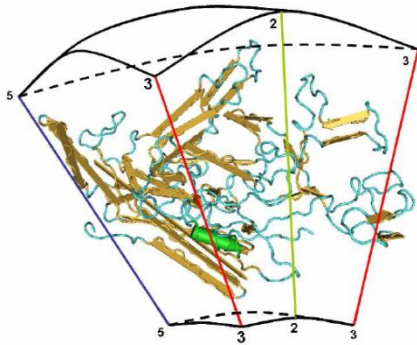


Figura 2: Representação esquemática da proteína VP2. Os números representam os eixos de simetria da cápside (Adaptado de Streck, 2009).

Essas ansas formam estruturas elaboradas à superfície da cápside, resultando em grandes protusões tri-espiculadas (espigões), com 22 angstrom (Å) nos/ou rodeando os eixos icosaédricos de tripla simetria. Outras estruturas proeminentes da cápside incluem uma depressão circular de 15 Å (*Canyon*) que rodeia a zona de pentassimetria e uma depressão também com 15 Å (*Dimple*) que atravessa os eixos de dupla simetria da estrutura icosaédrica (Figura 3) (Parker e Parrish, 1997; Govindasamy et al., 2003; Hueffer e Parrish, 2003).

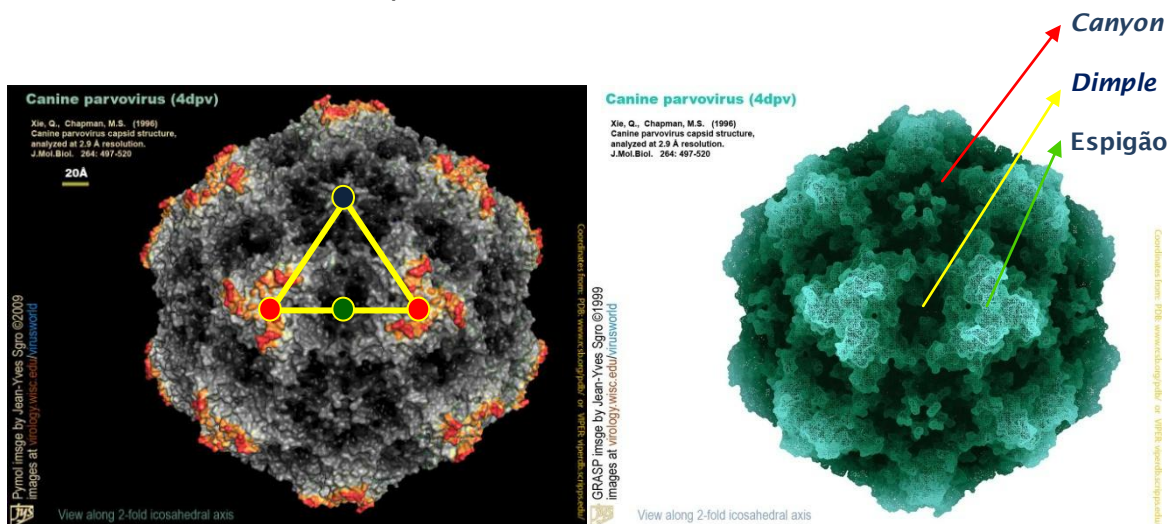


Figura 3: Visualização da estrutura do CPV usando técnicas de cristalografia de Rx. Legenda: Círculo azul – região de pentassimetria; Círculo vermelho - região de 3 eixos de simetria; Círculo verde – região de dupla simetria (Adaptado de Virus World - Xie e Chapman, 1996; www.virology.wisc.edu/virusworld).

A terceira proteína, denominada VP3, com 63 kDa, é produzida pela clivagem enzimática de 18 a 20 aminoácidos da porção N-Terminal da VP2 e só se encontra nos viriões. Assim, nas partículas infecciosas, algumas VP2 são clivadas a VP3.

Cada cápside completa possui 60 cópias de uma combinação de VP2 e VP3 (54 a 56) e contém cerca de 5 a 6 cópias da proteína VP1 (Park et al., 2007; Turiso et al., 1992). As estruturas da cápside evidenciadas por cristalografia de Rx permitiram ilustrar o arranjo topográfico deste vírus e construir de forma bidimensional mapas de distribuição dos resíduos de aminoácidos que constituem a superfície vírica (*“roadmap”*). Estes mapas demonstraram ser de grande utilidade ao relacionar as alterações genómicas com alterações na estrutura dos aminoácidos da cápside vírica e na identificação de epítopes de superfície (Figura 4), apresentando também grande utilidade no estudo do processo evolutivo do CPV (Carmichael, 2005).

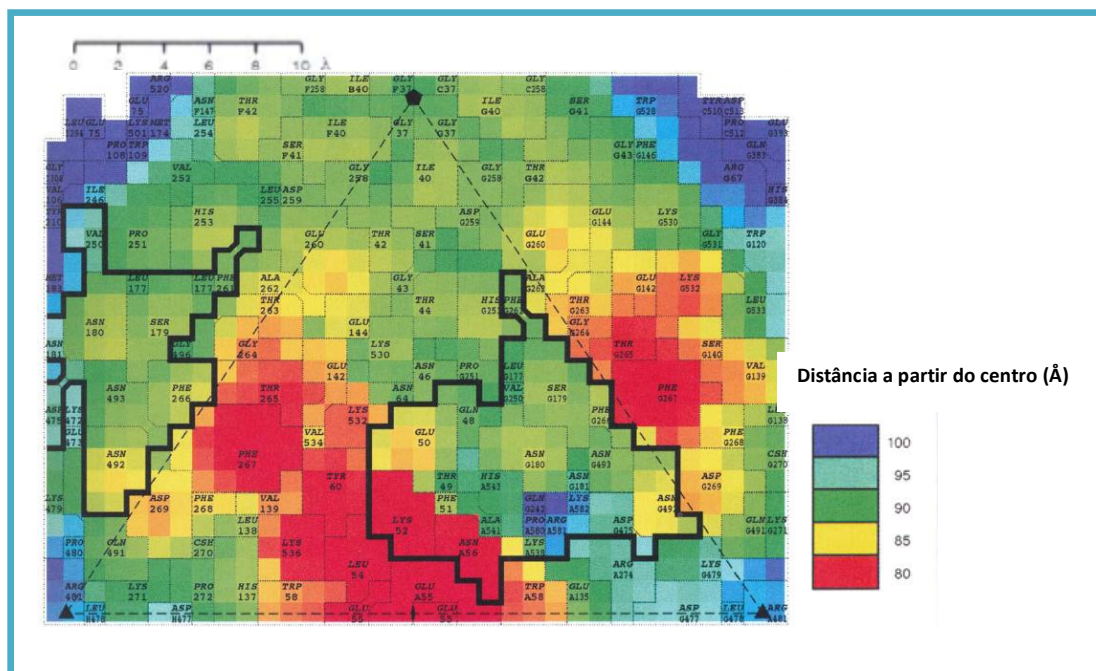


Figura 4: Cristalografia de Rx: arranjo topográfico do CPV (mapa de distribuição dos resíduos de aminoácidos que constituem a superfície vírica). Projecção da superfície interna da cápside vista a partir do centro do vírus. A unidade triangular é uma das 60 unidades equivalentes que constituem a cápside. Como a cápside proteica não é triangular, os constituintes de equivalentes de simetria são demonstrados. Em particular, os resíduos com números precedidos da letra G demonstram uma porção da proteína contida perto zona do eixo de pentassimetria. Os eixos de simetria dupla, tripla e quintúpla estão representados como uma elipse, dois triângulos ou um pentágono, respectivamente, no perímetro da área triangular. A superfície interna da cápside é projectada para o exterior ao longo do eixo de dupla simetria e está colorida de acordo com a distância até ao

centro do vírus. Todos os resíduos que se aproximam do ADN a uma distância inferior a 3,8 (Å) estão representados numa linha de cor preta e mais espessa (*pegada de ADN*) (Adaptado de Chapman e Rossmann, 1995).

Genoma

O genoma do CPV é constituído por ADN de cadeia simples (ssADN) de polaridade negativa. A sua extensão é de cerca de 5,0 kilobases (kb) (Shackelton et al., 2005). As suas extremidades (3' e 5') são compostas por um conjunto variável de sequências palindrômicas que emparelham entre si, induzindo a formação de estruturas secundárias em gancho. Estas estruturas, principalmente as localizadas na extremidade 3', participam no processo de replicação vírica (apresentam a função de “*primers*” - iniciadores), favorecem a encapsidação dos novos viriões formados e mantêm a integridade da porção terminal do genoma (Figura 5) (Shackelton et al., 2005; Streck, 2009).

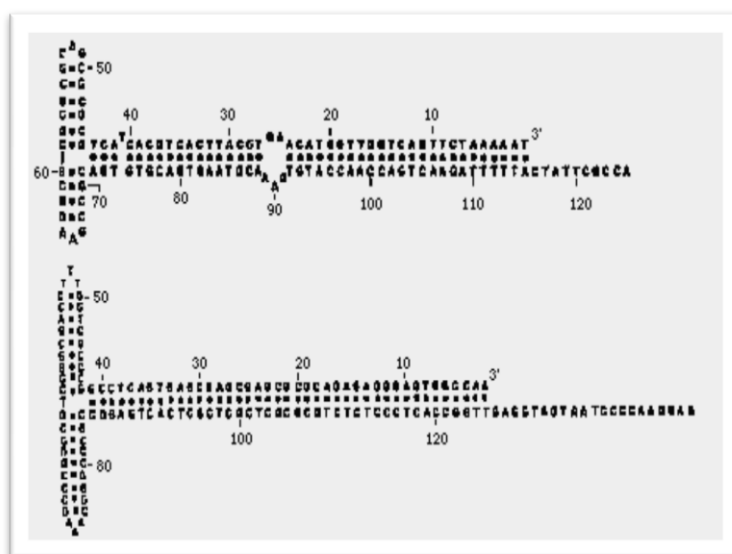


Figura 5: Sequência nucleotídica do genoma do Parvovírus Humano B19. Estrutura em gancho e sequências palindrômicas (Adaptado de Human Virology at Stanford www.tulane.edu/ridmsander/www/335/Parvoviruses.html).

Na porção interna do genoma, são encontradas duas extensas regiões de leitura (“Open Reading Frame” – ORF), situadas de cada um dos lados, sem se sobreporem (Figura 6). Uma destas regiões (porção 3') codifica duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e a outra região (porção 5') codifica as proteínas da cápside VP1 e VP2 (Shackelton, 2005).

Assim, o vírus possui dois genes, mas por “splicing” alternativo do seu mRNA, origina diferentes proteínas (Figura 6). Estes dois genes são iniciados a partir de

diferentes promotores (Reed et al., 1988). O promotor das proteínas não estruturais é o P4 e o das proteínas estruturais é o P38 (Spitzer et al., 1997; Wang, et al., 1998).

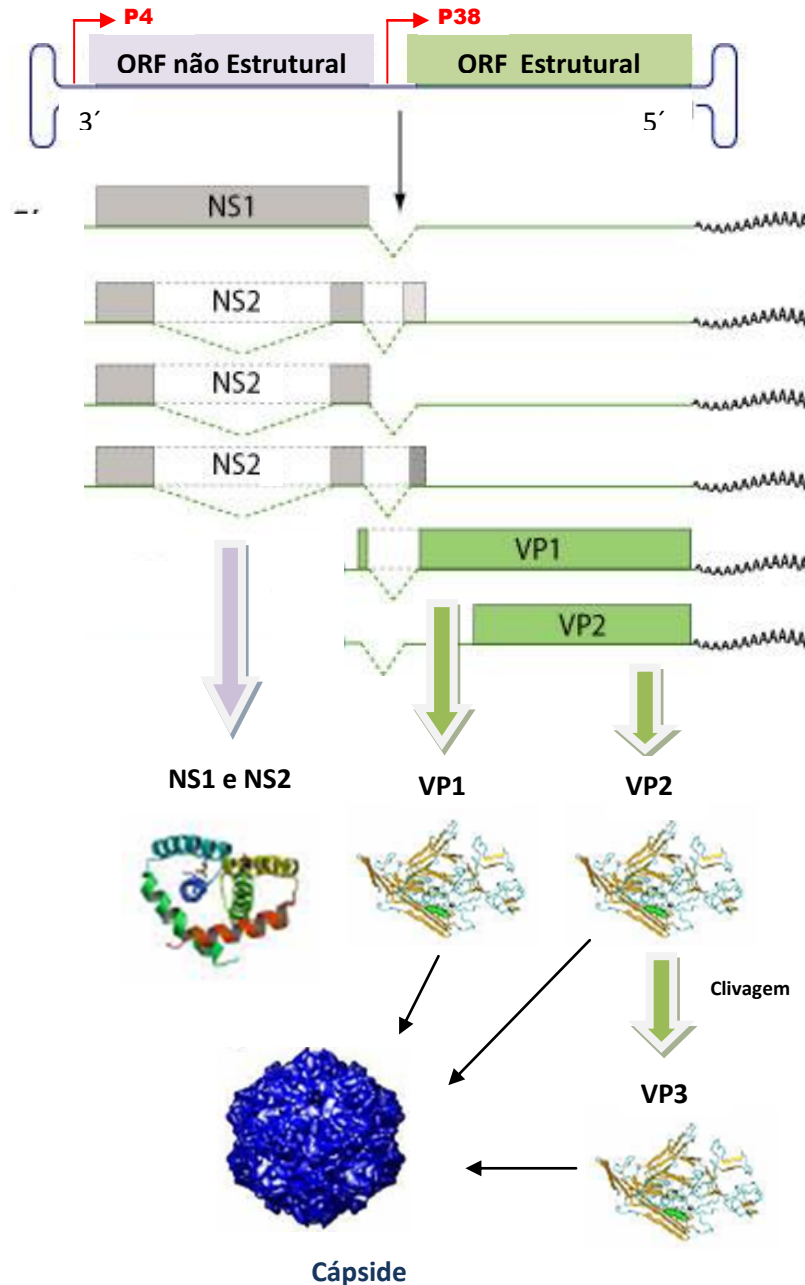


Figura 6: Esquema da estratégia de tradução genética do CPV. O genoma (ssADN) do CPV é representado por uma linha contínua que termina nas estruturas em forma de gancho. Os dois promotores víricos (P4 e P38) são mostrados pelas setas vermelhas. As duas ORF estão demonstradas pelos retângulos preenchidos a sombreado, por cima da linha do genoma. São visíveis também os produtos de leitura das ORF não estrutural e estrutural, que por “splicing” alternativo do ácido ribonucléico do tipo mensageiro (mRNA), originam respectivamente as

proteínas NS1/NS2 e VP1/VP2. (Adaptado de Cotmore e Tattersall, 2007; Streck, 2009; Viral Zone, http://expasy.org/viralzone/all_by_species/199.html)

Pensa-se que a **NS1** tem um papel fundamental na replicação do ADN, no controlo dos promotores e em acções citotóxicas na célula hospedeira (Cotmore e Tattersall, 2007).

As funções da **NS2**, na replicação dos parvovírus autónomos, continua a ser pouco compreendida, mas sabe-se que a NS2 intacta não é necessária para a replicação eficiente do vírus. As funções desta proteína no ciclo de vida, replicação e encapsidação devem ser relativamente subtis (Wang et al., 1998).

A **VP1** contém a sequência completa da VP2 e uma sequência adicional de 143 resíduos necessária para infecção vírica, mas não para a formação da cápside (Vihinen-Ranta et al., 2004). Na sequência da VP1, existe uma região que é importante para a sinalização nuclear e entrada no núcleo da partícula viral. Na zona amino-terminal da VP1, existe um domínio com actividade de fosfolipase A2 (PLA2). Ambas as regiões são essenciais para o sucesso da infecção pelo vírus (Harbinson et al., 2008).

A **VP2** tem a região amino-terminal na zona externa da cápside, passando através de um espaço existente na zona de pentassimetria, enquanto que a sequência única da VP1 está dentro da cápside, até ser exposta em fases posteriores da infecção (Tsao et al., 1991; Harbinson et al., 2008).

A VP2 tem funções muito importantes na encapsidação e estabilidade da partícula vírica. É a principal responsável pelas propriedades antigénicas do vírus, pelo tropismo celular (através da especificidade para ligação a determinados receptores celulares), pela gama de hospedeiros e pela estabilidade das partículas víricas no ambiente (Hurtado et al., 1996; Spitzer et al., 1997; Hueffer e Parrish, 2003; Vihinen-Ranta et al., 2004).

Dentro da família *Parvoviridae*, estão a ser descobertas, com o uso de técnicas moleculares mais sensíveis, proteínas distintas, podendo o genoma do CPV apresentar mais funções e proteínas até aqui desconhecidas (Streck, 2009).

A estrutura global do ssADN é pouco usual, porque as suas bases estão expostas para o exterior de forma a interagir com os aminoácidos dos locais de ligação com a cápside. Na cápside, os locais de ligação do ADN localizam-se na sua face interna, numa depressão entre duas zonas de pentassimetria das proteínas

estruturais (Chapman e Rossmann, 1995). Esta zona pode ter significado funcional, pois estes locais de ligação apenas estão completos na partícula vírica total (Figura 7).

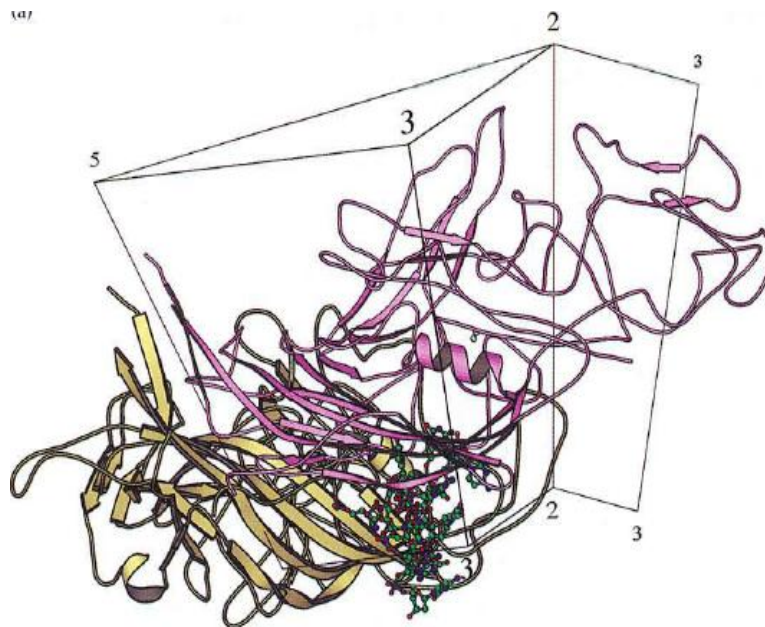


Figura 7: Diagrama da estrutura da ligação do ssADN à porção interna da cápside. O ADN está localizado entre duas das proteínas da cápside (fitas amarela e rosa). A vista é um corte tangencial da porção rugosa da cápside, com a superfície interna representada em baixo. A subunidade amarela está relacionada com a subunidade rosa pelo eixo de pentassimetria representado à esquerda. Estas duas subunidades participam na maioria do contacto com o ADN. Uma terceira proteína da cápside, também faz contacto mas é omissa no diagrama por uma questão de clareza (estaria relacionada com a subunidade rosa na zona de dupla simetria e teria contacto com o ADN na porção direita do diagrama) (Adaptado de Chapman e Rossmann, 1995).

Uma das particularidades mais interessantes da estrutura do ADN no CPV é a falta de interações entre a sua estrutura fosforibose e os aminoácidos da cápside que normalmente são visíveis nos complexos ADN-proteínas. Em vez disso, os fosfatos interagem com iões metálicos. A estrutura do ssADN encontrada no CPV tem implicações na incorporação do ADN nas cápsides e é relevante em processos como a replicação e a transcrição. Pode considerar-se que toda a estrutura em ansa está rodada de dentro para fora, com as bases viradas para o exterior em direcção às proteínas da cápside, enquanto que os fosfatos, a rodearem iões metálicos, estão voltados para o interior (Chapman e Rossmann, 1995). O ADN adquire esta conformação através do uso de isómeros

conformacionais, que não são encontrados em estruturas de cadeia dupla de ADN, mas ocorrem em estruturas de ácido ribonucleico do tipo transportador (tRNA). O número de interações entre o ADN e a cápside proteica é menor do que o usualmente encontrado noutros complexos de ADN-proteína, o que pode levar a considerar que a especificidade entre o ADN e a porção proteica é baixa. Este achado sugere a presença de outros mecanismos para o reconhecimento do ADN pela cápside protéica e de encapsidação do ADN (Chapman e Rossmann, 1995).

1.3 - Infecção e Replicação

Antes do parvovírus conseguir realizar a replicação, deve passar por uma série de interações desde a adesão à superfície celular até à entrada no núcleo da célula hospedeira. A relação partícula/infecção, nas infecções por parvovírus, parece ser alta (1:100 a superior a 1:1000), significando que a maioria das partículas víricas que entram nas células não se replica (Cotmore e Tattersall, 2007).

Todos os parvovírus necessitam de sofrer endocitose, mediada por um receptor celular, para que ocorra infecção (Vihinen-Ranta et al., 2004). O tipo de receptor varia entre os parvovírus e determina a especificidade do hospedeiro, tropismo para determinados tecidos e pode influenciar a via endossomal que será seguida. O receptor primário, tanto no caso do CPV, como do FPV, é o receptor da transferrina (TfR), mas algumas estirpes destes vírus também se podem ligar ao ácido siálico das células hospedeiras (Cotmore e Tattersall, 2007). O TfR é expresso de forma acentuada nas células em divisão activa. Este facto ajuda a explicar a patogénese particular da infecção por CPV e a sua necessidade de tecidos mitoticamente activos. O TfR parece ser um factor crítico ao determinar a vulnerabilidade celular à infecção pelo vírus (Hueffer et al., 2003). As novas variantes antigénicas do CPV (CPV2a e CPV2b) foram seleccionadas como resultado da sua melhor capacidade de ligação ao receptor, pois estas variantes mostraram ser mais eficientes na ligação ao receptor que o CPV original (CPV2) (Hueffer e Parrish, 2003).

Após ligação ao receptor, o complexo CPV-TfR entra rapidamente na célula, por endocitose mediada por vesículas rodeadas de clatrina. Estas são transportadas até uma zona perto do núcleo em endossomas. As cápsides injectadas no

citoplasma rapidamente ficam localizadas na região perinuclear e a maioria das cápsides encontra-se no núcleo em 3 a 6 horas. O mecanismo de escape das cápsides para o citoplasma não é bem conhecido, não parecendo estar relacionado com a lise completa dos endossomas, mas sim, com a formação de poros na membrana destes. A porção N-terminal da VP1 possui um domínio com actividade PLA2. A função da PLA2, em conjunto com uma diminuição do pH dentro dos endossomas, pode ajudar o vírus a formar poros nas membranas dos endossomas, libertando as cápsides no citoplasma, numa localização perinuclear (Harbinson et al., 2008). As cápsides livres na zona perto do núcleo, dirigem-se até este através do transporte pelos microtúbulos citoplasmáticos (Vihinen-Ranta et al., 2004). A passagem da cápside vírica pela membrana nuclear é um passo importante na infecção celular e pode ocorrer através do complexo poro nuclear (NPC), por um mecanismo de transporte activo (Figura 8). Apesar de pequenas moléculas se difundirem livremente através do poro, o transporte de moléculas maiores é específico, requer ATP e factores citosólicos específicos e é mediado por sequências de localização nuclear (NLSs). Antes da passagem para o interior do núcleo, ocorrem modificações na cápside de forma a permitir a exposição de NLSs, necessárias para o transporte nuclear das partículas víricas.

Apenas duas sequências básicas que podem ser consideradas NLSs estão presentes na VP2, enquanto a VP1 contém várias destas sequências, que direccionam o transporte do vírus até ao interior do núcleo. A importância da VP1 na entrada no núcleo da cápside vírica é demonstrada pelo facto de a injeção de anticorpos específicos contra a região única da VP1 antes da inoculação do vírus, bloquear a infecção. Adicionalmente, algumas alterações específicas na sequência N-terminal da VP1 levam a uma diminuição da capacidade de infecção das cápsides (Vihinen-Ranta et al., 2004). No citosol, as cápsides também são afectadas pela actividade dos proteossomas, originando a formação intracelular da proteína VP3, por clivagem da proteína da cápside VP2 (Vihinen-Ranta et al., 2004).

As cápsides do CPV entram no núcleo de forma intacta através do NPC (Vihinen-Ranta et al., 2004). O mecanismo de descapsidação não é bem conhecido, mas, como as partículas víricas são muito robustas, pensa-se que a completa descapsidação não é necessária para a libertação do genoma (Harbinson et al., 2008).

Como o vírus não possui os recursos para uma transcrição autónoma, necessita de esperar que a célula hospedeira entre na fase S do ciclo celular de forma a poder usar as suas vias de síntese (Cotmore e Tattersall, 2007).

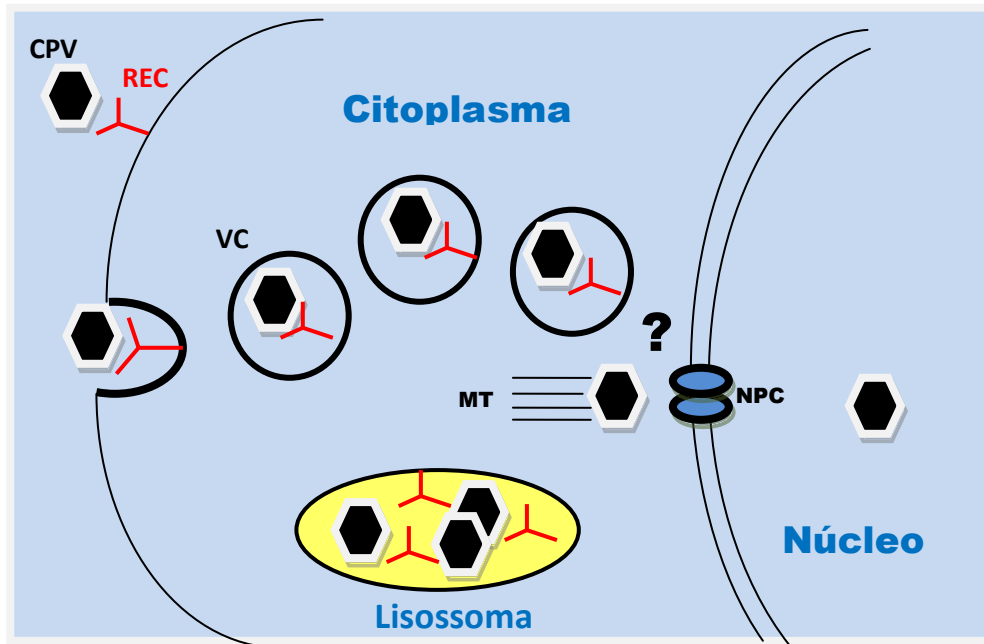


Figura 8: Representação esquemática dos mecanismos de entrada na célula hospedeira pelo CPV. Após a ligação das partículas víricas (CPV) aos receptores na superfície celular (REC), o vírus é internalizado para o citoplasma através de vesículas revestidas por clatrina (VC), seguido de transporte em endossomas. Algumas cápsides são encontradas em lisossomas. A forma como as cápsides são libertadas dos endossomas para o citoplasma ainda é desconhecido (?). O vírus utiliza os microtúbulos (MT) durante o percurso do citosol em direcção ao núcleo. As cápsides víricas são capazes de entrar no núcleo pelo complexo poro nuclear (NPC) numa forma intacta e sem aparente deformação (Adaptado de Vihinen-Ranta et al., 2004).

A cápside completa do CPV tem 20 a 30 nucleótidos da porção terminal 5' expostos na superfície externa da cápside e a NS1 está covalentemente ligada à porção 5' terminal. O ADN passa para o exterior da cápside através de um poro na zona de pentassimetria desta. Esta porção de ADN exposta no núcleo pode servir de substrato para o início da replicação pela polimerase da célula hospedeira, sem ser necessária a descapsidação do vírus (Vihinen-Ranta et al., 2004).

A replicação do ADN dos parvovírus é um processo complexo que ocorre pelo mecanismo de “Rolling Hairpin” (Cotmore e Tattersall, 1996). As partículas víricas possuem uma cópia simples de ADN linear que primeiro é convertida num intermediário duplo. A cadeia simples de ADN codificante termina em ambos os lados em sequências palindrómicas que formam uma estrutura em gancho. Estes telómeros têm um papel central na replicação vírica, contendo a maioria da informação necessária, tanto para a replicação, como para a encapsidação (Cotmore e Tattersall, 1996). A sequência palindrómica 3´terminal possui um grupo OH livre (gerado anteriormente no processo de replicação da cadeia mãe) que serve de iniciador para a formação de uma cadeia complementar de todo o genoma (formando uma cadeia dupla intermediária), incluindo a zona 5´do gancho. Esta região, na cadeia recém sintetizada, terá um final 3´OH. Após a acção da enzima helicase, formará um novo gancho 3´OH e fornecerá o local de ligação para a ADN polimerase sintetizar uma nova cópia do ADN viral (Cotmore e Tattersall, 1996; Willwand e Hirt, 1991). A amplificação ocorre através da formação de várias cadeias duplas intermediárias, de forma unidireccional pelo mesmo mecanismo, onde a “forquilha” de replicação unidireccional se direcciona para a frente e para trás ao longo do genoma linear, alterando de direcção como resultado da síntese das sequências palindrómicas terminais (Cotmore e Tattersall, 1996). O final deste processo resulta numa cadeia dupla de ADN que contém quatro cópias em cadeia simples do genoma vírico (Figura 9).

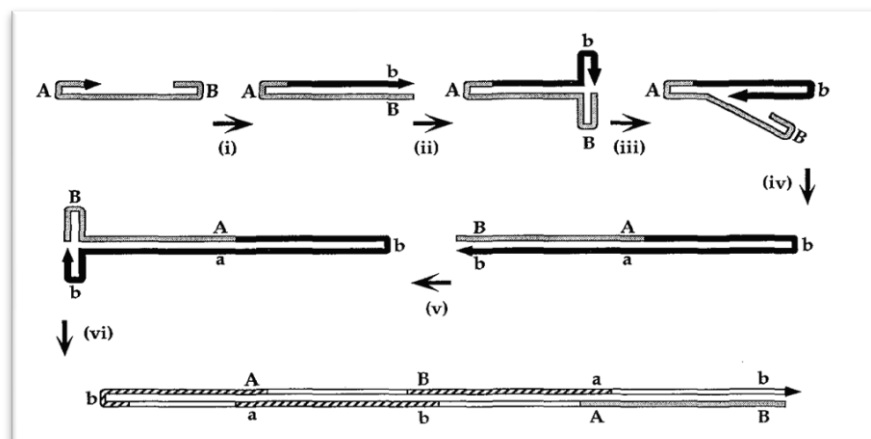


Figura 9: Esquema da replicação genética segundo o modelo “Rolling Hairpin”. A sequência de ADN parental é representado por uma barra cinzenta. Nos passos (i) a (v), o ADN recém sintetizado é representado por uma barra preta com uma seta na sua zona terminal 3´. A e B representam as sequências palindrómicas nas extremidades da cadeia de ADN parental, sendo as suas cadeias complementares representadas por a e b, respectivamente. No passo (vi) é produzido uma forma tetramérica (Adaptado de Cotmore e Tattersall, 1996).

Os genomas individuais são excisionados pela proteína viral NS1, originando duas cadeias simples com polaridade positiva e duas com polaridade negativa. Os telómeros das cadeias simples são depois regenerados (Willwand e Hirt, 1991). Apenas as cadeias de ADN com polaridade negativa são encapsidadas (Parrish, 1999). À medida que a replicação intranuclear progride, a membrana nuclear da célula infectada torna-se mais espessa e forma-se um halo não-corado à volta do nucléolo e no interior da membrana nuclear. A alteração do material nuclear faz com que nele se formem massas acidófilas visíveis ao microscópio óptico no interior do núcleo. Estas massas acidófilas constituem os corpos de inclusão intranucleares Cowdry tipo A, muito características da replicação dos parvovirus (Timoney et al., 1992).

Como todas as cadeias de ADN sintetizadas são encontradas encapsidadas, a sua síntese pode envolver um sequestro directo em cápsides pré-formadas. As proteínas da cápside podem reconhecer o gancho da extremidade 3'OH e encapsidar as cadeias dentro da cápside (Cotmore e Tattersall, 1996; Willwand e Hirt, 1991). Os viriões maduros e virulentos são libertados da célula, à medida que esta é destruída pela replicação vírica que decorre no seu núcleo. O ciclo de replicação (Figura 10) do parvovirus é rápido, completando-se em 20 a 24 horas (Timoney et al., 1992).

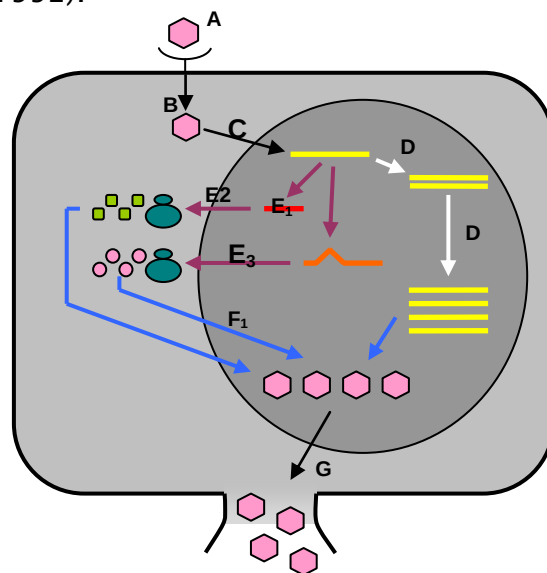


Figura 10 – Esquema do ciclo de replicação do CPV. Legenda: A- adsorção do vírus à superfície da célula infectada; B- penetração do vírus no citoplasma; C- translocação do material genético do vírus para o interior do núcleo; D- replicação do ADN vírico; E₁, E₂- transcrição do ARNm com informação para a produção das proteínas víricas; E₃-tradução do RNA mensageiro com formação das proteínas víricas nos ribossomas da célula infectada; F₁- montagem das novas partículas víricas completas; G-

libertação dos vírus para o exterior da célula, com consequente lise celular (Adaptado de Fenner et al., 1993; Timoney et al., 1992; Oliveira, 2001).

2 – EVOLUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO PARVOVÍRUS CANINO

2.1 – Origem do Parvovírus Canino

O CPV surgiu em 1978 como um novo agente patogénico dos cães. O vírus foi designado de CPV tipo 2 (CPV2), para o distinguir do anteriormente descrito como Parvovírus tipo 1 (CPV)1 ou *canine minute vírus*, pois não são correlacionáveis antigenicamente (Schwartz et al., 2002).

Este novo vírus disseminou-se de forma global para todo o mundo num período de cerca de um ano e, desde então, é um dos responsáveis por uma das principais doenças endémicas dos canídeos (Parrish, 1990).

Análises filogenéticas (Figura 11) demonstraram que os isolados de CPV descenderam de um ancestral comum que apareceu em meados dos anos 70 e que estava relacionado com um parvovírus endémico da panleucopenia felina (FPV), das martas, guaxinins, raposas do ártico, ou outros hospedeiros da ordem Carnivora (Parrish, 1990; Truyen et al., 1998b; Parrish, 1999). Truyen et al. (1998b), sugerem ainda que poderá ter sido a raposa o hospedeiro intermediário deste vírus, já que hoje em dia o parvovirus que infecta as raposas tem uma sequência de ADN intermédia entre o FPV (mais antigo) e o CPV actual. Pensa-se que o FPV é um agente patogénico endémico dos felinos, que terá surgido antes do início do século XX (Steinel et al., 2000). A barreira interespécies impedia a transmissão deste vírus aos cães e canídeos relacionados, em que a replicação é apenas limitada ao timo e provavelmente à medula óssea (Truyen e Parrish, 1992).

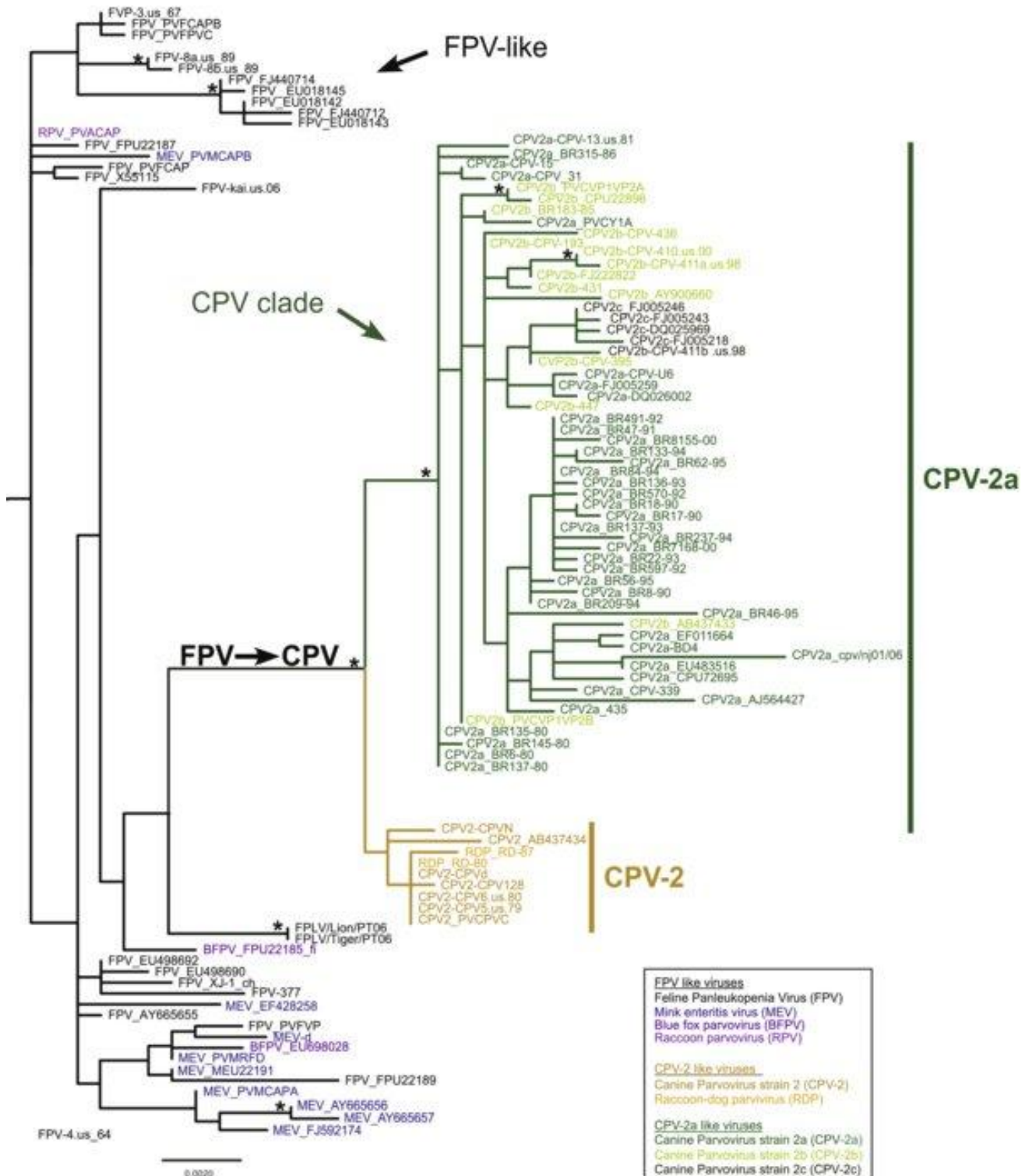


Figura 11: Relações filogenéticas entre os parvovirus dos carnívoros, baseadas no gene da proteína da cápside VP2. Legenda: FPV - vírus da panleucopenia felina, CPV - Parvovirus canino, BFPV - parvovirus da raposa azul do ártico, RPV - Parvovirus do guaxinim e RDP - Parvovirus do cão-guaxinim. * Nós com “bootstrap” com intervalo de confiança > 75% (Adaptado de Hoelzer K e Parrish C, 2010).

Segundo Shackelton et al. (2005), é muito provável que o ancestral do CPV tenha surgido na população canina mais de 10 anos antes de ter sido descrito pela primeira vez. Este vírus manteve-se na população durante vários anos, acumulando mutações sob uma forte pressão de selecção positiva. Apesar de estimativas anteriores (Parrish et al., 1991; Truyen et al., 1995), considerarem a taxa de mutação dos parvovírus como baixa, na ordem de 1×10^{-4} a 4×10^{-4} alterações/nucleótido/ano; Shackelton et al. (2005), observaram que a taxa de substituição nucleotídica nos parvovírus dos carnívoros é mais similar à encontrada nos vírus de RNA do que noutros vírus de ADN. Este acontecimento pode dever-se a dois factores possíveis, tais como, uma elevada taxa intrínseca de mutação do CPV e uma forte pressão de selecção positiva e persistente, o que eleva a taxa de fixação das mutações. No caso do CPV, parece que ambos os factores estão implicados no aparecimento de novas estirpes em intervalos de tempo bastante curtos, sendo que a forte pressão de selecção positiva se fez sentir numa mutação específica da VP2, mas não na NS1 (Hoelzer et al., 2008a).

O CPV representa um dos raros exemplos, em que o salto evolutivo de ultrapassar a barreira interespecies foi observado em “tempo real” (Hoelzer et al., 2008a). A capacidade dos vírus de infectar novas espécies são eventos raros, mas quando ocorrem, os resultados podem ser graves, pois estes vírus podem distribuir-se universalmente em populações imunologicamente susceptíveis e hospedeiros sem qualquer mecanismo de adaptação. É claro que a emergência do CPV foi um processo com várias fases, em que pequenas mutações do gene que codifica as proteínas da cápside permitiram que o vírus infectasse e se disseminasse num novo hospedeiro (Hueffer et al., 2003). O mecanismo de emergência de uma doença, por selecção de um novo hospedeiro por parte de um vírus, não é muito comum, mas temos como exemplos de variações dos hospedeiros de determinados vírus na história recente, os vírus da influenza A e o vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (Parrish, 1999).

2.2 – Emergência e Características Genéticas do CPV

A emergência do CPV2 ocorreu associada a alterações específicas de aminoácidos na região do espigão da VP2 (Figura 12). As alterações estruturais sugerem que esta região se liga ao receptor TfR e controla o tipo de hospedeiros passíveis de

serem infectados. Esta região da cápside é também um local de elevada antigenicidade, que serve de alvo a anticorpos neutralizantes (Hueffer e Parrish, 2003; Palermo et al., 2003).

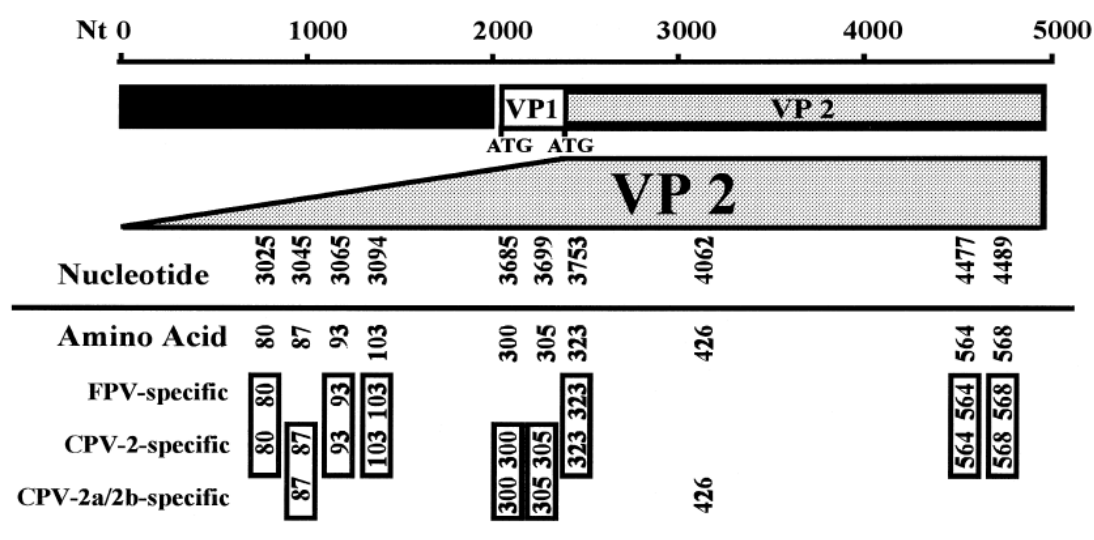


Figura 12: Representação do gene que codifica a proteína estrutural VP2 no FPV e diferentes variantes do CPV. Os rectângulos representam as diferenças nos respectivos resíduos dos diferentes vírus. Os aminoácidos nas posições 80, 93, 103, 323, 564 e 568 são idênticos no CPV2 e FPV. As sequências de aminoácidos nas posições 93, 103 e 323 são críticas para a capacidade de replicação no cão, enquanto as sequências de aminoácidos 80, 564 e 568 são críticas para a capacidade de replicação no gato. A capacidade de infecção dos felinos pelas novas variantes de CPV (2a e 2b) está ligada às alterações dos aminoácidos na posição 87, 300 e 305. O aminoácido 426 é idêntico no FPV, CPV2 e no CPV2a, mas difere do CPV2b (Adaptado de Steinel et al., 2000).

Os isolados de CPV2 e FPV diferem apenas em 0,5% na sua sequência de ADN. As diferenças entre estes vírus são baseadas em cinco resíduos codificados pela VP2, nomeadamente nos resíduos 80 (Lys FPV/Arg CPV2), 93 (Lys FPV/Asn CPV2), 323 (Asp FPV/Asn CPV2), 564 (Ser FPV/Asn CPV2) e 568 (Gly FPV/Ala CPV2). Considera-se que as alterações nos resíduos 93, 103 e 323 são as principais responsáveis pela capacidade de infecção do CPV2 no cão e por um epítipo antigénico específico do CPV2, enquanto os resíduos 80, 564 e 568 encontrados no FPV são críticos para a replicação destes vírus no gato (Chang et al., 1992; Steinel et al., 2000; Hueffer et al., 2003). Para além das diferenças encontradas entre estes vírus no tipo de hospedeiros que infectam, o FPV e o CPV2 diferem nas suas características de hemaglutinação (HA). Os isolados do FPV apenas

aglutinam em pH inferior a 6,6, enquanto o CPV2 aglutina em pH superior, ou pelo menos igual a 7,5 (Parrish et al., 1991).

A semelhança entre o CPV2 e a estirpe vacinal de FPV contribuiu para a controvérsia acerca da origem do CPV2. Sugeriu-se na altura que a origem do CPV poderia estar relacionada com a própria estirpe vacinal do FPV, em vez do seu aparecimento a partir de um mutante do FPV. Só entre 1995 e 1998 foi provada que a origem do CPV2 não está relacionada, nem com uma variante directa do FPV, nem com estirpe vacinal de FPV (Truyen et al., 1998a; Carmichael, 2005). Estudos filogenéticos sugerem que o CPV2 teve origem num vírus semelhante ao da panleucopenia felina (ancestral comum) que se adaptou e infectou alguns carnívoros selvagens, nomeadamente a raposa do ártico (Hoelzer K e Parrish C, 2010).

2.3 – Evolução do Parvovirus Canino

Em 1979, foi identificada uma variante do CPV2 (CPV2 tipo a, CPV2a), que num ano sofreu uma distribuição mundial, substituindo na totalidade o CPV2, que actualmente já não existe em circulação (Figura 13). O CPV2a tem cinco substituições aminoacídicas na sua cápside, relativamente ao CPV2, incluindo alterações nos resíduos da VP2 87 (Met/Leu), 300 (Ala/Gly) e 305 (Asp/Tyr) (Parrish et al., 1991). Em 1984, uma nova variante antigénica do CPV2a (Figura 13), CPV2 tipo b (CPV2b), foi reconhecida, e difere da original em apenas dois resíduos aminoacídicos da cápside. Uma das substituições ocorreu numa das principais regiões antigénicas (epítotope A), como resultado da substituição do resíduo 426 da VP2 de Asn/Asp; e a outra substituição ocorreu no resíduo 555, Ile para Val, sendo este local um determinante antigénico de menor relevância (Parrish et al., 1991; Buonavoglia et al., 2001).

Em 2000, uma nova alteração no resíduo 426 da VP2 (Asp/Glu) foi identificada em Itália, o que levou a propor o aparecimento de uma nova variante, o CPV2 tipo C (CPV2c) (Martella et al., 2004). As consequências, em termos fenotípicos, desta última mutação ainda não estão esclarecidas.

Uma nova alteração de um aminoácido na posição 297 (Ser/Ala) foi observada tanto no CPV2a, como no CPV2b. Este resíduo 297 está num local antigénico *minor* e as suas alterações podem ser responsáveis por diferenças de antigenicidade do CPV. Os subtipos CPV2a e CPV2b que apresentam esta mutação no resíduo 297 (Ser/Ala) são designados de Novos CPV2a/CPV2b (Martella et al., 2005; Decaro et al., 2006c; Ohshima et al., 2008; Mohan Raj et al., 2010).

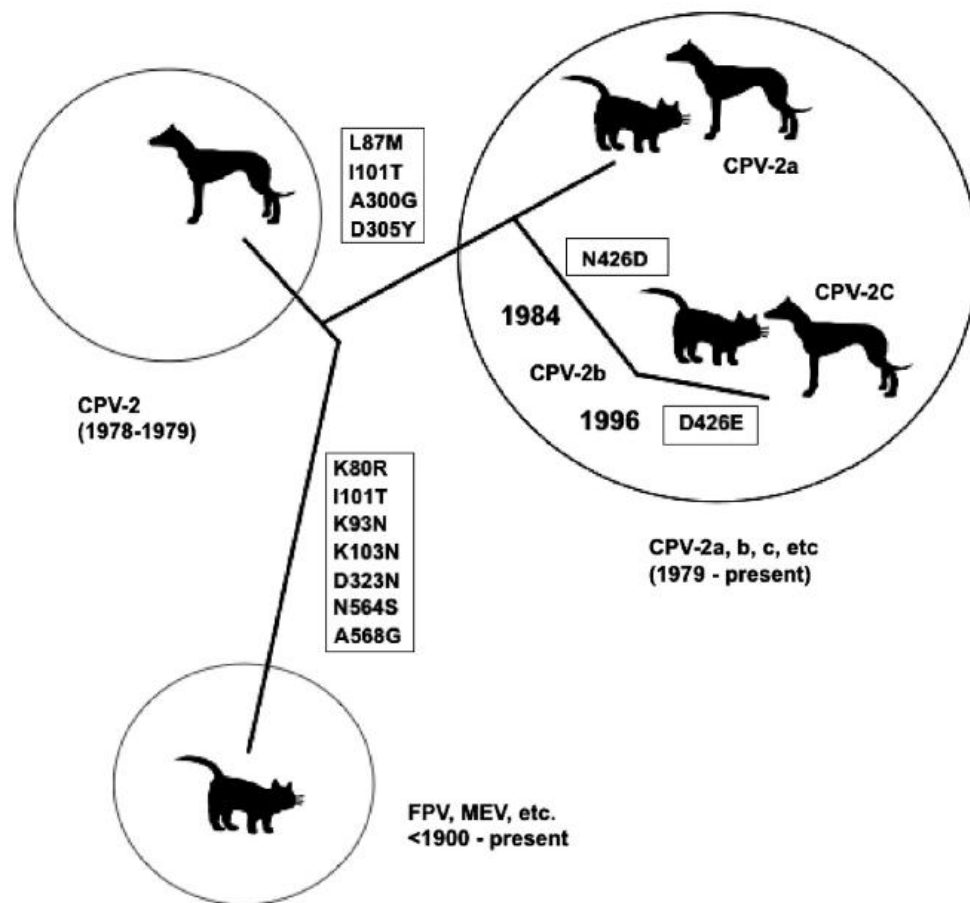


Figura 13: Representação esquemática da evolução do CPV. Relação e gama de hospedeiros do FPV, CPV e parvovirus relacionados. O hospedeiro, o tipo de vírus (mutações que definem o subtipo) e o ano de emergência estão indicados (Adaptado de Hoelzer e Parrish, 2010).

As variantes antigénicas CPV2a, CPV2b e CPV2c já possuem a capacidade de infectar felinos e de lhes causar sintomatologia (Truyen e Parrish, 1992; Buonavoglia et al., 2001). Pensa-se que a alteração nos resíduos 87, 300 e 305 (Figura 14) são os responsáveis pela capacidade destas variantes infectarem esta espécie (Steinel et al., 2000; Hueffer et al., 2003).

O modelo actual de evolução do parvovírus está representado na Figura 14. Tudo indica que o receptor TfR e a adesão a este receptor pelas partículas víricas possuem um papel central na evolução e patogénese do CPV.

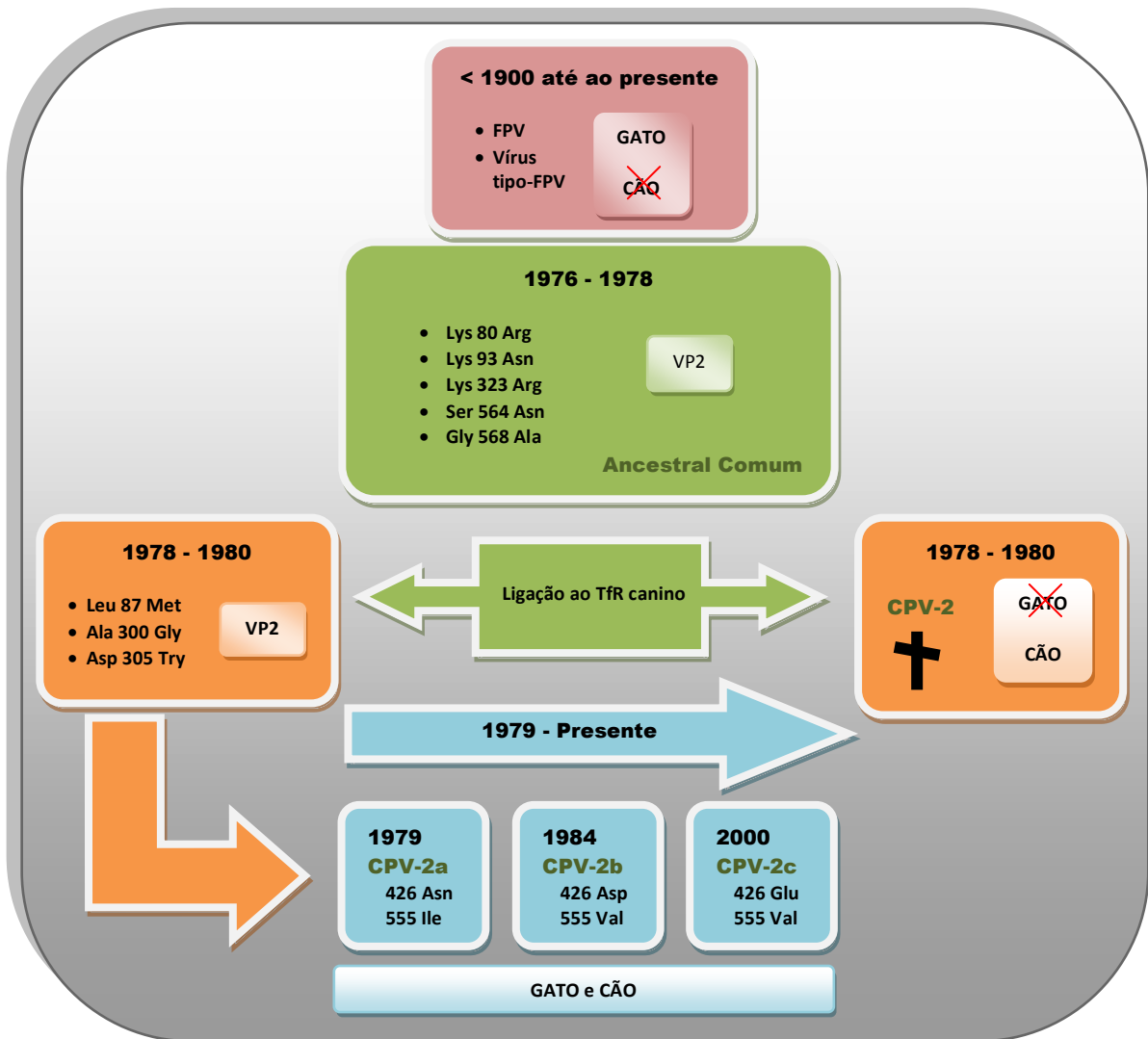


Figura 14: Modelo de evolução genotípica do CPV. O CPV evoluiu do FPV ou de um vírus tipo-FPV. Este vírus tipo-FPV causa doença em gatos mas não em cães (indicado pela cruz a vermelho), e não se replica em cultura de células caninas. O FPV infecta as células felinas ao ligar-se ao TfR felino, mas não consegue ligar-se ao TfR canino. Alterações nas proteínas da cápside originaram o ancestral comum do CPV2 e do CPV2a entre 1976 e 1978. Este ancestral conseguia ligar-se ao TfR canino, infectar células caninas e provocar doença em cães. Apesar de se ligar ao TfR felino e infectar células felinas *in vitro*, o original CPV2 não conseguia infectar os felinos. Por volta dos anos 80, o ancestral comum do CPV2 foi substituído por um vírus mais evoluído, o CPV2a, que acumulou algumas alterações no gene da cápside que levaram a uma maior eficiência na infecção das células caninas. O CPV2a e os vírus subsequentes (CPV2b e CPV2c) reconquistaram a capacidade de infectar os felinos e podem causar sinais clínicos tanto em cães, como em gatos. A evolução continua a ocorrer nestes vírus, como pode ser visto pela emergência global de mais duas variações

antigénicas, o CPV2b e CPV2c, com outras substituições no genoma que codifica a VP2 (Adaptado de Buonavoglia et al., 2001; Hueffer e Parrish, 2003; Martella et al., 2004).

A possibilidade de infecção de um animal com vários subtipos de parvovírus já foi registada em gatos, nomeadamente co-infecção de estirpe de FPV e CPV2 e mesmo com duas estirpes de CPV2 (CPV2a/CPV2c). Foram também observados casos de co-infecção em cães (Url et al., 2003; Battilani et al., 2007; Vieira et al., 2008; Battilani et al., 2011; Vieira et al., 2011). Em 2008, foi descrito em Portugal a presença de co-infecção com as variantes CPV2b e CPV2c isoladas a partir das fezes de um cão com sinais de gastroenterite (Vieira et al., 2008a). Já em 2006, Decaro et al. (2007a), tinham feito o isolamento simultâneo de uma estirpe de campo de CPV (CPV2a) e de uma estirpe vacinal (CPV2), em três cachorros com sinais gastrointestinais, uma semana após a vacinação contra a infecção por este vírus (Decaro et al., 2007a).

As co-infecções com múltiplas estirpes têm sido observadas em membros da família *Parvoviridae*, nomeadamente no parvovírus humano B19 (Candotti et al., 2004). Assim, as situações de co-infecção parecem ocorrer de forma frequente, facilitando potencialmente a recombinação e a diversidade genética (Shackelton et al., 2007; Hoelzer et al., 2008b). Battilani et al. (2007), chegou a sugerir que a nova variante, CPV2c, poderia favorecer a ocorrência de múltiplas infecções e consequentemente o polimorfismo genético. Devido a uma rápida dinâmica evolutiva, é provável que o CPV continue a melhorar a sua capacidade de disseminação pelos hospedeiros carnívoros (Shackelton et al., 2004).

2.4 – Hospedeiros do Parvovírus Canino

Apesar dos hospedeiros preferenciais das variantes de CPV serem os canídeos, aproximadamente 5% das infecções por parvovírus em felinos domésticos (*Felis catus*) são causadas pelas variantes CPV2a ou CPV2b (Truyen et al., 1996). Em 2007, Battilani et al. descreveram a presença de CPV 2c num gato doméstico.

Também os grandes felídeos são susceptíveis a infecção por CPV2a e CPV2b, tendo estes subtipos antigénicos sido isolados em seis chitas e um tigre da Sibéria com sinais clínicos de enterite por parvovírus (Steinel et al., 2000). As novas variantes antigénicas também foram responsáveis por infecção noutras

espécies que não os felinos, nomeadamente em furões (*Martes foina*), em raposas (*Otocyon megalotis*) e num panda (Steinel et al., 2000; Steinel et al., 2001; Qin et al., 2007).

3 – EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL

A análise filogenética deste vírus sugere que houve pouca movimentação das variantes do CPV entre diferentes áreas geográficas. Assim, após o período inicial de emergência do CPV2 que se caracterizou pela sua distribuição mundial, as mutações posteriores, que ocorreram no seu ancestral, surgiram de um fenómeno de emergência paralela da mesma mutação em zonas geográficas distantes (Hoelzer et al., 2008a). Apesar do CPV2 ter desaparecido da circulação no início dos anos 90, sendo totalmente substituído pelo CPV2a, 2b e 2c, a maioria das vacinas comerciais são baseadas na estirpe inicial do CPV2. Actualmente, as três variantes de CPV co-circulam na população canina de forma generalizada. A sua frequência relativa parece variar consoante as regiões geográficas e com as variações por flutuação temporal (Hoelzer et al., 2008b).

3.1 - Europa

Na Europa, o CPV2c está presente em vários países, nomeadamente Portugal, Espanha, Itália, Alemanha, Reino Unido, Bulgária e Grécia (Figura 15). Dentro destes países há uma variação das frequências relativas dos diferentes subtipos. Por exemplo, enquanto na Grécia e na Bulgária o subtipo mais prevalente é o CPV2a, este está em minoria em países como Portugal e Alemanha, em que há uma representação muito equitativa das variantes CPV2b e CPV2c. Já em Itália, o CPV2b apresenta uma percentagem relativa muito baixa (Decaro et al., 2007c; Vieira et al., 2008b; Ntafis et al., 2010; Decaro et al., 2009; Filipov et al., 20011; Vieira et al, 2011). O CPV2c parece ser actualmente a variante predominante em Espanha e frequente em França (Decaro et al., 2009).



Figura 15: Distribuição geográfica dos subtipos de Parvovírus Canino na Europa. As amostras fecais ou de isolados de diferentes países foram analisados por métodos moleculares. As diferentes variantes de CPV (CPV2a, CPV2b e CPV2c) estão indicadas para cada país pelos números entre parênteses. As amostras foram colhidas entre 2005-2006, excepto para amostras de Itália (2006) e Alemanha (1996-2005). Legenda: B – Bélgica; CH – Suíça; CZ – República Checa; D – Alemanha; I – Itália; P – Portugal; S – Espanha e UK – Reino Unido (Adaptado de Decaro et al., 2007c).

3.2 - Ásia

Na Ásia (Índia, Vietname, Japão e China), foi determinada uma predominância do CPV2b em relação ao CPV2a, facto que contraria os resultados encontrados na Coreia. O subtipo foi identificado apenas na Índia e no Vietname (Mochizuki et al., 2001; Nakamura et al., 2004; Jeoung et al., 2008; Nandi et al., 2009; Zhang et al., 2010).

3.3 – Estados Unidos da América

Nos Estados Unidos, o subtipo CPV2b é predominante, seguida do subtipo CPV2c e numa minoria do subtipo CPV2a. De notar que os casos de infecção por CPV2c se distribuem por várias zonas geográficas dos EUA (Hong et al., 2007; Kapil et al., 2007).

3.4 – América do Sul

Na América do Sul, nomeadamente no Uruguai, verifica-se uma predominância do subtipo CPV2c, sendo que em 25 isolados no estudo de Pérez et al. (2007), apenas um era do subtipo CPV2a. Um achado interessante é o facto de não ter sido identificado qualquer caso do subtipo CPV2b (Pérez et al., 2007). No Brasil, o CPV2b foi o subtipo prevalente de 1995 a 2001 (Costa et al., 2005). Em 2009, foi descrita pela primeira vez a circulação da estirpe CPV2c na população canina no Brasil, sendo que nesta altura foi identificada como a estirpe mais prevalente (Streck et al., 2009).

3.5 - África

Existe pouca informação disponível relativamente ao continente Africano, mas, na África do Sul e na Namíbia, as variantes em circulação foram tipificadas em 1990 com anticorpos monoclonais e o subtipo mais prevalente era o CPV2b (Steinel et al., 1998). Na Tunísia, os três subtipos estão em circulação de forma muito equitativa (Touihri et al., 2009).

3.6 - Austrália

Segundo Meers et al., (2007) o subtipo CPV2a continua a ser a variante genética predominante do CPV em cães na Austrália e não foi substituída pelo CPV2b (apenas uma amostra de fezes de um cachorro, num total de quarenta e três), nem pelo CPV2c (que não foi identificado neste estudo).

A razão para as diferenças nas distribuições relativas dos subtipos a nível mundial ainda é desconhecida. A coexistência em circulação dos subtipos CPV2a, CPV2b e CPV2c com diferentes percentagens e nos diferentes países demonstra que provavelmente não existe uma vantagem evolutiva de uma variante em relação às outras e que essa coexistência não teve origem numa pressão de selecção imunológica devido às vacinas (Parrish et al., 1991; Steinel et al., 1998).

3.7 - Portugal

Em Portugal, foram detectados casos de parvovirose canina devida a infecções pelos três subtipos de CPV. Foram detectados também casos de co-infecção CPV2b/CPV2c (Vieira et al., 2008a; Vieira et al., 2008b).

No estudo de Vieira et al. (2011), que incluiu amostras de todo o território continental, as estirpes de CPV mais representadas foram o CPV2b e o CPV2c, que de uma forma geral apresentaram distribuições muito semelhantes nas três zonas do país. Apenas uma amostra no total de 104 foi tipificada como sendo CPV2a.

É interessante notar, neste estudo, a presença de casos de co-infecção com uma percentagem elevada, também nas três zonas de Portugal (Gráfico 1 e 2). O porquê da presença de uma elevada frequência de co-infecções nos casos de infecção por CPV em Portugal, comparativamente a outras zonas do mundo, onde são apenas descritos casos muito esporádicos, ainda está por esclarecer (Vieira et al., 2011).

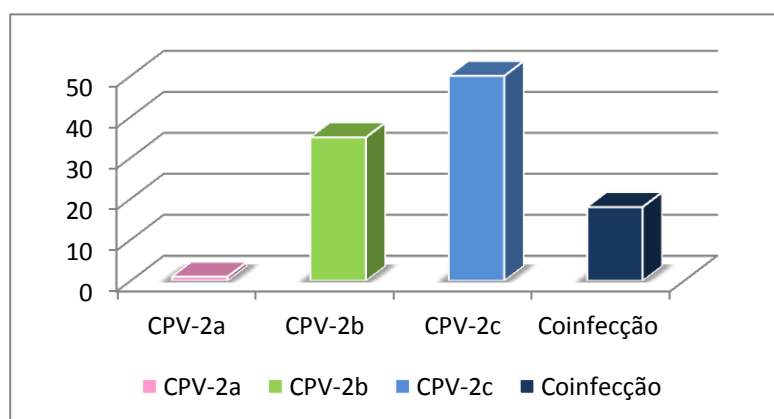


Gráfico 1: Resultados da tipificação das amostras fecais (104) de animais com gastroenterite por CPV, recolhidas em Portugal entre Abril de 2006 e Abril de 2009 (Vieira et al., 2011).

Neste estudo (Vieira et al., 2011) foi também avaliada a tendência evolutiva da distribuição de subtipos na Zona Centro do País (zona de maior amostragem), e apesar do período temporal de estudo ter sido curto, demonstra-se uma tendência estatisticamente significativa para um aumento da infecção por CPV2c e uma diminuição do subtipo CPV2b. Também em Itália o número de casos de parvovirose canina por CPV2b tem vindo a diminuir progressivamente (Decaro et al., 2007b).

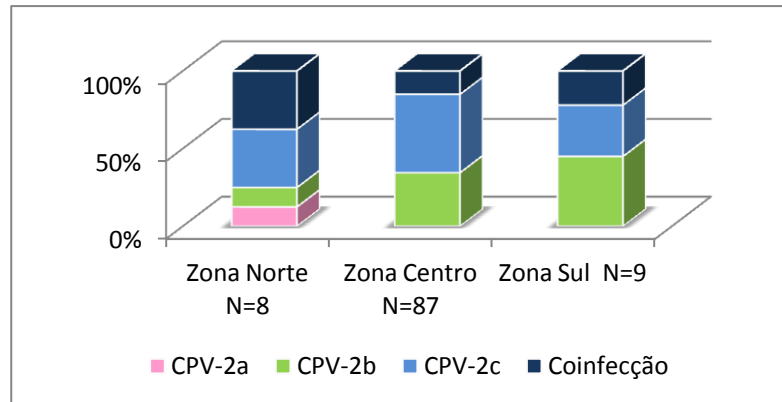


Gráfico 2: Distribuição relativa dos subtipos de CPV presentes em amostras fecais, recolhidas entre Abril de 2006 e Abril de 2009, pelas diferentes zonas de Portugal (Vieira et al., 2011).

4 – PATOGENIA

A parvovirose canina é uma doença altamente contagiosa, podendo originar surtos graves em populações inteiras quando susceptíveis (Guilford, 1996). Actualmente, as manifestações clínicas da parvovirose canina são principalmente de origem gastrointestinal e esta doença é normalmente vista como uma gastroenterite. No entanto, o mais correcto seria defini-la como uma doença sistémica, pois as suas lesões e consequências não se manifestam só a nível do sistema gastrointestinal (Meunier et al., 1985a; Macartney et al., 1984b). A ocorrência de vasculite, artrite, septicémia e miocardite estão descritas como associadas a esta doença (Macartney et al., 1984b; Johnson e Castro, 1984; McCaw e Hoskins, 2006). Quando surgiu, em meados de 1978, a doença provocada pelo parvovírus canino caracterizava-se pela presença de vômito e diarreia em cães com mais de 6 semanas de idade e pela presença de miocardite nos cachorros recém-nascidos (Parrish, 1999).

A infecção pelo CPV ocorre através da via oronasal a partir de fezes contaminadas com o vírus (Meunier et al., 1985a; Carmichael, 2005). A transmissão indirecta pode ocorrer através de objectos contaminados. Acredita-se que a dose mínima infectante do vírus seja bastante reduzida, já que doses muito baixas de estirpes atenuadas, inoculadas por via intramuscular (IM), são suficientes para iniciar uma infecção (Carmichael et al., 1981).

4.1 – Formas de Apresentação Clínica

A **forma miocárdica** da doença é actualmente bastante rara, acontecendo em cachorros descendentes de cadelas não imunizadas e que são infectados *in utero*, ou nas primeiras semanas de vida (Meunier et al., 1984). Este tipo de infecção é muito esporádico, dado que a maior parte das cadelas se encontra imunizada, passando essa imunidade para o cachorro de forma passiva (Meunier et al., 1984). A idade do animal na altura da infecção parece determinar se o coração é ou não afectado. A taxa de replicação dos miócitos só é suficiente para suportar a replicação efectiva do CPV, aproximadamente até às 2 semanas de idade. Cães infectados posteriormente a esta idade podem desenvolver enterite, mas não miocardite (McCaw e Hoskins, 2006). Esta miocardite aparece geralmente sob a forma de insuficiência cardíaca aguda em cães entre as 6 e as 8 semanas de idade, mas é o resultado de uma infecção que se iniciou algumas semanas antes (Meunier et al., 1984; Lenghaus e Studdemt, 1984). A perda de fibras miocárdicas e respectiva substituição por tecido fibroso pode, em animais sobreviventes, levar à morte por insuficiência cardíaca crónica, semanas a meses depois. As lesões primárias nestes animais estão relacionadas com extensa necrose multifocal do miocárdio, com uma reacção inflamatória (infiltrado linfocítico) de intensidade variável e presença de corpos de inclusão de grandes dimensões no interior dos miócitos (Robinson et al., 1979).

Uma **forma neurológica** de infecção por CPV, caracterizada por leucoencefalomalácia, também foi descrita, originando necrose de liquefacção da substância branca do sistema nervoso central, secundária à hipóxia e isquémia por miocardite por acção deste vírus (Prittie, 2004).

Após a disseminação do vírus pelo mundo, a maioria dos cães adultos passaram a ter anticorpos anti-CPV. Assim, as cadelas grávidas transmitem à descendência anticorpos anti-CPV através da placenta, mas principalmente através do colostro. Esta transferência de anticorpos específicos protege o cachorro contra a miocardite durante o seu período susceptível (Meunier et al., 1984), pelo que a forma miocárdica deixou de ser frequente e a doença começou a ter como apresentação característica a **forma intestinal**.

4.2 – Patogenia da forma intestinal

Após o contacto com o vírus pelo animal, ocorre uma replicação primária nos tecidos linfóides da orofaringe, linfonodos mesentéricos e timo (Meunier et al., 1985a). Apesar de o Parvovírus canino entrar no hospedeiro através do epitélio intestinal, não existem evidências de que o tecido linfóide intestinal, ou as células epiteliais, sejam o local inicial de replicação (Meunier et al., 1985a). Com a replicação primária do CPV, aparecem as primeiras lesões histológicas da doença, que se caracterizam pela evidência de necrose nos centros germinativos das amígdalas, gânglios retrofaríngeos e gânglios mesentéricos ao 2º dia pós-infecção (PI). Ao 3º dia PI, a necrose linfóide é mais generalizada, sendo evidente a perda celular no timo dos cachorros (McCaw e Hoskins, 2006; Macartney et al., 1984a). O vírus dissemina-se a partir desses locais por via hematogénea, provocando assim uma virémia primária (McCaw e Hoskins, 2006). A virémia primária (Figura16) distribui os vírus para tecidos em rápida divisão. Os tecidos mais comumente afectados nesta fase incluem a medula óssea, o tecido linfopoiético e o epitélio intestinal do jejuno e íleo (Guilford, 1996; McCaw e Hoskins, 2006).

A nível da medula óssea, a infecção provoca necrose tanto das linhas mielóides como eritróides (McCaw e Hoskins, 2006). Não são comuns alterações da contagem dos eritrócitos no sangue periférico devido à sua elevada semi-vida. As alterações da contagem de leucócitos começam entre o 3º e 5º dia PI. A alteração mais precoce, linfopenia, resulta da lise também precoce dos linfócitos, que começa logo no 1º ou 2º dia PI. Em casos graves, aparece também uma neutropenia, com desvio à esquerda e neutrófilos tóxicos, aproximadamente aos 6 dias PI (Macartney et al., 1984a). Em animais convalescentes, é frequente encontrarmos leucocitose e hiperplasia da medula óssea (McCaw e Hoskins, 2006).

A replicação e libertação do vírus nos tecidos infectados origina uma virémia secundária (Figura16), de grande intensidade [até 10^6 doses medianas infectantes em cultura de células ($TCID_{50}$) por mililitro de sangue], durante o 3º e 4º dia PI (McCaw e Hoskins, 2006). O vírus dissemina-se durante a virémia secundária pelo organismo e dirige-se para células com elevada taxa mitótica, nomeadamente miocárdio, língua, mucosa oral e intestinal. O epitélio intestinal é infectado directamente a partir do sangue, sem replicação adicional no tecido linfóide intestinal (Meunier et al., 1985a). O vírus replica-se nas células epiteliais em

rápida divisão, ocorrendo então uma degeneração das glândulas das criptas intestinais, devido à replicação do vírus no interior das suas células. Esta é a zona mitoticamente activa das vilosidades intestinais, sendo selectivamente atingida pelo CPV, que necessita de células em divisão rápida, para a sua própria replicação. Com a lesão das criptas, as células diferenciadas da extremidade das vilosidades não são substituídas, o que acaba por provocar colapso da mucosa, com diminuição da sua capacidade de absorção e aumento da sua permeabilidade. As microvilosidades ficam primeiro revestidas por epitélio cuboide imaturo até que finalmente ocorre o desnudamento total da mucosa, em casos graves (McCaw e Hoskins, 2006). Esta virémia secundária termina devido à acção dos anticorpos neutralizantes séricos, que aparecem 5 ou 6 dias PI (Guilford, 1996). A virémia pode persistir por várias semanas, mesmo após o vírus ter desaparecido do intestino (Decaro et al., 2007b).

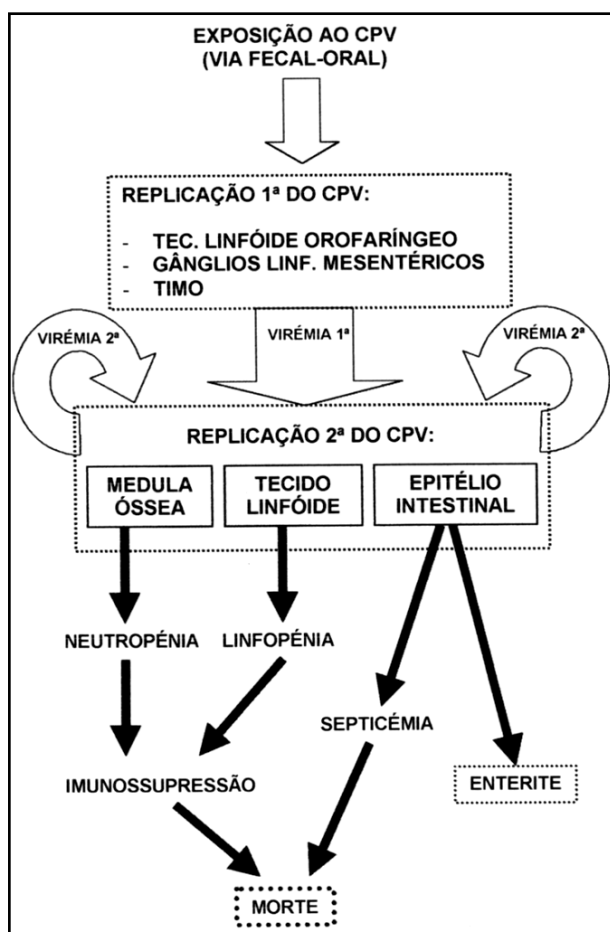


Figura 16: Patogenia da forma intestinal de parvovirose canina (Adaptado de Guilford e Strombeck, 1996; Oliveira, 2001).

A excreção do vírus nas fezes pode começar logo ao 3º dia PI, ainda antes do começo dos sinais clínicos (Figura 17). Durante a fase aguda da doença o vírus é

excretado nas fezes em enormes quantidades, atingindo o seu pico entre o 5º e o 6º dia PI, altura em que podem ser excretados mais de 10^9 TCID₅₀ por grama de fezes (Carmichael et al., 1981; Meunier et al., 1985a). A quantidade de vírus excretados diminui de forma abrupta depois do 7º dia pós-infecção (Timoney et al., 1992). Esta diminuição ocorre 1 a 2 dias depois do aparecimento de anticorpos neutralizantes séricos (Guilford, 1996). A formação local de anticorpos intestinais pode ser importante nesta diminuição da excreção do vírus (McCaw e Hoskins, 2006). Depois do 12º dia PI, é raro conseguir-se isolar o vírus em amostras fecais (Mochizuki et al., 1984).

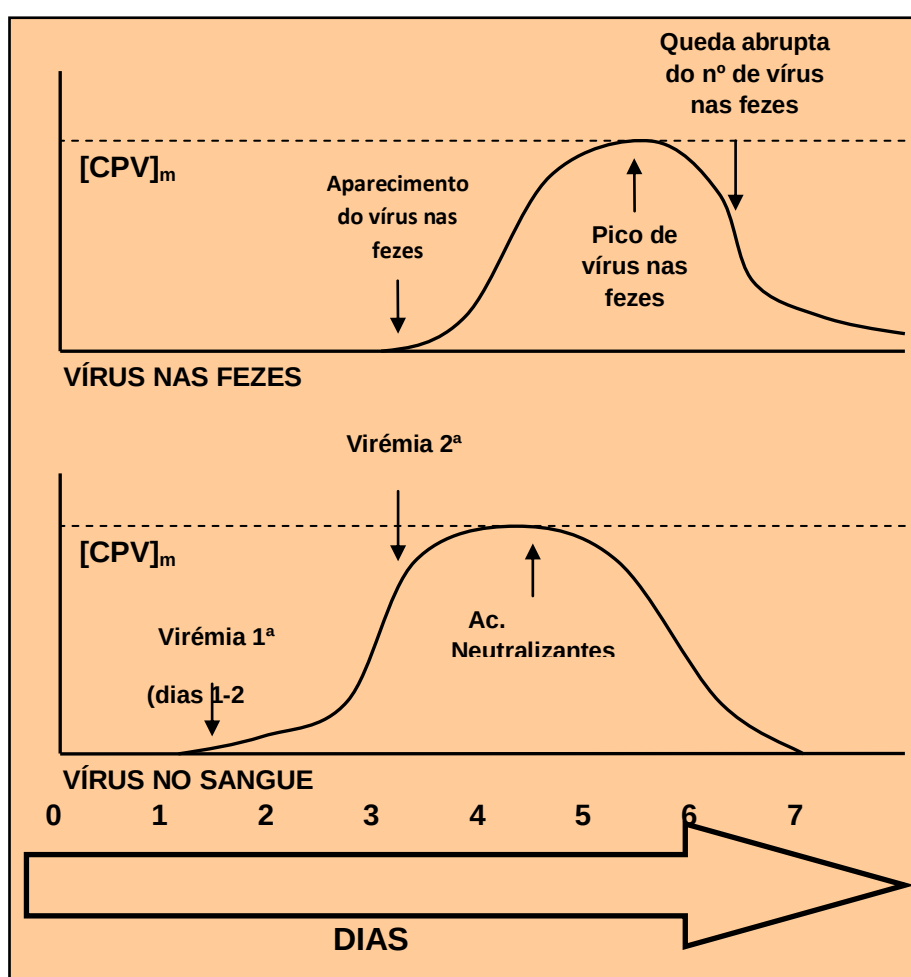


Figura 17 – Relação da quantidade de vírus no sangue e nas fezes durante os primeiros dias pós-infecção. Legenda: [CPV]_{ma}: Concentração máxima de CPV; Ac: Anticorpos. No caso das fezes, a concentração máxima de vírus é atingida aos 5 ou 6 dias P.I. e é da ordem dos 10^9 TCID₅₀/g de fezes. No caso do sangue a concentração máxima de vírus é atingida após o início da virémia secundária (ao 3º ou 4º dia P.I.) e é da ordem dos 10^6 TCID₅₀/ml de sangue. Estes dados foram obtidos através do estudo de uma infecção experimental por CPV (Adaptado de Macartney et al., 1984b; Oliveira, 2001).

A morte ocorre por desidratação, desequilíbrios electrolíticos, choque endotóxico, ou septicémia relacionada com a destruição da mucosa intestinal e com a leucopenia. Em casos de infecção grave por CPV, pode desenvolver-se um quadro de resposta inflamatória sistémica (SIRS), ou de síndrome de stress respiratório agudo (ARDS), secundários a translocação bacteriana intestinal de agentes microbianos como a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. e *Campillobacter* spp. (Prittie, 2004). A bacteriémia não é essencial para o desenvolvimento de ARDS, nem de SIRS. As endotoxinas, através do estímulo para a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o factor de necrose tumoral (TNF), são um potente mediador da resposta inflamatória sistémica. A libertação de TNF e interleucina 1 (IL 1), entre outros, na circulação provoca vasodilatação periférica, aumento da permeabilidade capilar, depressão da função cardíaca e activação da cascata de coagulação (Prittie, 2004).

4.3 - Transmissão

Os objectos contaminados com fezes contendo vírus são importantes fontes de disseminação da infecção, podendo o vírus ser transportado nas mãos e vestuário de pessoas em contacto com material infectado (Guilford, 1996; Timoney et al., 1992; Parrish, 1999).

A existência de animais que sofrem infecção subclínica assume grande importância na disseminação desta doença. Estes animais excretam quantidades substanciais de vírus e podem ser importantes fontes de contágio (McCaw e Hoskins, 2006). Outros importantes reservatórios da doença são os cães vadios, os canídeos selvagens e os gatos, já que estes últimos também são susceptíveis à infecção subclínica, ou podem apresentar sintomatologia muito ligeira (Truyen et al., 1995; Truyen et al., 1996).

Em geral, os cães que recuperam da doença não a transmitem a outros cães (McCaw e Hoskins, 2006). A resposta imune mediada por anticorpos é bastante eficaz na maioria dos hospedeiros infectados por CPV2, FPV e pelo Parvovírus B19 e o vírus desaparece do organismo em poucos dias, após o desenvolvimento da resposta imune. No entanto, outros parvovírus, incluindo os parvovírus dos roedores, permanecem no organismo, mesmo depois de originarem uma forte resposta imune. Alguns parvovírus dos roedores persistem no rim e são libertados na urina por longos períodos de tempo. No caso do Parvovírus B19, é possível detectar por PCR ADN viral anos após a infecção inicial, apesar de não

ser claro se ocorre replicação vírica. Também é possível encontrar excreção persistente no caso de infecções por parvovírus porcino (Schackelton et al., 2007). Ikeda et al. (2002), observaram que os novos subtipos de CPV podem persistir em gatos infectados, ao identificar CPV2a e CPV2b em gatos clinicamente assintomáticos. Battilani et al. (2007), consideram a mesma hipótese, ao observar casos de co-infecção com duas estirpes de CPV num cão e num gato.

4.4 - Alterações Patológicas

As lesões características da infecção por CPV são a necrose das células em rápida divisão na medula óssea, no epitélio das vilosidades intestinais e tecidos linfóides (Robinson, 1980). Parece haver uma correlação positiva entre os sinais clínicos e a magnitude e extensão da virémia e entre esta e a extensão da necrose do epitélio intestinal (Meunier et al., 1985b). Assim, a extensão das lesões tecidulares determinam a gravidade da doença clínica e é dependente da quantidade de vírus que chega do sangue aos intestinos, na virémia secundária. Da mesma forma, a extensão da infecção e destruição dos tecidos linfóides é mais acentuada em animais sintomáticos (Meunier et al., 1985b). Os folículos linfóides das placas de Peyer's podem mostrar necrose de coagulação e hemorragia (Meunier et al., 1985b; Smith-Carr et al., 1997).

A variação na gravidade das alterações hematológicas parece ser o reflexo da extensão da necrose do tecido linfóide, mais do que o reflexo do efeito do CPV na medula óssea. A linfopenia é a alteração mais consistente e é mais pronunciada em animais com infecção sintomática. Alguns estudos sobre os efeitos da infecção por parvovírus na medula óssea não conseguiram discriminar se a panleucopenia observada em alguns animais se devia ao efeito directo do vírus na medula óssea ou ao efeito de toxinas bacterianas na mesma (Meunier et al., 1985b; Macintire e Smith-Carr, 1997).

A replicação vírica dentro das células das vilosidades intestinais leva ao colapso do epitélio e atrofia das vilosidades. As lesões podem ser focais ou segmentares e são mais graves no íleo e no jejuno. As lesões clássicas incluem necrose do epitélio acompanhado por colapso da lâmina própria, resultando em criptas cheias de tecido necrótico e detritos celulares (Figura 18). No entanto, mesmo em

casos graves, a regeneração do epitélio intestinal ocorre, havendo um período de curta duração (renovação epitelial ocorre em 1 a 3 dias) em que se verifica má-absorção e enteropatia com perda de proteína (Macintire e Smith-Carr, 1997; Smith-Carr et al., 1997).

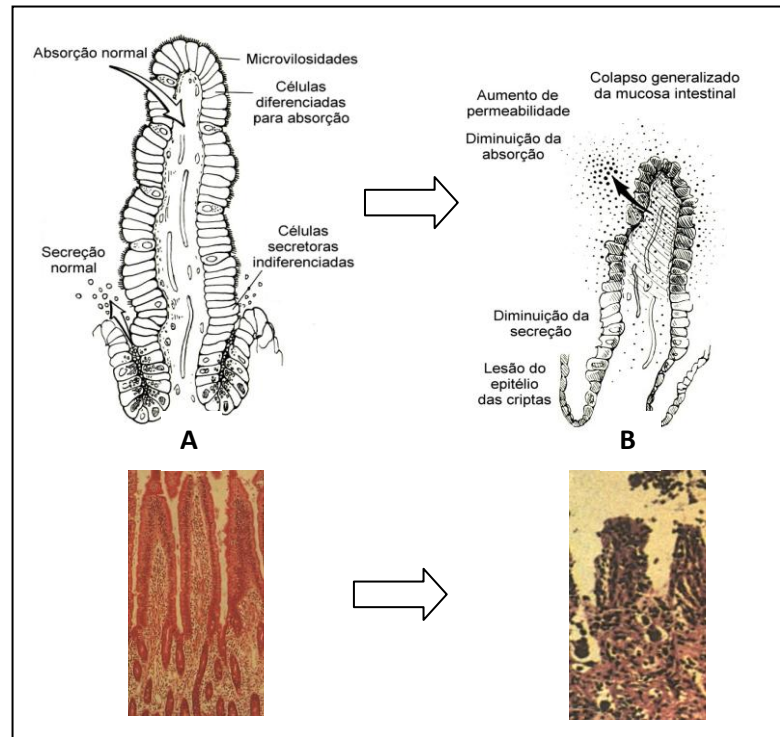


Figura 18: Patogenicidade da diarreia nos casos de enterite por CPV representada ao nível das vilosidades intestinais. Legenda – Em cima observam-se os esquemas histológicos das vilosidades e criptas intestinais no cão normal (A) e no cão com infecção por CPV (B). Em baixo observam-se as imagens histológicas correspondentes. Na imagem histológica B é visível o infiltrado inflamatório e o desnudamento da mucosa intestinal, praticamente sem enterócitos diferenciados. Observa-se também a acumulação de detritos celulares nas criptas, resultantes das células infectadas pelo CPV. (Adaptado de Pollock e Carmichael, 1990; Dattee et al., 1999; Oliveira, 2001).

5 – IMUNIDADE

5.1 – Imunidade Inespecífica

5.1.1 – Cinética Leucocitária

O CPV é responsável pela destruição de células hematopoiéticas precursoras de vários leucócitos, quer na medula óssea, quer em órgãos linfoproliferativos

(Weiss et al., 1999 e Goddard et al., 2008). Dada esta destruição, é comum os cães com infecção por CPV apresentarem leucopenia (pelo menos 85% dos animais apresentam durante o tempo de infecção valores totais de leucócitos abaixo dos normais). Apesar de ser considerado um dado característico desta patologia, a verdade é que está presente em menos de metade dos animais na altura da sua admissão hospitalar (Prittie, 2004). A leucopenia observada na parvovirose canina é sobretudo devida à neutropenia e à linfopenia. A neutropenia deve-se à destruição de células mitoticamente activas, como os mieloblastos, pela acção directa do vírus a nível da medula óssea (Goddard et al., 2008). A produção ineficiente de neutrófilos é evidenciada pela fagocitose dos neutrófilos a nível medular. Por outro lado, há perda massiva de leucócitos pela parede intestinal (Goddard et al., 2008). A linfopenia é o achado mais consistente e ocorre devido à destruição e depleção de linfócitos e atrofia do tecido linfóide provocadas pelo CPV (Meunier et al., 1985b; McCaw et al., 2006 e Goddard et al., 2008). A linfopenia tem tendência a ser mais pronunciada em animais sintomáticos (Meunier et al., 1985b).

Na panleucopenia secundária à parvovirose, verifica-se monocitopenia, seguida de monocitose, precedendo o retorno da contagem de neutrófilos ao normal em caso de convalescença (Goddard et al., 2008). A presença de eosinopenia que ocorre nos casos de infecção por CPV pode estar relacionada com a linfopenia, dado que são os linfócitos T que produzem interleucinas (IL), nomeadamente a IL1 e IL5 que estimulam a eosinopoiese (Goddard et al., 2008).

Em animais convalescentes é comum encontrar-se leucocitose e hiperplasia da medula óssea (McCaw e Hoskins, 2006).

5.1.2 – Mediadores inflamatórios

As infecções agudas causam lesão tecidular, associada aos diversos estímulos inflamatórios e resultam em alterações graves em termos humorais e celulares. Estas alterações são denominadas no seu conjunto como resposta de fase aguda (Schultz e Arnold, 1990). Esta resposta é responsável pela sobrevivência do hospedeiro e faz parte do sistema imune inato (Cerón et al., 2005). A resposta de fase aguda é caracterizada pelo desencadear de vários mecanismos sistémicos, incluindo a febre, a leucocitose, aumento do cortisol plasmático e diminuição da concentração de tiroxina, alterações metabólicas (ex: lipólise, gluconeogénese, catabolismo muscular) e diminuição das concentrações do ferro e zinco séricos.

Este mecanismo também inclui alterações nas concentrações de determinadas proteínas plasmáticas, chamadas de proteínas de fase aguda. Algumas sofrem diminuição da sua concentração, as proteínas de fase aguda negativas (ex: albumina ou transferrina), enquanto outras aumentam a sua concentração (ex: proteína C reactiva (ProtCR), proteína amilóide A sérica (SAA), α 1-glicoproteína (α -1AG), haptoglobina, ceruloplasmina e o fibrinogénio. (Schultz e Arnold, 1990 e Cerón et al., 2005).

Estas proteínas de fase aguda são reguladas por inúmeras citocinas, nomeadamente IL e factor de necrose tumoral (TNF) (Schultz e Arnold, 1990). As principais citocinas pró-inflamatórias são a IL-6, a IL-1 e o TNF- α (Cerón et al., 2005). A elevação das concentrações destas proteínas pró-inflamatórias pode ter um efeito preditivo da infecção clínica e prognóstico (Yule et al., 1997). Como exemplo de citoquina supressora da resposta inflamatória, temos a IL-10 (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). Em estudos em seres humanos, a sobreprodução de IL-10 é um dos melhores factores a predizer a gravidade e um prognóstico fatal em animais com sépsis grave (Gogos et al., 2000).

O desequilíbrio entre a expressão das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias pode determinar o prognóstico em pacientes com septicémia e síndrome de resposta inflamatória sistémica (Kjelgaard-Hansen et al., 2007).

Como nas fases iniciais da infecção por CPV ocorre leucopenia, a medição das proteínas de fase aguda pode permitir a avaliação do processo inflamatório (Kogika et al., 2003)

A presença de endotoxinas e activação subsequente da cascata de citocinas são importantes na fisiopatologia da enterite por CPV (Otto et al., 1997). A destruição das células das criptas das vilosidades intestinais e a libertação de lipopolissacarídeos e outros produtos bacterianos na circulação sanguínea induzem a libertação de IL-1, IL-8, TNF- α e interferão- γ (Yule et al. 1997).

O interferão- γ , também conhecido como interferão tipo II, é uma citoquina imunorreguladora. Tem um papel muito importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro, ao exercer uma actividade anti-vírica, antiproliferativa e imunorreguladora. Uma das funções mais importante está relacionada com a activação dos macrófagos e diferenciação dos linfócitos “T-helper” (Paludan, 1988).

A infecção por CPV origina um aumento da produção de TNF. Otto et al. (1997), verificaram que este aumento não era observado em todos os casos de infecção por CPV. Esta variabilidade poderia estar relacionada com o curto tempo de semi-

vida do TNF e com a presença de inibidores do TNF em circulação. Constataram também que não existe uma correlação entre a actividade do TNF e a gravidade da doença, apesar do seu aumento ter sido um factor preditivo de morte.

Yule et al. (1997), observaram que, no caso de infecção por CPV, ocorre um aumento da α -1AG e da SAA simultâneo ao aparecimento dos sinais clínicos e à excreção vírica nas fezes, correlacionando-se o seu doseamento com a gravidade dos sinais clínicos e com a quantidade de vírus excretado nas fezes. Kogika et al. (2003), determinaram que cães com gastroenterite hemorrágica por CPV e durante a fase leucopenia apresentam concentrações elevadas de haptoglobulina, ceruloplasmima e α -1AG.

5.2 – Imunidade Específica

5.2.1 – Humoral

Os títulos de anticorpos séricos podem ser detectados tão precocemente como no dia 3 a 4 PI, alcançando o seu valor máximo entre o 7º e 10º dia PI. Estes anticorpos podem manter-se de forma elevada e constante pelo menos durante um ano (McCaw e Hoskins, 2006). É a acção destes anticorpos neutralizantes a responsável pelo término da virémia secundária (Guilford, 1996). A presença destes anticorpos séricos pode, por si só, conter o processo infeccioso ao prevenir a disseminação do vírus para locais de replicação secundários, como os intestinos (Rice et al., 1982). Um atraso na cessação da virémia está relacionado com a presença de infecções sintomáticas, pois verificou-se que nos animais em que há uma virémia de curta duração, não ocorrem sinais clínicos. O prolongamento da virémia pode aumentar a exposição do epitélio intestinal ao vírus e resultar numa infecção mais extensa e com lesões mais graves (Meunier et al., 1985b).

5.2.2 – Local

A imunidade da mucosa intestinal, com a formação local de anticorpos intestinais, desempenha um papel importante na diminuição da excreção do vírus (McCaw e Hoskins, 2006). As imunoglobulinas A (Ig A) aparecem na mucosa intestinal no 4º dia PI.

Uma combinação entre a imunidade humoral e a imunidade local são necessárias para uma protecção completa. Apesar da imunidade humoral diminuir a gravidade da doença ao limitar a virémia, permite, no entanto, a replicação do CPV no intestino. Sem os coproanticorpos, o animal pode tornar-se um portador inaparente de CPV (Rice et al., 1982). Rice et al. (1982), observaram que os animais com menor título de coproanticorpos apresentavam títulos de HA maiores e que não diminuía ao fim de 2 semanas após o aparecimento dos sinais clínicos, sugerindo que, sem coproanticorpos suficientes, a replicação do CPV poderia persistir por períodos variáveis, resultando num estado de portador crónico. Alguns cães podem desenvolver altos títulos séricos contra CPV, mas baixos títulos de IgA no lúmen intestinal. Estes animais estão mais susceptíveis a doença grave (Lobetti, 2003). A presença de anticorpos nas fezes está relacionada, de forma directamente proporcional, com títulos de HA menores (menor quantidade de vírus) e com um melhor prognóstico (Rice et al., 1982). A resistência imunológica à infecção da mucosa pode mesmo existir na ausência de anticorpos séricos detectáveis (Bienenstock e Befuo, 1980).

6 – INCIDÊNCIA E FACTORES PREDISPOONENTES

Os surtos iniciais de parvovirose em cães eram caracterizados por alta morbilidade e mortalidade em todos os grupos etários. Actualmente a doença é mais frequente em cachorros das seis semanas aos seis meses de idade (Smith-Carr et al., 1997). A maioria dos cães adultos estão imunizados, quer através da vacinação, quer por infecção natural prévia. A imunidade é passada aos neonatos através dos anticorpos maternos. Assim, os cachorros tornam-se mais susceptíveis à medida que os anticorpos maternos diminuem para títulos não protectores (Prittie, 2004). Parece existir uma janela de tempo, durante a qual os anticorpos maternos bloqueiam uma resposta imune efectiva à vacina contra CPV, mas não podem evitar a infecção por CPV, sendo esta fase de grande susceptibilidade à infecção por CPV (Pollock e Carmichael, 1982; O'Brien, 1994; Smith-Carr et al., 1997).

Os factores que predis põem a infecção em cachorros por CPV são a falta de imunidade humoral protectora, a presença de parasitismo gastrointestinal, a

sobrepopulação e condições ambientais inadequadas e indutoras de stresse (Smith-Carr et al., 1997).

Em cães adultos, a infecção por parvovírus costuma ser inaparente, sendo que animais com mais de um ano não são normalmente susceptíveis à infecção por CPV, mas actualmente têm sido descritos casos de infecção por CPV em animais mais velhos e vacinados (Decaro et al., 2008).

Algumas raças parecem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de sinais clínicos associados a esta doença, independentemente do nível de anticorpos protectores. Algumas dessas raças são o Rottweiler, Doberman Pinscher, Labrador Retriever, German Shepherd, Springer Spaniel, Pit Bull Terrier e Yorkshire Terrier. As raças que aparentemente se encontram em menor risco são o Cocker Spaniel e o Toy Poodle (Glickman et al., 1985; Smith-Carr et al., 1997). A susceptibilidade dos Rottweilers parece estar ligada a uma imunodeficiência hereditária e a alta prevalência de doença de von Willebrand's, sendo esta última também a explicação plausível para a predisposição a infecção mais grave por parte dos Dobermans Pinscher (Prittie, 2004). No estudo de Kalli et al., (2010) não foi possível associar uma predisposição a infecção por CPV a nenhuma raça em especial.

A incidência anual parece variar consoante a zona geográfica. Houston et al. (1996), refere que no Canadá o pico de aparecimento de novos casos ocorre no mês de Julho, Agosto e Setembro. Já Popischell, citado por Smith-Carr et al. (1997), refere que na Alemanha o pico de casos ocorre durante os meses de Novembro, Dezembro e Janeiro. Em todos os estudos, a população canina com menos de 6 meses de idade era a que se encontrava em maior risco de desenvolver a doença (Houston et al., 1996; Smith-Carr et al., 1997).

7 – SINAIS CLÍNICOS

As manifestações clínicas da infecção por parvovírus canino são muito variáveis. Alguns factores que parecem estar implicados nesta variação são a própria susceptibilidade do hospedeiro, a idade do animal, a carga viral a que é sujeito, o

tempo e a magnitude da virémia e a taxa de renovação do epitélio intestinal (Macintire et al., 1997).

Quando surgiu, a patologia provocada pelo parvovírus canino caracterizava-se pela presença de miocardite nos cachorros recém-nascidos e pela presença de vômito e diarreia em cães com mais de 6 semanas de idade (Parrish, 1999). Os sinais clínicos de **miocardite** eram decorrentes das graves arritmias, resultando em morte súbita, ou morte após um breve período de dispneia. Arritmias subclínicas eram muitas vezes detectadas por electrocardiografia em animais afectados (Robinson et al., 1979; Robinson et al., 1980). Os cães com esta forma da doença morriam de edema pulmonar agudo, secundário a insuficiência cardíaca congestiva, manifestando de forma repentina dispneia (Humm e Hughes, 2009).

Actualmente, os sinais associados a **enterite** por CPV podem ser não específicos, tais como anorexia, depressão e febre. No entanto, a grande maioria dos animais acaba por desenvolver sinais gastrointestinais como vômito e diarreia (de mucóide a hemorrágica) dentro de 24 a 48 horas desde o início da sintomatologia (Robinson et al., 1980; Prittie, 2004).

Em casos ligeiros, principalmente em cães adultos, pode não ser observada diarreia. Esta particularidade deve ser levado em conta quando se elabora uma lista de diagnósticos diferenciais em animais com sinais inespecíficos e com ou sem vômito (Humm e Hughes, 2009). Este facto pode ter relevância, pois nem sempre a apresentação clínica da infecção por parvovírus é evidente e esta patologia não deve ser descartada dos diagnósticos diferenciais de animais susceptíveis com base na ausência de vômito ou diarreia.

Devido à grande perda de fluidos e proteínas pelo sistema gastrointestinal, é frequente estes animais apresentarem desidratação e, por vezes, sinais de choque hipovolémico (alterações de estado mental, tempo de repleção capilar aumentado, taquicardia, pulso fraco, extremidades frias, hipotermia).

No exame físico, pode ser evidente a presença de dor abdominal secundária ao quadro de gastroenterite aguda ou a uma intussuscepção intestinal (Prittie, 2004). Em casos de SIRS, endotoxémia e septicémia, é possível observar sinais de choque distributivo e alterações da coagulação, nomeadamente a presença de petéquias e mucosas congestivas (Humm e Hughes, 2009).

8- PROGNÓSTICO

No estudo realizado por Glickman et al. (1985), a taxa de sobrevivência geral para cães com diagnóstico de parvovirose canina era de 65% e, neste estudo a taxa de sobrevivência não apresentava qualquer associação com nenhum dos sinais clínicos. Mas várias taxas de mortalidade têm sido descritas, desde 21% (Mann et al., 1998), 16% a 35% (Guilford, 1996) e 36% (Glickman et al., 1985). No estudo de Vieira et al. (2011), a taxa de mortalidade em 104 casos de gastroenterite por CPV em amostras colhidas em Portugal, durante o período de 2006 a 2009, foi de 22%. Com terapia imediata e tratamento de suporte é possível em determinadas instituições atingir taxas de sobrevivência da ordem dos 85 a 96% (Macintire e Smith-Carr, 1997; Otto et al., 2001). Quando comparadas as taxas de sobrevivência em clínicas veterinárias com as de hospitais com cuidados intensivos, foi possível observar um aumento da taxa de sobrevivência e um aumento da duração da hospitalização (média de 3 dias para 6 dias, respectivamente) associada aos casos hospitalares (Otto et al., 2001). Dadas as consequências da infecção por CPV e os elevados custos terapêuticos associados ao tratamento desta doença, os indicadores de prognóstico tornam-se muito úteis na abordagem clínica destes animais.

A idade e a gravidade dos sinais clínicos podem ser utilizadas como factor de prognóstico, uma vez que a ausência de vômito e uma menor idade estão associadas a uma menor probabilidade de sobrevivência (McCaw et al., 1996). A presença de sinais de SIRS na apresentação clínica foi relacionada com uma maior mortalidade e gravidade da infecção (Kalli et al., 2010).

As alterações hematológicas podem também ser úteis como indicadores de prognóstico. Segundo Goddard et al. (2008), apenas a monocitopenia estava relacionada com um mau prognóstico na apresentação inicial, enquanto que uma contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e eosinófilos superiores a 4500/ μ l, 1000/ μ l, 150/ μ l e 100/ μ l, respectivamente tinha um alto valor predictivo em relação à sobrevivência. Vários dados contraditórios têm sido apresentados sobre a relação entre o grau de leucopenia e o prognóstico. Considera-se que, mais do

que o valor absoluto, a variação da contagem de leucócitos ao longo do tempo (especialmente a contagem de linfócitos) é a forma mais confiável de estabelecer um prognóstico (Kalli et al., 2010). Não foram descritas quaisquer alterações dos parâmetros bioquímicos que se relacionassem com o prognóstico e fossem capazes de predizer a morte.

Os níveis séricos de cortisol basal e de tiroxina podem ser usados como indicadores de prognóstico. Em cães com infecção com CPV verificou-se que um aumento dos níveis séricos de cortisol basal acompanhados de uma diminuição das concentrações séricas de tiroxina, nas primeiras 24 a 48 horas, após a admissão, estão fortemente correlacionadas com o aumento da mortalidade (Schoeman et al., 2007; Goddard et al., 2008).

8.1 - Associação a outras infecções

A gravidade e progressão da infecção por CPV podem ser mais significativas em animais com alterações da barreira gastrointestinal, nomeadamente nos casos de parasitismo intestinal e infecção por coronavírus canino (CCoV) (Smith-Carr et al., 1997; Prittie, 2004).

O CCoV é considerado um agente pouco patogénico para o cão, originando infecções subclínicas ou com sinais muito ligeiros. No entanto, têm sido detectadas estirpes hipervirulentas que podem causar diarreia hemorrágica, ou exacerbar doenças causadas por outros agentes, nomeadamente pelo CPV (Decaro et al., 2009). Sabe-se, através de estudos experimentais, que a gravidade dos sinais clínicos é mais pronunciada em cães com infecção simultânea de CPV e CCoV, quando comparado com infecção apenas com CPV (Apple, 1988). A presença de CCoV pode exacerbar a apresentação clínica de infecções concorrentes por CPV, ao provocar uma maior lesão nas vilosidades intestinais e ao aumentar a actividade mitótica das células das criptas intestinais (Pratelli et al. 1999; Decaro et al., 2006c).

Vieira et al. (2011), observaram que 41% dos animais com sinais gastrointestinais apresentavam infecção dupla com CCoV e CPV e que esta associação estava relacionada com uma taxa de mortalidade superior, comparativamente aos casos de infecção única por CPV. Neste estudo, não se verificou qualquer relação entre a infecção por CCoV e determinado subtipo de CPV.

8.2 - Relação entre subtipos de CPV

De um ponto de vista clínico, os estudos que relacionam o subtipo de vírus e a gravidade dos sinais clínicos e prognóstico têm sido contraditórios. Alguns sugerem que o CPV2c é mais patogénico que as variantes CPV2a e CPV2b (Buonavoglia et al., 2001; Pérez et al., 2007), enquanto outros descrevem sinais clínicos menos graves e taxas de mortalidade mais baixas associadas a infecção por CPV2c (Decaro et al., 2005a).

Moon et al. (2008), comparou a patogenicidade dos subtipos CPV2a e CPV2b e verificou que o CPV2a era mais patogénico e causava doença mais grave. Já Hong et al. (2007) e Vieira et al. (2008b) não encontraram diferenças entre a gravidade e prognóstico em animais infectados com as diferentes estirpes de CPV, nem demonstraram qualquer associação entre os subtipos, a raça e a idade. Estudos da distribuição do CPV nos tecidos afectados demonstraram padrões de distribuição similares em cães infectados pelos subtipos CPV2a, CPV2b e CPV2c, revelando que estas variantes têm o mesmo comportamento biológico (Decaro et al., 2007b).

A infecção por CPV costuma afectar cães com menos de um ano, mas tem sido verificada a infecção, com o sub tipo CPV2c, de cães com mais de um ano de idade e vacinados (Decaro et al., 2008; Calderon et al., 2009).

O papel das co-infeccções na evolução clínica e prognóstico está pouco estudado, mas no estudo de Vieira et al. (2001), não se demonstraram diferenças significativas na gravidade, duração ou taxa de mortalidade em animais com co-infecção CPV2b/2c, quando comparados com animais com infecção com apenas um dos subtipos.

9 – DIAGNÓSTICO

Um diagnóstico rápido da infecção por CPV2 é especialmente importante, já que permite não só isolar os animais infectados e adquirir medidas preventivas, mas também porque, quanto mais cedo se iniciar a terapia, melhor o prognóstico (Desario et al., 2005b).

9.1 - Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da infecção por CPV faz-se pela associação entre a história clínica, os sinais clínicos característicos e as alterações encontradas em exames sanguíneos (Strottmann et al., 2008).

A apresentação clínica mais frequente ocorre em cães jovens que se apresentam à consulta com vômito, diarreia (por vezes hemorrágica), febre, desidratação, dor abdominal e em casos graves, sinais de choque (Strottmann et al., 2008).

Os exames hematológicos, podem indicar linfopenia como resultado directo da linfocitólise, sendo este o achado mais consistente na fase inicial da doença. Por vezes, é seguida de neutropenia devido a consumo periférico e destruição dos precursores dos leucócitos na medula óssea (Humm e Hughes, 2009). Apesar da leucopenia ser considerado um dado característico desta doença, a verdade é que está presente em menos de metade dos animais infectados, na altura da sua admissão hospitalar (Prittie, 2004). Se forem efectuados leucogramas seriados ao longo do curso clínico da doença, é possível detectar leucopenia em cerca de 85% dos casos (McCaw e Hoskins, 2006). Nestes casos, a contagem total de leucócitos baixa progressivamente, começando entre o 3º e o 5º dia P.I., podendo baixar até valores da ordem dos 500 a 2000/ μ l, ou ainda menores. A intensidade da leucopenia pode ser proporcional à gravidade da doença clínica, sendo habitual uma leucocitose como sinal de recuperação eminente (McCaw e Hoskins, 2006). Em casos graves, pode ainda ocorrer pancitopénia. A anemia ocorre secundariamente à perda gastrointestinal, no caso de diarreia hemorrágica grave (Macintire e Smith-Carr, 1997). Quando a infecção é complicada por coagulação intravascular disseminada (CID), é possível observar trombocitopénia, aumento do tempo de coagulação, aumento do tempo de protrombina e aumento do tempo de tromboplastina parcial activada. É importante ter em conta que um hemograma normal não exclui a possibilidade de enterite por CPV, já que há animais com doença grave que não apresentam leucopenia significativa e existem muitos animais infectados (cerca de 15% do total) que não chegam a apresentar leucopenia no decurso da doença (McCaw e Hoskins, 2006).

É possível também, observar hipercoaguabilidade em casos de enterite por CPV, sem coagulação intravascular disseminada (CID), devido a hiperfibrinogénemia e redução da actividade antitrombina (Humm et al., 2009).

Os resultados das análises bioquímicas efectuadas a estes pacientes são variáveis e inespecíficos. As alterações bioquímicas incluem hipoproteïnemia (secundária a enteropatia e aumento da permeabilidade vascular secundária a SIRS), hiperbilirrubinemia, aumento da concentração sérica das enzimas hepáticas (hipóxia hepática secundária a hipovolémia), hipocalémia (por vômito e anorexia), hipoglicémia e azotémia pré-renal (secundária a desidratação) (Macintire e Smith-Carr, 1997; Humm e Hughes., 2009; Kalli et al., 2010).

O diagnóstico imagiológico pretende descartar outras causas de vômito e diarreia, tais como obstruções intestinais, mas os resultados costumam ser inespecíficos, traduzindo sinais de ílio paralítico, com distensão das ansas do intestino delgado (Humm e Hughes, 2009).

O diagnóstico clínico da infecção por CPV é muitas vezes não definitivo, pois muitos outros agentes patogénicos podem causar diarreia em cães, podendo sub ou sobrestimar a prevalência da infecção por parvovírus em relação a outras doenças com sinais clínicos semelhantes (Strottmann et al., 2008). Assim, um diagnóstico clínico deve sempre ser confirmado por testes laboratoriais (Desario et al., 2005).

9.2 - Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção por parvovírus consiste na detecção do CPV nas fezes de cães infectados, o seu isolamento em cultura de tecidos e na detecção de anticorpos contra o vírus (Kumar e Nandi, 2010).

Várias técnicas têm sido descritas como forma de identificação da infecção por CPV, nomeadamente o isolamento de vírus, microscopia electrónica, técnicas de hemaglutinação directa, teste de “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), imunocromatografia, reacção em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (RealT-PCR).

9.2.1 – Métodos de detecção do CPV

9.2.1.1 - Isolamento do vírus

Para o isolamento do vírus é necessário utilizar culturas celulares onde este se possa propagar. É uma técnica demorada, que necessita em média cerca de 5 a 10 dias de período de incubação e posterior detecção do antigénio por técnicas de imunofluorescência (IF) ou por testes de hemaglutinação (HÁ) (Desario et al., 2005). A maior desvantagem desta técnica é a sua baixa sensibilidade, possivelmente pela presença de anticorpos no lúmen intestinal que se ligam às partículas víricas, impedindo que estas se liguem aos receptores celulares e infectem as células (Desario et al., 2005).

9.2.1.2 - Microscopia Electrónica

Actualmente a microscopia electrónica para visualização e identificação de partículas víricas de CPV perdeu a sua utilidade diagnóstica, porque é uma técnica laboriosa e demorada e também porque está dependente da existência de equipamento sofisticado, sendo apenas utilizada com fins académicos, ou de investigação (Mathys et al., 1983).

9.2.1.3 – Testes de Hemaglutinação (HA)

Em condições ideais de pH (pH 6.5) e temperatura (4°C) o CPV aglutina eritrócitos de várias espécies animais (Fenner et al., 1993). Esta propriedade pode atenuar-se, ou mesmo perder-se após passagens prolongadas do vírus em culturas de células (McCaw e Hoskins, 2006). Contudo, em amostras fecais recentes, é possível aplicar a aglutinação para detecção do CPV (McCaw e Hoskins, 2006), preferencialmente utilizando eritrócitos de suíno ou de macaco rhesus, sendo o último mais difícil de obter e mais dispendioso (Fenner et al., 1993; Desario et al., 2005). Os eritrócitos de suíno demonstraram ter uma especificidade e sensibilidade superiores, quando comparados com outros tipos de eritrócitos, nomeadamente os de primatas não humanos (Casseb et al., 2009). Os eritrócitos de cavalo e gato também sofrem aglutinação, mas em menor grau que os

eritrócitos de suíno e macaco rhesus. Os eritrócitos de vaca, galinha, humano tipo O, ovelha, cabra, rato e porquinho-da-índia não sofrem aglutinação (Carmichael et al., 1980). Este teste é realizado numa placa de 96 poços, o que permite o processamento de várias amostras de forma simultânea e os resultados são obtidos ao fim de 4 horas (Desario et al., 2005).

Os títulos de HA nas fezes de cães com infecção por CPV começam a subir no 3º a 4º dia PI. A partir do 5º dia PI, os títulos de HA são superiores a 1:10000, mas a partir do 9º dia PI já não é possível detectar qualquer tipo de actividade de HA (Carmichael et al., 1980).

Este procedimento apresenta, no entanto, várias desvantagens. A presença de hemaglutininas inespecíficas a baixas diluições, em algumas amostras fecais, pode diminuir a fiabilidade do teste, devendo a especificidade da hemaglutinação ser confirmada pelo uso de testes de inibição da hemaglutinação (IHA) com um antisoro específico contra CPV. Sabe-se actualmente que algumas estirpes do CPV2 possuem actividade hemaglutinante mínima ou ausente, o que diminui a capacidade do teste para a detecção do CPV (Desario et al., 2005). Por último, é necessária uma fonte contínua de eritrócitos, que só podem ser armazenados durante 2 a 3 semanas (Mathys et al., 1983).

9.2.1.4 - Teste ELISA e Imunocromatografia

Estes métodos de diagnóstico são os mais utilizados na prática clínica, pois são rápidos e simples de executar e podem ser realizados nos próprios centros de atendimento médico-veterinários. Detectam a presença de partículas víricas nas fezes, não distinguindo o subtipo de parvovírus em questão, nomeadamente a diferenciação entre as estirpes de campo e as estirpes vacinais. São, no entanto, uma ferramenta útil no rastreio inicial de animais suspeitos de infecção por CPV (Vieira et al, 2011). Contudo, é necessário que haja uma quantidade de antigénio na amostra suficiente para formar um complexo visível, na forma de banda colorimétrica evidente, podendo a interpretação dos testes ser influenciada pela subjectividade do operador do teste (Esfandiari e Klingeborn, 2000; Desario et al., 2005). Apesar destes factos, estes testes apresentam uma maior especificidade e sensibilidade do que os testes de Hemaglutinação e são mais fáceis de usar (Lacheretz et al., 2003).

Nas infecções por parvovírus, as partículas víricas são libertadas nas fezes desde, aproximadamente, o 3º dia PI até ao 12º dia PI e podem ser detectadas no pico de excreção vírica (4º a 7º dias PI). A altura ideal para utilizar estes testes, como meio de diagnóstico, é entre o 4º e o 8º dia PI, o que corresponde geralmente aos primeiros 2 a 4 dias após o início dos sinais clínicos. Reacções falso-positivas podem ocorrer quando se utilizam estas técnicas em animais vacinados com vacinas vivas modificadas, nos 3 a 10 dias prévios à execução do teste. Os falsos negativos ocorrem devido à ligação entre anticorpos neutralizantes e as partículas víricas a nível do intestino, na fase inicial da infecção, ou pela ausência/diminuição da excreção viral (Prittie, 2004).

Os métodos descritos apenas permitem a detecção da presença de CPV nas amostras, não permitindo, no entanto, a sua tipificação. A caracterização das estirpes de CPV a circular numa dada região assume elevada importância, para a compreensão da sua virulência relativa, do impacto da vacinação, da alteração de situações epidemiológicas, da relação com países vizinhos e distribuição mundial (Touihri et al., 2009).

9.2.2 – Métodos de caracterização do CPV

A caracterização genotípica das estirpes de CPV é realizada apenas em laboratórios com tecnologia especializada. A maioria das técnicas não permite a identificação da estirpe de forma directa, sendo geralmente necessário mais do que um método (Desario et al. 2005). Para a caracterização das estirpes de CPV são geralmente utilizados anticorpos monoclonais (MAb), amplificação de ADN genómico por PCR convencional e sequenciação genética, PCR convencional e enzimas de restrição e RealT-PCR.

9.2.2.1 - Anticorpos monoclonais

Com o uso, por exemplo, de técnicas de Inibição da Hemaglutinação (IHA), utilizando anticorpos monoclonais direccionados para os diferentes subtipos de CPV, pode determinar-se o título de IHA como a diluição mais alta a partir da qual deixa de haver inibição da hemaglutinação. Esta técnica só pode ser usada em amostras de fezes com elevada actividade hemaglutinante (títulos de

hemaglutinação ≥ 64) ou com isolados de CPV2 obtidos a partir de propagação em cultura de células (Desario et al., 2005).

Foram descritos vários anticorpos monoclonais (Mabs), nomeadamente A3B10, B6D5, B4E1, A4E3, C1D1, B4A2 (Parrish e Carmichael, 1993), P2-215 (Horiuchi et al., 1997), 2G5, 21C3, 19D7 E 20G4 (Nakamura et al., 2004), com o objectivo não só de detectar a presença de CPV nas amostras, mas também de tipificar o subtipo de Parvovírus presente.

O Mab B4A2 permite distinguir o CPV2b do CPV2a, pois este anticorpo reconhece o CPV2a, mas não o CPV2b. Ao contrário, o Mab 21C3 reconhece o CPV2b, mas não identifica o CPV2a. Com o uso destes Mabs é possível de forma clara diferenciar o CPV2a do CPV2b (Nakamura et al., 2003). Com o uso de vários MABs (Quadro 2), é possível diferenciar o subtipo 2, 2a e 2b, mas o subtipo 2c não é identificado de forma directa (Desario et al., 2005). O CPV2c não mostra reactividade contra o Mab B4A2 (mostrando fenótipo CPV2b), mas a sua reactividade contra Mab 21C3 é cerca de 8 a 32 vezes inferior do que o CPV-2b. O mesmo acontece com o uso do Mab 19D7, em que a reactividade do CPV2c é 8 a 16 vezes menor, quando comparada com o CPV2b (Nakamura et al., 2004). Com o uso desta técnica, é também possível diferenciar o CPV do FPV, usando o Mab P2-215 (Horiuchi et al., 1997).

Anticorpos Monoclonais				
Vírus	A4E3	B4A2	C1D1	B4E1
CPV 2	+	+	-	+
CPV 2a	+	+	+	-
CPV 2b	+	-	+	-
CPV 2c	+	-	+	-

Quadro 2: Reactividade dos anticorpos monoclonais aos diferentes subtipos de CPV (Teste Inibição da Hemaglutinação) (Adaptado de Desario et al., 2005).

9.2.2.2 - PCR Convencional e Sequenciação

Ao contrário dos métodos anteriormente descritos, os métodos baseados na detecção do ADN de CPV por PCR mostraram ser altamente sensíveis (Desario et

al., 2005). Este tipo de técnica requer o uso de equipamento e reagentes especializado, mas permite obter resultados num curto espaço de tempo e com grande precisão. Com a aplicação da técnica de PCR amplifica-se o gene da VP2, cujo ADN pode ser posteriormente sequenciado para análise e subtipificação (Desario et al., 2005). Esta tipificação baseia-se na análise das variações aminoácídicas do gene da proteína da cápside VP2 (Quadro 3).

Variações Aminoácídicas da Proteína VP2										
Resíduo	80	101	297	300	305	375	426	555	564	568
Nucleótido	3026- 3024	3087- 3089	3675- 3677	3684- 3686	3699- 3701	3909- 3911	4062- 4064	4449- 4451	4476- 4478	4488- 4490
Codões		ATT(Ile)	TCT(Ser)	GCT(Ala)	GAT(Asp)	AAT(Asn)	AAT(Asn)	GTA(Val)		
Observados		ACT(Thr)	GCT(Ala)	GGT(Gly)	TAT(Tyr)	GAT(Asp)	GAT(Asp) GAA(Glu)	ATA (Ile)		
FPV	Lys	Ile	Ser	Ala	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV2	Arg	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn/Asp	Asn	Val	Ser	Gly
CPV2a	Arg	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV2b	Arg	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
CPV2c	ND	ND	Ala	Gly	Tyr	Asp	Glu	Val	ND	Gly

Quadro 3: Variações dos aminoácidos da proteína VP2 nos diferentes subtipos de CPV e FPV. Legenda: ND – não determinado (Adaptado de Steinel et al., 2001; Desario et al., 2005).

Vários métodos moleculares baseados nesta técnica foram desenvolvidos com a finalidade de identificar os subtipos de CPV 2, 2a e 2b (Senda et al., 1995; Pereira et al., 2000), os quais se baseiam na diferença de nucleótidos entre os primers utilizados e que se restringem a uma base na zona 3´terminal de cada primer (Desario et al., 2005).

O par de primers Pabs/Pabas e Ps2/P2as (Quadro 4) reconhecem os diferentes subtipos e o CPV original, respectivamente. O par de primers Pbs/Pbas (Quadro 4) reconhece o subtipo 2b, selectivamente. A amplificação diferencial do CPV2b é assegurada pela alteração de apenas um nucleótido na zona terminal 3´de cada primer (A/G na posição 4062 e G/A na posição 4449). Esta corresponde à zona de variação estratégica de aminoácidos Asn-426 para Asp e Ile-555 para Val que determinam as variantes antigénicas CPV2a e CPV2b. Assim, o CPV2a é reconhecido apenas pelos primers Pabs/Pabas, enquanto o CPV2b é reconhecido

por ambos os primers Pabs/Pabas e Pbs/Pbas (Pereira et al., 2000; Buonavoglia et al., 2001). Como o CPV2c apresenta uma variação Asp-426 Glu, que ocorre na 3^a posição do codão, no nucleótido 4064, estas variantes são erroneamente reconhecidas como CPV2b, usando estes primers. Assim, estas estratégias de PCR não permitem a exacta distinção entre subtipos de CPV (Buonavoglia et al., 2001). Outro aspecto que torna estes métodos pouco específicos é o facto de, ao existir apenas uma variação de um nucleótido na porção 3' terminal de cada primer, esta diferença não ser suficiente para evitar a amplificação de outros tipos de CPV2 (Desario et al., 2005). Dada esta limitação, actualmente recorre-se ao uso de outros primers (Hfor/Hrev e 555 for/555rev), com posterior sequenciação, de forma a ser possível realizar a tipificação (Quadro 4). Estes primers são seleccionados por amplificarem um fragmento grande da VP2 e incluírem pelo menos seis ou sete aminoácidos responsáveis por importantes propriedades biológicas do vírus (Buonavoglia et al., 2001).

Sequências de Primers – PCR convencional			
Primer *	Sequência (5' - 3')	Polaridade	Posição**
P2s^a	GAAGAGTGGTTGTAAATAATA	+	3025-3045
P2as^a	CCTATATCACCAAAGTTAGTAG	-	3706-3685
Pabs^b	GAAGAGTGGTTGTAAATAATT	+	3025-3045
Pabas^b	CCTATATAACCAAAGTTAGTAC	-	3706-3685
Pbs^b	CTTTAACCTTCCTGTAACAG	+	4043-4062
Pbas^b	CATAGTTAAATTGGTTATCTAC	-	4470-4449
Hfor^c	CAGGTGATGAATTTGCTACA	+	3556-3575
Hrev^c	CATTTGGATAAACTGGTGGT	-	4185-4166
555for^c	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	+	4003-4022
555rev^c	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA	-	4585-4561

Quadro 4: Sequência de primers usados para detecção de CPV por PCR Convencional. Legenda: * As sequências de primers foram obtidas de ^a-Senda et al., 1995; ^b-Pereira et al., 2000 e ^c-Buonavoglia et al., 2001. ** A posição dos primers é referida de acordo com os artigos correspondentes. (Adaptado de Buonavoglia et al., 2001).

Estes primers (Hfor/Hrev e 555 for/555rev) permitem assim a diferenciação entre o CPV2 (original), CPV2a, CPV2b e CPV2c, após sequenciação. A análise das

sequências por eles amplificadas, a discriminação entre os subtipos 2 e 2a baseia-se no polimorfismo de apenas um nucleótido (G para A) que determina a substituição do aminoácido Val (CPV2) pelo aminoácido Ile (CPV2a) no resíduo 555 da proteína VP2 (Desario et al., 2005). Observou-se, no entanto, isolados com a reversão/retenção da sequência original do subtipo 2 nesta posição (Desario et al., 2005 e Mohan Raj et al., 2010). Assim, a diferenciação precisa entre o CPV2 e o CPV2a não pode ser realizada pelo uso destes pares de primers, sendo necessário sequenciar uma região maior do gene da proteína VP2, que inclua outros resíduos informativos. Considera-se, porém, que este facto não apresenta um problema sério na actualidade, pois o CPV2 original desapareceu da população canina (Desario et al., 2005). Técnicas de PCR utilizando estes primers demonstraram ser muito sensíveis na detecção da presença de CPV em amostras clínicas e podem por isso ser usadas para rastreio inicial para a presença de infecção por CPV no cão (Buonavoglia et al., 2001 e Mohan Raj et al., 2010).

9.2.2.3 - PCR com Enzimas de Restrição (RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphism”)

O desenvolvimento de um PCR com o uso de enzimas de restrição (RFLP), que se baseia na identificação de um local de restrição, apenas presente no CPV2c, utilizando a enzima de restrição *MbolI*, permite diferenciar o subtipo CPV2c dos outros subtipos (Buonavoglia et al., 2001; Desario et al., 2005). Como o CPV2c apresenta uma variação nucleotídica no resíduo 4064, origina um local de restrição para a enzima de restrição *MbolI* (GAAGA), único para este subtipo. Assim, é possível distingui-lo pela simples digestão do amplicon obtido pelos primers 555for/555rev com esta enzima, o que origina dois fragmentos com tamanhos de 500 e 83 bp (Quadro 5) (Buonavoglia et al., 2001).

Tipificação CPV - PCR-RFLP (<i>MbolI</i>)	
Subtipo CPV	Fragmentos
CPV2, CPV2a ou CPV2b	583bp
CPV2c	500bp e 83bp
Co-infecção CPV2c + (CPV2, 2a ou 2b)	583 bp, 500bp e 83bp

Quadro 5: Tipos de restrição por PCR-RFLP (*MbolI*) dos diferentes subtipos de CPV (Adaptado de Buonavoglia et al., 2001; Desario et al., 2005; Vieira et al., 2008a).

Esta técnica demonstrou ser bastante útil na detecção de casos de co-infecções em hospedeiros susceptíveis, com duas variantes de CPV (em que intervenha o subtipo CPV2c). O uso de PCR-RFLP apresenta como limitações a incapacidade de distinguir entre os subtipos CPV-2, CPV-2a e CPV-2b, tanto em infecções únicas, como em co-infecções onde eles intervenham, pois o seu ADN não é digerido por esta endonuclease (Desario et al., 2005; Vieira et al., 2008a).

É também possível distinguir os subtipos CPV2a e 2b, do original CPV2, utilizando as enzimas de restrição *Rsa* I (identifica o nucleótido 3685) e *Hph* I (que identifica o nucleótido 3699). O uso destas enzimas permite observar diferentes bandas de restrição após electroforese em gel, com diferentes pares de bases e que caracterizam o CPV original e o distinguem das estirpes de campo (Sakulwira et al., 2001). Actualmente, a vantagem do seu uso é limitada, pois o CPV2 não existe em circulação, apresentando apenas utilidade se se pretende identificar uma estirpe vacinal com CPV2.

9.2.2.4 – PCR em Tempo Real

No PCR em tempo real, a amplificação do ADN (por PCR) é monitorizada, enquanto está a ocorrer. Esta técnica amplifica uma sequência nucleotídica específica numa amostra e monitoriza o progresso dessa amplificação, utilizando técnicas de detecção de fluorescência. Existem várias sondas fluorescentes, incluindo Sybergreen, sondas de hidrólise (sondas 5'-nuclease ou Taqman), brometo de etídio, sondas de hibridização, entre outras. Cada sonda tem características diferentes, mas todas emitem fluorescência, quando ocorre o processo de amplificação (Valasek e Repa, 2005). Este método demonstrou ser altamente sensível, específico, reprodutível e mais rápido que o PCR convencional (Desario et al., 2005). A grande vantagem deste método é que, para além da identificação de ADN de parvovírus, permite a sua quantificação nas amostras a partir de valores tão baixos como 10^2 cópias de ADN. Outros métodos, que permitem a quantificação vírica, tais como a titulação de vírus em culturas celulares, são muito trabalhosos e demorados e de pouca aplicação rotineira, pois nem sempre é possível o isolamento vírico com todas as estirpes de CPV. Além disso, várias estirpes de CPV2 não produzem efeito citopático e a presença de antigénios víricos nas culturas celulares deve ser posta em evidência com

técnicas de imunofluorescência, o que implica que a técnica ainda se torne mais demorada. (Decaro et al., 2005b)

A alta sensibilidade e reprodutibilidade das técnicas de RealT-PCR permite a identificação de animais a excretar CPV2 a baixos títulos nas fezes, de forma a adoptar medidas profilácticas adequadas para evitar a infecção (Decaro et al., 2005b). As técnicas de RealT-PCR apresentam grandes vantagens em relação às técnicas de PCR convencional. São técnicas mais sensíveis e específicas, que possibilitam o processamento simultâneo de várias amostras, evitam a manipulação com brometo de etídio, são mais rápidas e permitem quantificar o número de cópias de ADN presentes numa determinada amostra. Assim, estas técnicas ajudam a elucidar os mecanismos da patogénese da infecção por CPV2, em particular, a quantidade e duração da excreção vírica durante a infecção natural e no período pós vacinal, o que leva à adopção de técnicas adequadas de prevenção e controlo da infecção (Decaro et al., 2005b; Kumar e Nandi, 2010).

Deteccção e quantificação genérica de CPV- RealT-PCR (TaqMan)

Foi desenvolvido um método de PCR em tempo real (RealT-PCR) para a identificação e quantificação de ADN de CPV, baseado na tecnologia TaqMan. A tecnologia TaqMan permite a monitorização da produção de produtos de PCR pela medição da fluorescência obtida pela quebra de uma sonda marcada com dupla fluorescência. Esta quebra ocorre pela acção da ADN polimerase usada na amplificação (Quadro 6). Na tecnologia Taq Man, as sondas estão marcadas com dois fluoróforos, o dador (“reporter”) e o receptor (“quencher”). Na sonda intacta, estes fluoróforos estão em contacto próximo e o receptor absorve a fluorescência do dador. Durante a amplificação, a sonda oligonucleotídica é hidrolisada e os fluoróforos separam-se, permitindo que o sinal de fluorescência do dador seja emitido e detectado. Exemplos de fluoróforos receptores incluem TAMRA, DABCYL e BHQ e exemplos de fluoróforos dadores incluem FAM, VIC, NED, entre outros (Valasek e Repa, 2005).

RealT-PCR TaqMan – Detecção Genérica de CPV				
Sequência - 5´ para 3´		Especificidade	Posição	Tamanho
Primers				
CPVfor	AAACAGGAATTAAGTATACTAATATATTTA	Todos os tipos de CPV	4104-4135 ^a	93 bp
CPVrev	AAATTTGACCATTTGGATAAACT		4176-4198 ^a	
Sonda				
CPV-Pb	FAM -TGGTCCTTTAACTGCATTAAATAATGTACC-TAMRA		4143-4172 ^a	

Quadro 6: Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para detecção genérica do CPV com sondas TaqMan. Legenda: ^a - Posição dos oligonucleótidos são referentes à sequência do CPV2 estirpe CPV-2 (nº acesso M38254). (Adaptado de Decaro et al., 2005b; Decaro et al., 2006a).

Identificação e quantificação genérica de CPV- Real Time PCR (SyberGreen)

A sonda marcada com SyberGreen, quando se liga ao ADN alvo, emite uma fluorescência mil vezes superior à emitida pela sua forma livre. Esse aumento de fluorescência é detectado. Quanto maior a quantidade de ADN presente, maior a ligação entre este e o SyberGreen e maior o sinal de fluorescência registado. (Valasek e Repa, 2005).

Kumar e Nandi (2010), desenvolveram um método de RealT-PCR com Sybergreen para detecção e quantificação de CPV em amostras fecais (Quadro 7). Este método demonstrou ter uma sensibilidade superior na detecção de CPV, quando comparado com as técnicas de HA e PCR convencional e detectou ADN de CPV em amostras com um baixo número de cópias e que não tinha sido detectado pelos outros métodos (Kumar e Nandi, 2010).

RealT-PCR SyberGreen – Detecção Genérica de CPV		
Sequência - 5' para 3'		Especificidade
Primers		
pCPV-2RT	CAT TGG GCT TAC CAC CAT TT	Todos os tipos de CPV
R	CCA ACC TCA GCT GGT CTC AT	

Quadro 7: Primers usados na detecção genérica de CPV por RealT-PCR com SyberGreen. (Adaptado de Kumar e Nandi, 2010).

Genotipagem de CPV - Real Time PCR – Sondas MGB

A utilização do RealT-PCR, não só permite identificar a presença de CPV, como também a sua tipificação. Levando em consideração os polimorfismos de apenas um nucleótido na sequência do gene da cápside proteica (resíduo 426), entre os diferentes subtipos CPV2a, CPV2b e CPV 2c, foram desenvolvidas sondas baseadas na técnica “Minor Groove Binding” (MGB) para a identificação rápida do subtipo de CPV (Decaro et al., 2006a). Esta técnica utiliza a vantagem do desenvolvimento de sondas de ADN conjugadas a um ligando da MGB (Afonina et al., 1997). As sondas MGB formam dupletos hiper-estáveis com o ADN complementar, permitindo uma diminuição do tamanho das sondas e um aumento da especificidade destas (Kutyavin et al., 2000). Estas sondas oligonucleotídicas fluorescentes que contêm um grupo 3´ “minor groove binding” hibridizam com alvos de cadeia simples com uma elevada especificidade para uma sequência complementar, quando comparadas com as sondas de ADN convencionais. Este facto reduz a hibridização não específica e resulta numa baixa fluorescência inespecífica durante o procedimento de RealT-PCR (Kok et al., 2002). Assim, as sondas MGB são uma ferramenta muito útil para a detecção de polimorfismos de apenas um nucleótido (Decaro et al., 2006a).

Os primers e sondas MGB foram desenhados, tendo em conta o polimorfismo de um nucleótido encontrado no gene da cápside entre os subtipos CPV2a e CPV2b (4062 A para G) e entre os subtipos CPV2b e CPV2c (4064 T para A), que são responsáveis pela presença no resíduo 426 da cápside proteica do aminoácido Asn, Asp e Glu nos subtipos 2a, 2b e 2c, respectivamente (Decaro et al., 2006a). Com este método, são executados dois testes em simultâneo que utilizam sondas MGB marcadas com fluoróforos diferentes (FAM e VIC) e que permitem detectar os polimorfismos existentes entre os subtipos 2a/2b e 2b/2c (Decaro et al., 2006a). As sondas MGB específicas para o subtipo CPV2b são marcadas com FAM em ambos os testes 2a/2b e 2b/2c. A sonda MGB específica do subtipo CPV2a (teste 2a/2b) e do subtipo CPV2c (teste 2b/2c) são marcadas com VIC. A sequência, especificidade e posição estão apresentadas no Quadro 8 e 9 (Decaro et al., 2006a).

RealT-PCR com sonda MGB tipo CPV2a/CPV2b				
	Sequência - 5´ para 3´	Especificidade	Posição	Tamanho
Primers				
CPVa/b for	AGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGA	Todos os tipos de CPV	1719-1744 ^{a,b}	93 bp
CPV a/b rev	CCAATTGGATCTGTTGGTAGCAATAC		1785-1811 ^{a,b}	
Sonda				
CPVa-Pb	VIC—CTTCCTGTAACAAATGATA—MGB	CPV2a	1765-1783 ^a	
CPVb1 -Pb	FAM—CTTCCTGTAACAGATGATA—MGB	CPV2b	1765-1783 ^b	

Quadro 8: Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para identificação do subtipo de CPV (sonda tipo 2a/2b). Legenda: ^a - Posição dos oligonucleótidos é referentes à sequência do CPV2a estirpe CPV-15 (nº acesso M24003); ^b - Posição dos oligonucleótidos é referente à sequência do CPV2b estirpe CPV-19 (nº acesso M74849) (Adaptado de Decaro et al., 2006a).

No teste tipo 2a/2b, a sonda MGB tipo 2b reconhece especificamente apenas o ADN do CPV2b (amplificando o sinal FAM) e não o ADN do tipo CPV2a ou 2c, enquanto que os sinais com fluorescência VIC são gerados apenas pelo CPV2a (Decaro et al., 2006a).

RealT-PCR com sonda MGB tipo CPV2b/CPV2c				
	Sequência - 5' para 3'	Especificidade	Posição	Tamanho
Primers				
CPVb/c for	GAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCA	Todos os tipos de CPV	1721-1748 ^a	150 bp
			1155-1182 ^b	
CPV b/c rev	ATGCAGTTAAAGGACCATAAGTATTAAATATAT TAGTATAGTTAATTC		1823-1870 ^a 1257-1304 ^b	
Sonda				
CPVb2-Pb	FAM—CCTGTAACAGATGATAAT—MGB	CPV2b	1768-1785 ^a	
CPVc-Pb	VIC—CCTGTAACAGAAGATAAT—MGB	CPV2c	1202-1219 ^b	

Quadro 9: Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para identificação do subtipo de CPV (sonda tipo 2b/2c). Legenda: ^a - Posição dos oligonucleótidos é referente à sequência do CPV2b estirpe CPV-19 (nº acesso M74849); ^b - Posição dos oligonucleótidos é referente à sequência do CPV2c estirpe 56/00 (nº acesso AY380577) (Adaptado de Decaro et al., 2006a).

No teste tipo 2b/2c, as amplificações das fluorescências FAM e VIC são observadas apenas na presença de CPV tipo 2b e 2c, respectivamente (Decaro et al., 2006a).

Estes dois testes são muito específicos, sensíveis e reprodutíveis, permitindo a identificação das variantes de CPV, sendo que a única limitação do teste MGB 2a/2b, reside no facto da sonda não permitir discriminar o CPV2a do CPV2 original (contido na maioria das formulações vacinais). De facto, ambos os subtipos apresentam um nucleótido A na posição 4062 do genoma vírico, sendo que o CPV2 original é erroneamente caracterizado com CPV2a pelos testes anteriormente descritos (Decaro et al., 2006a). Esta limitação pode ser problemática, especialmente quando se analisam amostras fecais de animais com diarreia com início poucos dias após a administração de vacina baseada no CPV2, quando é crucial diferenciar o vírus vacinal do vírus de campo CPV2a (Decaro et al., 2006b).

Dada esta limitação, Decaro et al. (2006b) desenvolveram outro método com sonda MGB que permite a rápida diferenciação entre o CPV vacinal (CPV2) e as estirpes de campo (CPV2a, CPV2b e CPV2c). Para esta distinção, foi levado em conta o polimorfismo de um nucleótido na posição 3088 (T no CPV2 e C nos restantes subtipos) que é responsável pela alteração do amino ácido Ile para Thr no resíduo 101 da cápside proteica. As sondas específicas (Quadro 10) para o subtipo vacinal e de campo são marcadas com FAM e VIC, respectivamente. (Decaro et al., 2006b)

RealT-PCR com sonda MGB tipo vacina/ estirpes de campo				
	Sequência	Especificidade	Posição	Tamanho
Primers				
CPV2/v for	GCAGTTAACGGAACATGGCTTTAG	Todos os tipos de CPV	3057-3081 ^a	68 bp
CPV 2/V rev	TCAACCAATGACCAAGGTGTTACAA		772-796 ^b	
			3100-3124 ^a	
			815-839 ^b	
Sonda				
CPV2-Pb	FAM-TGTGCATGAATATCAT-MGB	CPV2 (vacinal)	3082-3097 ^a	
CPVv-Pb	VIC-TTTGTGCATGAGTATCAT-MGB	CPV2a, 2b e 2c	797-814 ^b	

Quadro 10: Sequência, posição e especificidade dos oligonucleótidos usados no RealT-PCR (TaqMan) para diferenciar a estirpe vacinal das estirpes de campo de CPV. Legenda: ^a - Posição dos oligonucleótidos é referentes à sequência do CPV2 original estirpe CPV-b (nº acesso M38245); ^b - Posição dos oligonucleótidos é referente à sequência do CPV2a estirpe CPV-15 (nº acesso M24003) (Adaptado de Decaro et al., 2006b).

Apesar de até ao momento as vacinas contendo o subtipo CPV2b ainda não estarem a ser usadas de forma universal, alguns problemas podem surgir quando se interpretam os resultados de amostras colhidas de animais, aos quais foi administrada uma vacina com CPV2b. De facto, o vírus vacinal (CPV2b) excretado nas fezes não é distinguível pelas técnicas de RealT-PCR usando sondas MGB do vírus de campo CPV2b. Estes testes não permitem a distinção de todas as estirpes das formulações das vacinas, só aquelas baseadas no CPV2 original (Decaro et al., 2006b).

O resumo dos possíveis resultados obtidos nos diferentes testes de RealT-PCR, com as diferentes sondas MGB está apresentado no Quadro 11.

Resultados dos testes RealT-PCR/Subtipo CPV							
Teste	Genérico	a/b		b/c		v/2	
		FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
CPV2	+	-	+	.	-	+	-
CPV2a	+	-	+	-	-	-	+
CPV2b	+	+	-	+	-	-	+
CPV2c	+	-	-	-	+	-	+

Quadro 11: Resumo dos resultados dos testes de RealT-PCR de acordo com os diferentes subtipos de CPV (Adaptado de Decaro et al., 2006a; Decaro et al., 2006b).

Em 2008, um caso de co-infecção com as variantes CPV2b e CPV2c foi detectado por RealT-PCR com sondas MGB. Foi observada fluorescência FAM em ambos os testes a/b e b/c, característico do subtipo CPV2b e fluorescência VIC no teste b/c, característico do subtipo CPV2c (Vieira et al., 2008a).

Alguns autores consideram o RealT-PCR, com o uso de sondas MGB, o método “gold standard” para identificação e caracterização do CPV, já que apresenta alta sensibilidade e especificidade (Decaro et al., 2006a), mas tem sido descrito que esta técnica é insuficiente para caracterizar algumas variantes de CPV (algumas mutações impedem a correcta caracterização molecular usando esta metodologia) (Touihri et al., 2009).

10 – PROFILAXIA

Historicamente, os surtos de enterite causadas por CPV são de difícil controlo. O vírus é ubíquo, pode sobreviver por mais de 6 meses à temperatura ambiente e é facilmente transportado e disseminado.

Nos abrigos e canis, as boas práticas de higiene, incluindo a desinfecção das instalações e de pessoal são de extrema importância, para a prevenção da transmissão nosocomial deste agente (Prittie J, 2004).

O CPV é um vírus muito resistente no ambiente. A temperaturas baixas (< 7° C), o vírus mantém-se com capacidade infecciosa por meses. A maioria dos desinfectantes não consegue inactivar este vírus (Gordon e Angrick, 1988). No entanto, este pode ser inactivado por soluções de hipoclorito de sódio (lixívia), formalina e exposição aos raios solares (Kennedy et al., 1995).

Pensa-se que a persistência do vírus no ambiente é mais importante na perpetuação da doença do que a existência de portadores crónicos, já que estes são raros e excretam o vírus em pequenas quantidades (McCaw e Hoskins, 2006). Mais importante que uma boa higiene para a prevenção da infecção por CPV, é importante assegurar uma imunidade individual eficaz, através da adopção de protocolos de imunização efectivos (Prittie J, 2004).

10.1 – Imunidade Humoral

O título de anticorpos (Ac) séricos contra CPV está directamente relacionado com a imunidade do animal. Cães seronegativos são susceptíveis à infecção e os que apresentam baixos títulos de Ac não ficam gravemente doentes, mas excretam o vírus nas fezes. Os cães com alto título de Ac não desenvolvem infecção activa ou contribuem para a disseminação do vírus (Prittie J, 2004). O aumento da mortalidade em cachorros, associada à diminuição dos anticorpos maternos e o facto de cães vacinados com vacinas vivas atenuadas e expostos ao vírus por via oral, não excretarem vírus nas fezes, sugere que os anticorpos circulantes são importantes na prevenção da infecção intestinal (Carmichael et al., 1983).

A produção de anticorpos é o principal mecanismo de protecção fomentado pelas vacinas nucleares [vírus da Esgana (CDV), adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), CPV e Raiva]. Se não é possível detectar anticorpos após a vacinação, deve assumir-se que o animal pode não estar imunizado e deve se revacinado (Schultz, 1998 e Schultz, 2006). A resposta imunitária contra o CPV pode ser induzida **activamente** (através do uso de vacinas) ou **passivamente** (através da administração directa de anticorpos ou pela transferência de anticorpos maternos no pós-parto imediato) (Greene e Schultz, 2006).

10.1.1 – Imunidade Passiva

A imunização passiva é realizada através da administração de factores humorais, ou celulares obtidos de dadores previamente expostos ao CPV (soro de animais vacinados ou transferência de anticorpos vacinais). A transferência passiva de anticorpos ou outras substâncias imunocompetentes foi usada classicamente no combate de numerosas doenças, tanto em seres humanos como em animais domésticos. Este tipo de imunização tem decrescido de popularidade nas últimas décadas, sendo actualmente apenas utilizado em algumas situações específicas. A administração passiva de soro ou imunoglobulinas tem um papel benéfico na protecção de neonatos (até aos dois dias de idade) privados de colostro (Greene e Schultz, 2006). A transferência de anticorpos maternos da mãe para os cachorros representa outra forma de imunização passiva. Os anticorpos maternos são transmitidos ao cachorro através da placenta e do colostro (por absorção intestinal durante os dois primeiros dias de vida). A transmissão de anticorpos pelo colostro representa 90% dos anticorpos derivados da mãe. Assim, após ingerirem o colostro, os cachorros possuem um título de anticorpos de cerca de metade do título materna. Os anticorpos maternos declinam ao longo do tempo, com uma semi-vida de 9 dias (Pollock e Carmichael, 1982).

A interferência dos anticorpos maternos é considerada uma das maiores causas de falha da imunização (Pollock e Carmichael, 1982; Waner et al., 1996; Prittie, 2004). Níveis de anticorpos maternos, que impossibilitam uma imunização efectiva, podem persistir até às 12 semanas de idade e mesmo até mais tarde (20 semanas) (Martella et al., 2005). Os anticorpos neutralizantes têm demonstrado

prevenir a infecção por CPV e os Ac maternos protegem os cachorros contra infecção e doença. Estudos com anti-soros contra os vários tipos antigénicos têm sido realizados para testar a quantidade de actividade neutralizante, particularmente contra os subtipos de vírus heterólogos. Estes estudos revelaram diferenças substanciais nos títulos de neutralização, sendo que os títulos de neutralização cruzados eram diferentes. Estas diferenças podem ser biologicamente importantes, quando a protecção por imunidade materna é desafiada. Por exemplo, um certo título de anticorpos por imunidade materna pode ser suficiente para resistir à infecção por vírus homólogo, mas não por vírus heterólogo. A verdadeira importância em termos de protecção clínica da diferença entre títulos de anticorpos neutralizantes homólogos ou heterólogos neste grupo de vírus ainda está por esclarecer (Pratelli et al., 2001; Truyen, 2006).

10.1.2 – Imunidade Activa

A vacinação contra CPV constitui uma parte essencial do programa profiláctico dos cães. Torna-se essencial vacinar contra o CPV, dado que o parvovírus canino é tão contagioso como o vírus da esgana, sendo muito mais estável no ambiente. A imunização activa contra CPV apresenta diversas vantagens em relação à imunização passiva, nomeadamente uma protecção mais forte e duradoura (Greene e Schultz, 2006). A vacinação efectiva depende tanto do nível de anticorpos maternos, como do tipo de vacina usado (título da vacina, grau de atenuação vírica, as propriedades antigénicas da estirpe vírica e da via de administração) (Prittie, 2004; Martella et al., 2005). Cães com títulos de IHA $\leq$ 1:80 são susceptíveis à infecção e necessitam de imunização (Pollock e Carmichael, 1983). Um título de anticorpos maternos $\geq$ 1:20, pode interferir com a vacinação, mas não evita a infecção com vírus virulento (Waner et al., 1996; Buonavoglia et al., 1992; Martella et al., 2005). Com estes títulos de anticorpos maternos, equivalentes a 2 a 4 semi-vidas (cerca de 2 a 5 semanas), os cachorros não são imunizados com sucesso e permanecem susceptíveis à infecção (Pollock e Carmichael, 1982; Carmichael et al., 1983; Martella et al., 2005). Em contraste, títulos $>$ 1:80 são considerados protectores, tanto contra a infecção, como contra as manifestações clínicas de doença.

10.1.2.1 - Tipos de vacina

As vacinas nucleares são definidas como as vacinas de rotina que devem ser administradas a todos os cães. As vacinas nucleares no cão incluem o CDV, o CAV-2, o CPV e a Raiva. As vacinas não nucleares são aquelas que são apenas recomendadas com base em necessidades específicas. O tipo de vacina utilizado também influencia o sucesso da imunização. As vacinas actuais utilizam o subtipo de parvovírus canino original, são atenuadas com alto título (alta quantidade de vírus por dose) e são mais eficazes a imunizar os cachorros durante o período de interferência dos anticorpos maternos (Carr-Smith et al., 1997).

As vacinas usadas nos finais dos anos 70 e início dos anos 80 tinham como estirpe vacinal o FPV, pois não foram licenciadas formulações com CPV até meados dos anos 80. O FPV continuou apenas numa vacina canina comercial até meados dos anos 90, apesar da maioria das vacinas desenvolvidas na década de 80 e 90 terem substituído a estirpe de FPV por uma estirpe de CPV2 original (actualmente ainda presente em muitas vacina comerciais). As vacinas de FPV não eram muito eficazes, mas eram as únicas disponíveis na altura. Nos finais dos anos 80, uma vacina viva modificada com uma estirpe de CPV2a foi licenciada e permaneceu no mercado por cerca de 10 anos, nunca demonstrando ser mais eficaz que as vacinas de CPV2 original. A primeira formulação comercial a usar a estirpe CPV2b para a imunização dos cães apareceu em meados dos anos 90. Nos dias de hoje, a maioria das vacinas comercializadas são feitas usando por base o CPV2 original ou o CPV2b. Nenhuma contém as duas variantes, a variante CPV2a ou CPV2c (Carmichael, 1999; Carmichael, 2005; Larson e Schultz, 2008; Pereira et al., 2007; Schultz, 2006).

Vacinas inactivadas (mortas) de CPV podem ser usadas para obter imunização contra CPV. Estas protegem por um período de pelo menos 6 meses (2 administrações com intervalo de 3 a 4 semanas são necessárias para uma resposta imune adequada) (Pollock e Carmichael, 1983). As vacinas inactivadas são consideradas inferiores às vacinas atenuadas, pois não evitam a excreção vírica e são menos eficazes a imunizar os cachorros durante a interferência dos anticorpos maternos (Figura 19) (Pollock e Carmichael, 1983; Carr-Smith et al., 1997).

Podem, no entanto, ser úteis em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se pretende imunizar uma cadela gestante, ou um animal imunossuprimido (Carr-Smith et al., 1997). Actualmente não são recomendadas (Paul et al., 2006).

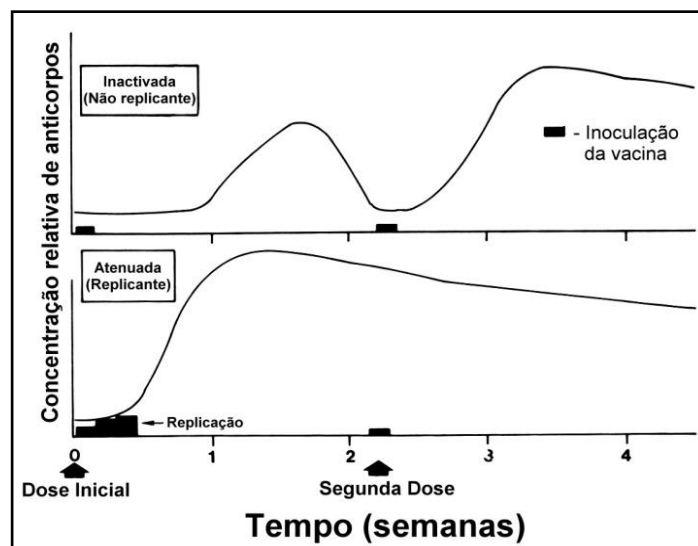


Figura 19 – Comparação da resposta imune humoral após a administração de uma vacina inactivada (em cima) e de uma vacina viva atenuada contra CPV (em baixo). Uma só administração de vacina viva modificada consegue induzir uma resposta imune duradoura, enquanto que para obter o mesmo efeito com vacinas inactivadas são necessárias duas inoculações (Adaptado de Greene e Schultz, 2006; Oliveira, 2001).

A recomendação actual consiste no uso de vacinas vivas atenuadas, pois apresentam inúmeras vantagens relativamente às vacinas inactivadas (Quadro 12). As vantagens são as seguintes: protecção mais forte; desenvolvimento mais rápido da protecção (tão cedo como 1 a 3 dias); maior duração do período de protecção (superior a 20 meses); maior capacidade de ultrapassar a interferência dos anticorpos maternos na imunização; prevenção da eliminação de vírus virulentos pelo animal quando exposto (as vacinas mortas podem evitar a doença clínica, mas não previnem a infecção subclínica e a excreção do vírus para o ambiente) (Sherding, 1996). A vacina mais utilizada actualmente é baseada na estirpe CPV2 (original), é viva modificada e mostrou ser adequada para a protecção após 2 a 3 administrações às 6, 9 e 12 semanas de idade (Waner et al., 1996; Carr-Smith et al., 1997).

Comparação dos tipos de vacinas contra CPV		
Vacinas	Inactivadas	Vivas atenuadas
Recomendadas em cadelas grávidas?	Sim	Não
Excreção do vírus vacinal	Não	Sim
Previne excreção do vírus virulento?	Não	Sim
Magnitude relativa da resposta humoral	Baixa	Alta
Protecção relativa a exposição após 2 semanas	Variável	Alta
Duração da resposta humoral	9-12 meses	> ou = 20 meses
Intervalo recomendado para revacinação	12 meses	12 meses
Número mínimo de doses recomendado (cães > ou = 14-16 semanas de idade)	2	1

Quadro 12: Comparação entre as várias vacinas disponíveis para a imunização activa de cães contra a enterite por CPV (Adaptado de Greene e Schultz, 2006).

Levando em consideração o número de subtipos de CPV em circulação, levanta-se a questão de se os cães mais velhos vacinados em jovens mantêm imunidade protectora contra todos os subtipos de CPV. Schultz et al. (2010), demonstraram que a vacinação com uma estirpe confere imunidade cruzada contra as outras e não afecta a duração de imunização (Larson e Schultz, 2008; Schultz et al., 2010).

Uma das preocupações existentes é saber se as mutações, que originaram os diferentes subtipos de CPV, provocaram diferenças ao nível da imunidade natural e induzida por vacinas. Alguns investigadores sugerem que as novas mutações podem diminuir a eficácia das vacinas actuais contra CPV, especialmente contra a nova variante CPV2c (Martella et al., 2004; Truyen, 2006). No estudo de Larson e Schultz (2008), foram utilizados dois tipos de vacinas, um com CPV2 original e outro com CPV2b e ambos despoletaram imunidade protectora contra as variantes CPV2b e CPV2c. Até à data, parece que nenhuma mutação genotípica no CPV levou a alterações que provocassem uma mudança significativa nas propriedades antigénicas do vírus. As vacinas actuais, que contêm vírus vivo modificado de CPV2 ou CPV2b, conferem protecção contra as variantes CPV2a, CPV2b e CPV2c. No entanto, não há garantias de que futuras mutações não possam provocar alterações antigénicas significativas e consequentemente

alterações nas respostas à vacinação com as estirpes actuais (Larson e Schultz, 2008).

10.1.2.2 - Duração da Imunidade

A necessidade de reforços anuais com a vacina multivalente tem sido posta em questão. Num estudo de Twark e Dodds (2000), 94,8% dos animais de uma população tiveram uma resposta adequada ao CPV (determinado pelo teste de imunofluorescência) por mais de um ano após a vacinação e 93,7% dos cães teve uma resposta adequada após mais de 2 anos da vacinação (Twark e Dodds, 2000). Cães que recuperaram de infecção activa com CPV apresentam títulos entre os 1:640 até 1:2560, 2 anos após a infecção, sugerindo que a imunidade pós-infecção é duradoura e dura toda a vida do animal (Buonavoglia et al., 1992; Schultz et al., 2010). Tal facto foi também observado em vários estudos, mas após a imunização activa. Os níveis de anticorpos podem decrescer ao longo da vida, mas não de uma forma significativa. A presença de anticorpos contra CPV e a protecção contra a infecção observada quando estes animais são expostos ao vírus, mostram que a imunidade contra CPV persiste para toda a vida, após vacinação, de forma similar à observada após a infecção natural (Schultz, 2006; Schultz et al., 2010). Apenas uma dose de uma vacina nuclear viva modificada, quando administrada às 16 semanas de idade ou mais tarde, origina uma imunidade duradoura (muitos anos a toda a vida), numa percentagem muito alta de animais (Schultz, 1998; Schultz, 2006; Schultz et al., 2010). Os títulos apenas confirmam uma resposta imunológica e não asseguram protecção contra a infecção. Devido ao risco de doença imunomediada associada à sobrevacinação, a decisão de realizar ou não reforços de vacina anuais deveria basear-se na avaliação do título de anticorpos (Prittie J, 2004).

10.1.2.3 - Protocolo vacinal

Até há pouco tempo, os protocolos de vacinação aceites para protecção contra CPV recomendavam a imunização a cada 2 a 3 semanas, iniciando às 6 a 8 semanas de idade e até às 16 a 18 semanas de idade, continuando posteriormente com reforços anuais. Recomendações adicionais de forma a assegurar a protecção em raças predispostas incluem a extensão do período de

vacinação até às 20 semanas, avaliação dos títulos de anticorpos várias semanas após a última vacinação, reforços vacinais bianuais e reforços 2 a 3 semanas antes de uma exposição eventual (concursos, canis, corridas) (Carr-Smith et al., 1997).

As **recomendações actuais** (Quadro 13) sugerem que a última dose de uma vacina nuclear na primovacinação deve ser realizada pelo menos às 14 semanas de idade ou mais tarde, seguidas de uma revacinação após um ano e posteriormente, os reforços a intervalos não inferiores a 3 anos.

Estes protocolos são adequados para oferecer um nível de protecção igual à alcançada pela revacinação anual (Schultz, 2006). Ao aumentar o intervalo dos reforços vacinais das vacinas nucleares, não se coloca o animal em risco de desenvolver doença, mas reduz-se o potencial de reacções adversas (Phillips e Schultz, 1992).

É importante enfatizar, que ao contrário das vacinas nucleares, as vacinas não nucleares caninas apenas produzem imunidade por um ano e em algumas situações, por menos tempo. Assim, quando necessárias, as vacinas não nucleares devem ser administradas anualmente ou até, em alguns casos (bacterinas da leptospira), semestralmente (Schultz, 2006).

A vacinação é uma prática médica que requer as mesmas considerações e raciocínio necessários para escolher um protocolo de tratamento médico ou um procedimento cirúrgico adequado. A vacinação não deve ser considerada um procedimento inócuo, pois pode ter consequências nefastas para os pacientes e proprietários (Schultz, 1998). Existem variações entre pacientes, o seu estilo de vida e o risco relativo de adquirir uma determinada doença infecciosa. Assim, a melhor abordagem é a avaliação das necessidades específicas de cada paciente, mais do que o seguimento de determinado protocolo vacinal, sendo que o esquema vacinal deve ser individualizado (Gore et al., 2005).

Recomendações da Vacinação Canina – 2006 AAHA			
Vacina	Primovacinação ≤16 semanas	Adulto >16 semanas	Reforços
CPV	Todos os cachorros devem receber um mínimo de 3 doses entre as 6 e 16 semanas de idade (a intervalos de 3 a 4 semanas).	Duas doses (intervalo de 3 a 4 semanas) Uma dose é protectora e aceitável.	Todos os cachorros devem receber um reforço de vacina um ano após terminarem a primovacinação, independentemente da vacina usada. Após este reforço, a revacinação é recomendada a intervalos de 3 ou mais anos.
Vacina viva modificada	A dose final deve ser administrada às 14/16 semanas de idade. Recomendações: Apesar dos reforços anuais serem recomendados por algumas empresas farmacêuticas, vários estudos demonstraram protecção até 7 anos pós-vacinação. Vacinas com a estirpe CPV2, independentemente do genotipo (CPV2 ou CPV2b), promovem uma excelente protecção contra as estirpes de campo.		
CPV Vacina morta	Não Recomendadas: Este tipo de vacinas é muito susceptível à interferência pelos anticorpos maternos em cachorros até às 16/18 semanas de idade. Doses múltiplas (2-5) podem ser necessárias, mesmo em cachorros com mais de 12 semanas.		

Quadro 13: Recomendações da vacinação canina – 2006 AAHA. Legenda: AAHA – American Animal Hospital Association (Adaptado de “2006 AAHA Canine Vaccine Guidelines, Revised”, Paul et al., 2006).

10.1.2.4 - Falhas Vacinais

As vacinas podem ter falhas por diversos motivos, mas as três principais razões para tal acontecer são:

(1) O animal pode possuir um título de anticorpos maternos suficiente para bloquear a acção da vacina. Esta é a causa mais frequente de falha vacinal. As recomendações de que o último reforço vacinal contra CPV seja administrado a partir das 14 semanas de idade estão relacionadas com o facto de nesta idade, os anticorpos maternos estarem em 98% dos cachorros, a um nível que não bloqueiam a imunização activa (Day et al., 2007). Sendo assim, à medida que o título de anticorpos maternos diminui, todos os cachorros passam por um período durante o qual são susceptíveis à infecção, mas refractários à imunização. A maior parte dos casos de enterite por CPV ocorre neste período crítico, apesar do uso de vacinas “eficazes” e de programas de vacinação rigorosos (Figura 20) (Pollock e Carmichael, 1990).

(2) A vacina pode não ser imunogénica, o que pode ocorrer por uma variedade de factores que vão desde as alterações na produção industrial da

vacina (estirpe vacinal, erros na atenuação do vírus), ao transporte da mesma (quebra da rede de frio) e a própria administração (uso de desinfectantes, via de administração incorrecta) e que podem levar à inactivação da vacina viva modificada (Day et al., 2007).

(3) O animal produz uma resposta fraca ou não produz de todo uma resposta imune (o sistema imune falha a reconhecer os determinantes antigénicos de uma determinada vacina) (Paul et al., 2006; Day et al., 2007).

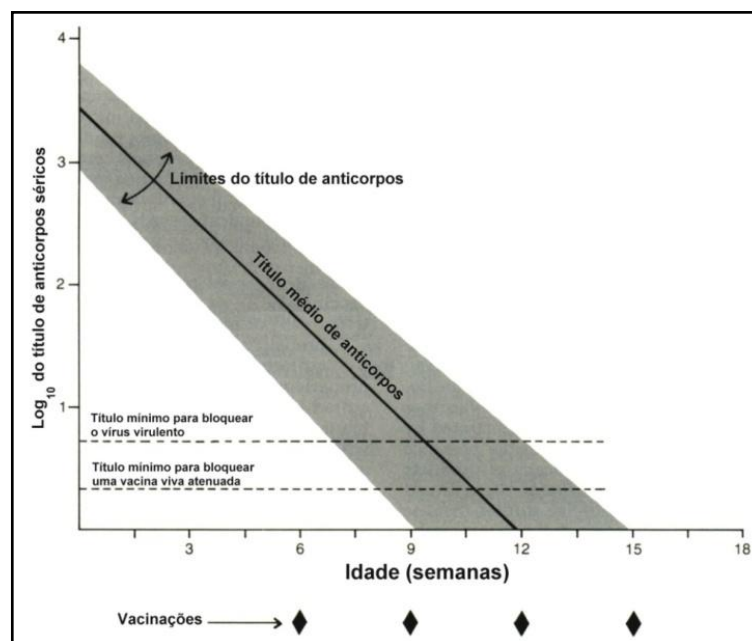


Figura 20: Esquema que demonstra a variação da concentração de anticorpos de origem materna ao longo de vacinações sucessivas. Existe um período crítico no qual a imunidade materna bloqueia os antígenos vacinais, mas não os antígenos víricos (Adaptado de Greene e Schultz, 2006; Oliveira, 2001).

10.1.2.5 - Testes serológicos

Vários métodos laboratoriais têm sido usados para determinar os títulos de anticorpos, nomeadamente testes de ELISA, anticorpos com imunofluorescência (IFA), testes IHA e testes de seroneutralização (SN) (Prittie J, 2004). Ao determinar o nível de anticorpos, estes testes podem ser usados para estabelecer quando é que é necessário realizar a imunização activa e quando uma vacinação efectiva irá conferir protecção contra infecção por CPV (Waner et al., 1996). Os testes de IHA e testes de neutralização de vírus, para aferir os níveis de anticorpos, são

considerados como “gold standard” para esta quantificação. (Carmichael et al., 1983; Paul et al., 2006).

Interpretação do resultado dos testes serológicos

A relação entre o título de anticorpos contra CPV e o grau de imunidade protectora são importantes, quando se tem em conta a imunidade passiva (cães não vacinados com anticorpos maternos). Neste caso, segundo Schultz et al. (2010), o título mínimo de anticorpos necessário para conferir protecção contra a exposição experimental intranasal/intraoral com CPV2 deve ser $> 1:80$, usando testes de IHA, em cães com imunidade passiva. Em contraste, nos cachorros com imunidade activa (após vacinação ou infecção natural), o título de anticorpos não tem tanta importância, desde que seja detectável. Os cães activamente imunizados desenvolvem uma rápida resposta humoral e celular de memória, estando assim protegidos contra a infecção e doença. A presença de anticorpos, independentemente do título, demonstrou imunidade protectora (Schultz, 1998; Schultz, 2006; Schultz et al., 2010). No estudo de Schultz et al. (2010), o título mínimo de anticorpos necessário para conferir protecção contra a exposição experimental intranasal/intraoral com CPV2 foi $\geq 1:10$, usando testes de IHA, em cães após imunidade activa. Um teste de Inibição da Hemaglutinação é considerado positivo, quando o seu título de anticorpos é $> a 1:80$. Um teste negativo indica que o animal tem um título $\leq a 1:80$ ou não tem anticorpos. Apesar de alguns destes animais com resultados negativos no teste de IHA serem imunes, considera-se que um animal com um título $< a 1:80$ é susceptível à infecção por CPV e, portanto, estes cães beneficiam da revacinação (Paul et al., 2006).

Após a primovacinação, se o animal tem um teste serológico negativo, deve ser revacinado, possivelmente usando uma vacina diferente, e depois retestado. Se o título é outra vez negativo, o animal deve ser considerado fraco responsivo ou um não responsivo e possivelmente incapaz de desenvolver um título de Ac protector (Paul et al., 2006).

Aplicações dos testes serológicos

Ao terminar a primovacinação (14 a 16 semanas de idade), o animal deve ter um resultado positivo num teste serológico, desde que a amostra tenha sido recolhida 2 ou mais semanas após a vacinação (Paul et al., 2006). Estes testes de titulação de Ac são a única forma de assegurar que o cachorro desenvolveu uma resposta imune após a vacinação. A sua execução está recomendada como forma de assegurar que o animal desenvolveu uma resposta imunitária à vacinação contra CPV, na primovacinação. Os testes serológicos têm também como utilidade determinar a duração de imunidade, quer após vacinação, quer após infecção natural. Os cães demonstraram manter um título de anticorpos elevado por vários anos, após vacinação com as vacinas nucleares (Abdelmagid et al., 2004; Paul et al., 2006). O título de anticorpos permite também determinar a altura de iniciar o esquema vacinal, ao determinar o nível de anticorpos maternos. Actualmente, este procedimento é pouco realizado, optando-se por vacinar os cachorros a partir das 6 a 8 semanas de idade e repetindo a vacina a cada 3 a 4 semanas até alcançar as 14 a 16 semanas de idade (Paul et al., 2006).

10.1.2.6 – Alterações imunitárias provocadas pela vacina

Não há provas de que ocorra imunossupressão significativa devido ao CPV vacinal (Phillips et al., 1989). Muitas vezes, após a vacinação com vacina viva atenuada de CPV, ocorre uma ligeira redução do número de linfócitos circulantes entre o 3º e 5º dia pós-inoculação, o que não pode ser interpretado por si só, como causa de imunossupressão (Bruner e Swango, 1993). Em alguns estudos efectuados, não foi possível mostrar qualquer alteração da responsividade dos linfócitos nas 2 semanas após a vacinação (Carmichael, 1983; Bruner e Swango, 1993).

A maioria dos estudos de imunossupressão pós-vacinal investigaram o efeito de vacinas monovalentes, mas é prática comum o uso de vacinas multivalentes nos esquemas de vacinação dos cães. Actualmente, existe pouca informação sobre o efeito imunossupressor das vacinas multivalentes (Krakowka et al., 1982; Dheim e Gorham, 1986; Brenner et al., 1989). Assim, pouco se sabe sobre a interacção entre os vírus vacinais, o seu potencial efeito imunossupressor e a influência da vacinação nos valores hematológicos (Phillips et al., 1989). A imunossupressão induzida pelas vacinas foi observada em vários estudos, tanto em vacinas

multivalentes em humanos, como em cães (Phillips et al., 1989). De facto, a resposta immune e as alterações hematológicas após a administração de vacinas tem sido estudada, mas com resultados pouco consistentes. Num estudo conduzido por Phillips et al. (1989), algumas vacinas multivalentes causaram supressão significativa da resposta dos linfócitos a agentes mitogénicos, supressão da contagem absoluta de linfócitos, mas não alteraram significativamente a contagem total de leucócitos, a contagem absoluta de polimorfonucleares neutrófilos, ou a contagem absoluta de monócitos. O significado prático da diminuição da resposta dos linfócitos não é actualmente conhecido (Phillips et al., 1989).

Apesar de existirem um número limitado de estudos sobre a resposta imunitária em cães após a administração de uma vacina CPV em esquemas monovalentes ou polivalentes, a indução de imunossupressão por CPV foi demonstrada em vários estudos (Phillips et al., 1989; Miyamoto et al., 1995; Strasser et al., 2003). Pensa-se que a razão pela qual não se manifesta com frequência doença clínica associada ao período pós-vacinal é por a supressão linfocítica ser de curta duração (aproximadamente uma semana) (Phillips et al., 1989). Por outro lado, Strasser et al. (2003) mostraram um aumento da contagem total de leucócitos e da contagem absoluta de linfócitos, após a administração de uma vacina multivalente (Strasser e Thomsen, 1990). Ciarlini et al. (2004), sugerem que as vacinas multivalentes não interferem com o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, nem com o leucograma. Em 2003, Strasser et al. repararam que a redução na resposta dos linfócitos T era acompanhada pelo aumento simultâneo da actividade humoral, sugerindo uma alteração temporária do equilíbrio entre a imunidade celular e a imunidade humoral, mais do que uma verdadeira imunossupressão, após a vacinação com vacinas vivas modificadas no cão. Observaram também que a actividade do sistema do complemento quase duplicou, quando comparadas com os valores pré-vacinação. As razões para as supostas “alterações imunossupressoras” após a vacina ainda não são totalmente compreendidas (McDonald, 1992; Strasser et al., 2003). Uma miríade de factores pode influenciar a eficiência do sistema imune. Existe a descrição de casos de animais imunossuprimidos que desenvolvem doença após a vacinação (Strasser et al., 2003), pelo que pode ser possível que a imunossupressão induzida por vacinas potencie a gravidade de uma doença simultânea, ou permita que

infecções inaparentes se tornem clinicamente evidentes (Schultz, 1976; Potgieter et al., 1981; Phillips et al., 1989).

10.2 – Imunidade celular

O papel da imunidade celular, na profilaxia da infecção por CPV, está principalmente relacionada com a duração da imunidade. A duração da imunidade após vacinação ou infecção natural depende de dois mecanismos principais: (1) a persistência de células de memória B e T que são estimuladas com a vacinação/infecção e (2) a persistência de plasmócitos com grande longevidade (células B de memória efectoras), que continuam a produzir anticorpos por muitos anos após a estimulação inicial (Schultz, 2006). Apesar de controverso, nos estudos de duração da imunidade, tanto em cães como em gatos, as “células B de memória efectoras” continuam a produção de anticorpos por muitos anos. Assim, a revacinação não parece ser necessária para manter estas células (Schultz, 2006).

A presença contínua de anticorpos em animais na ausência de qualquer reforço vacinal é uma consequência directa da produção contínua de anticorpos pelas “células B de memória efectoras”. Em contraste, as células de memória B e T apenas podem ser reactivadas (tornarem-se células efectoras) após reinfecção ou reimunização. A capacidade de detecção de anticorpos, apesar do título, num animal previamente vacinado, demonstra que as “células B de memória efectoras” estão presentes e funcionais e sugere também que as células B de memória (não efectoras) estão, muito provavelmente, presentes (Schultz, 2006).

CAPÍTULO II – TRABALHO EXPERIMENTAL

1 - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO PARVOVÍRUS CANINO EM PORTUGAL E SUAS IMPLICAÇÕES.

1 – CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO PARVOVÍRUS CANINO EM PORTUGAL E SUAS IMPLICAÇÕES.

1.1 – Introdução

Devido ao rápido processo evolutivo e elevada taxa de mutações do CPV, torna-se clara a necessidade do estudo dos subtipos prevalentes de CPV no nosso país. Como a experiência demonstrou, as estirpes mutantes podem apresentar efeitos desastrosos nas populações de animais desprotegidas, com altos índices de morbidade e mortalidade.

O desconhecimento das estirpes de CPV prevalentes em Portugal impôs, como objectivo deste trabalho, a caracterização genética do tipo de variantes de CPV existentes. Inicialmente, pretendeu-se caracterizar os subtipos de CPV presentes na zona Centro do País (Figueira da Foz) e determinar a evolução temporal da frequência das diferentes variantes, nesta região, de 2006 a 2009. Como consequência dos resultados obtidos, a recolha de amostras foi alargada a todo Portugal Continental, de forma a caracterizar as diferentes variantes do CPV em todo o país e confirmar a existência de casos de co-infecção (detectados na zona Centro), noutras regiões.

As variações antigénicas, principalmente quando ocorrem em locais antigénicos principais, podem afectar a performance dos testes de diagnóstico, com alterações da sua sensibilidade, na detecção da presença de antígeno viral. Objectivou-se também determinar a sensibilidade dos testes de ELISA (imunomigração rápida) usados de forma rotineira no diagnóstico clínico e verificar se existem diferenças significativas na capacidade de diagnóstico, consoante as diferentes estirpes de CPV.

A caracterização genética dos isolados foi avaliada nos aspectos da sua importância clínica, nomeadamente nos resultados dos dados epidemiológicos, de gravidade clínica e de prognóstico da doença.

1.2 – Resultados

1.2.1 - Artigo 1 - Vieira MJ, Silva E, Desario C, Decaro N, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008. “Natural co-infection with 2 parvovirus variants in dog”. *Emerging Infectious Diseases* 14(4):678-679.

1.1.2 - Artigo 2 - Decaro N, Desario C, Addie D, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C, 2007. “Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe”. **Emerging Infectious Diseases** 13(8):1222-1224.

1.1.3 - Artigo 3 - Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Decaro N, Desario C, Muller A, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008 “Canine Parvovirus 2c infection in central Portugal”. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 20(4):488-491.

1.1.4 - Artigo 4 - Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G, (2011). “Parvovirose Canina em Portugal”. **Veterinary Medicine** (Aceite para Publicação).

1.2.1 – Artigo 1 – Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

(2008), 20:488-491

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Decaro N, Desario C, Muller A, Carvalgeira J, Buonavoglia C e Thompson G.

“Canine parvovirus 2c infection in central Portugal”

J Vet Diagn Invest 20:488–491 (2008)

Canine parvovirus 2c infection in central Portugal

Maria João Vieira, Eliane Silva, João Oliveira, Ana Luísa Vieira, Nicola Decaro, Costantina Desario, Alexandra Muller, Júlio Carvalheira, Canio Buonavoglia, Gertrude Thompson¹

Abstract. Canine parvovirus (CPV) has been evolving, generating new genetic and antigenic variants throughout the world. This study was conducted to determine the types of CPV circulating in dogs in Figueira da Foz, Portugal. Thirty fecal samples, collected between 2006 and 2007 from dogs with clinical signs of CPV infection, were tested for CPV by a rapid, in-clinic, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)/immunomigration test, by conventional real-time polymerase chain reaction (PCR), and by minor-groove binding TaqMan PCR. Of the 29 PCR-positive samples, 15 were identified as CPV-2b and 14 as CPV-2c. No CPV-2a was detected. The sensitivity of the ELISA test was 82.76% compared with the PCR assays. No significant associations were found between CPV type, clinical outcome, breed, vaccination status, or age.

Key words: Canine parvovirus; minor groove binder probe assays; polymerase chain reaction; sequence analysis; Portugal.

Canine parvovirus (CPV) was first isolated in 1978.¹ Over time, the original CPV-2 isolates were replaced by new antigenic types, termed CPV-2a, and a virus type displaying a single mutation that was termed CPV-2b.^{9,11} Since 1996, a number of additional mutations have been described, some of which resulted in antigenic changes in the virus.¹⁸ Recent studies on CPV strains in Italy revealed

the appearance of a CPV-2 mutant with an amino acid substitution at position 426 (Asp to Glu).^{2,6,9} Currently, this CPV-2 type, previously referred to as Glu-426 mutant and now named CPV-2c, co-circulates with CPV-2a and CPV-2b. Since its discovery, CPV-2c has also been detected in Vietnam,¹⁰ Europe,³ the United States,^{7,8} and South America.¹³ Canine parvovirus appears to be undergoing continuous evolution, and the new viruses show antigenic differences that may influence the susceptibility of young animals to infection at the time when the level of maternally derived antibody decreases to the minimum protective titer.³ This variation could, potentially, negatively affect vaccine efficacy, although it has been shown recently that dogs vaccinated once with a particular live, attenuated CPV-2 vaccine were protected from challenge with a type 2c field isolate.¹⁷ Similarly, the performance of diagnostic testing could be affected by viral variation; although to

From the Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS) University of Porto, Portugal (M.J. Vieira, Silva, Muller, Carvalheira, Thompson); Clínica (veterinary clinic) Figueira da Foz, Portugal (M.J. Vieira, Oliveira, A.L. Vieira); and the Department of Animal Health and Well-being Faculty of Veterinary Medicine of Bari Valenzano, Italy (Decaro, Desario, Buonavoglia).

¹Corresponding Author: Gertrude Thompson, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), Department of Veterinary Clinics, Rua Padre Armando Quintas 4485-661 Vairão, Portugal. gat1@mail.icav.up.pt

date, there has been no evidence for missed diagnoses because of antigenic variation, despite the observed differences between the assays.⁶

Rapid enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) that detect CPV antigen in feces using monoclonal antibody (mAb) or polyclonal antisera are frequently used in the diagnosis of parvovirus infections in veterinary practice.⁶ The ELISA broadly recognizes CPV-2 viruses and does not distinguish between antigenic types. To determine antigenic differences between CPV-2 types, panels of mAbs are tested for their reactivity to each virus in hemagglutination inhibition assays.^{5,10} However, mAb characterization requires samples with high hemagglutination titers ($\geq 1:64$).⁶ A polymerase chain reaction (PCR)-based method was developed to identify CPV-2a and CPV-2b,¹¹ but that assay does not differentiate between types 2b and 2c.² A PCR restriction fragment-length polymorphism assay using the enzyme *Mbo*II was developed, but it only differentiated type 2c and not other CPV types.² To distinguish between CPV types, a real-time PCR assay, based on minor groove binder (MGB) probe technology was developed.^{5,6} This assay takes advantage of a single nucleotide polymorphism that occurs at position 426 in the viral VP2 gene to identify and characterize antigenic variants. An additional probe was also designed to discriminate between vaccine and field strains of CPV.⁵

The objective of the current study was to determine and identify the CPV variants present in the area of Figueira da Foz in central Portugal. The study sample comprised 30 dogs, less than 36 weeks of age, with clinical signs suggestive of parvovirus infection (lethargy, anorexia, vomiting, or diarrhea), and with a history of incomplete or no vaccinations. The animals had been admitted to a local veterinary clinic between April 2006 and January 2007. Fecal samples were collected from these dogs, and samples were screened for CPV with a commercial rapid antigen-detection ELISA.^a The associations of risk factors, such as breed, age, vaccination status, clinical outcome, or CPV-2b or CPV-2c, were determined by chi-square testing using 1 degree of freedom at the 5% level of significance.

For the molecular characterization, all fecal samples were homogenized (10% w/v) in phosphate-buffered saline and centrifuged for 15 min at $1,500 \times g$. The viral DNA was extracted from the supernatant of each specimen by boiling for 10 min and chilling on ice and then diluting 1:10 in distilled water.^{6,15} This method has been described to be as efficient as phenol-chloroform extraction methods and is less laborious than the latter methods.¹⁵

For the generic detection of CPV DNA, the nucleic acid extracts of all samples were tested by real-time PCR as previously described.⁶ For further characterization of the CPV-2 variants, the MGB probe technology⁵ was applied to all the samples positive by real-time PCR. The fecal samples from 2 animals, PTUP06/06 and PTUP25/06 (Table 1), that were vaccinated less than 10 days before sample collection, were further tested with the MGB probe to discriminate vaccine virus from field strains. Conventional PCR was performed to amplify a fragment with 583-base pair (bp) of the VP2 gene, a region surrounding the 426 site, using primers 555f and 555r.² Sequence analysis

was carried out by direct sequencing of the amplicons of 4 selected isolates of CPV-2b (PTUP6/06 and PTUP27/06) and CPV-2c (PTUP7/06 and PTUP29/06) described in this study. The amino acid sequences were deduced and aligned.

Twenty-four of 30 fecal samples tested by rapid ELISA were positive for CPV. Using real-time PCR and MGB probe assays, CPV was detected in 29 of 30 samples (Table 1). The rapid ELISA detected 11 type 2b and 13 type 2c viruses, but failed to detect 4 type 2b and 1 type 2c viruses; therefore, the sensitivity of the ELISA relative to real-time PCR was 82.76%. The feces of 1 animal (PTUP28/06) were negative for CPV by all assays, suggesting that the cause of its clinical condition may not have been CPV infection. Retrospective determination of seroconversion that could clarify the case in this unvaccinated animal was not performed.

Together with the CPV test results, breed, age, and vaccination status were recorded for each animal (Table 1). Of the 30 dogs with clinical signs, 20 recovered and 10 died. Twenty-one dogs were of undefined or mixed breed, and 9 dogs belonged to 6 different breeds. Ages ranged from 8 to 36 weeks. Seven animals were incompletely vaccinated, and the rest were unvaccinated. Significant associations ($P < 0.05$) between clinical outcome and breed, vaccination status, age category (younger or older than 12 weeks), or CPV type were not found.

Real-time PCR and MGB probe analysis of the 29 samples identified 15 (52%) CPV type 2b and 14 (48%) type CPV type 2c (Table 1). The specificity of these results was confirmed by conventional PCR and sequencing of 2 selected CPV-2b isolates, PTUP6/06 (GenBank EU273770) and PTUP27/06 (GenBank EU273772), and 2 selected CPV-2c isolates, PTUP7/06 (GenBank EU273771) and PTUP29/06 (GenBank EU272773). The nucleotide and deduced amino-acid polymorphic positions were compared with the most similar CPV sequences obtained through a BLAST search of GenBank database (Table 2). The comparative sequence analyses showed that sample EU273770 shared 99% identity with the North American CPV strain M74849, as a result of single nucleotide polymorphisms in positions 430 (G $\rightarrow$ A) and 580 (T $\rightarrow$ A), and only differed at position 580 (T $\rightarrow$ A) from the Brazilian isolate DQ340409. The other CPV-2b isolate analyzed in this study, EU273772, showed only 1 nucleotide polymorphism at position 580 (T $\rightarrow$ A). Both CPV-2c sequences, EU273771 and EU273773, had 100% nucleotide identity with that of CPV-2c isolate AY380577 from Italy (Table 2). The 2 sequences, PTUP06/06 and PTUP25/06, were from dogs that had been recently vaccinated; however, the viruses were determined to be CPV field strains of types 2b and 2c and not the vaccine virus.

Canine parvovirus 2a and 2b are present in the canine population worldwide, replacing the original strain CPV-2. The recent appearance of CPV-2c variants in the field is evidence of a high mutation rate for this DNA virus equivalent to that observed in RNA viruses.^{3,7,13,14,16} Although modified-live vaccines based on CPV-2 protected puppies against challenge with a recent isolate of CPV-2c,¹⁷ and modified-live vaccines based on CPV-2b protected puppies against infections with CPV-2a and CPV-2b,² the

Table 1. Breed, age, vaccination status, clinical outcome, and Canine parvovirus 2 (CPV-2) type detected in dogs with clinical signs suggestive of parvovirus infection.

Sample	Breed	Age (weeks)	Vaccination status	Clinical outcome	ELISA result	CPV type
PTUP1/06	Mixed	14	Incomplete	Died	Negative	2b
PTUP2/06	Mixed	9	None	Died	Positive	2c
PTUP3/06	Poodle	28	None	Died	Positive	2c
PTUP4/06	Basset Hound	9	Incomplete	Recovered	Positive	2b
PTUP5/06	Mixed	36	None	Recovered	Positive	2b
PTUP6/06*	Basset Hound	10	Incomplete	Recovered	Negative	2b
PTUP7/06*	Pointer	10	None	Recovered	Positive	2c
PTUP8/06	Doberman Pinscher	9	Incomplete	Recovered	Positive	2b
PTUP9/06	Portuguese Water Dog	10	Incomplete	Died	Positive	2b
PTUP10/06	Rottweiler	8	Incomplete	Recovered	Negative	2b
PTUP11/06	Mixed	8	None	Recovered	Positive	2b
PTUP12/06	Mixed	8	None	Died	Positive	2c
PTUP13/06	Mixed	8	None	Died	Positive	2c
PTUP14/06	Mixed	8	None	Died	Positive	2b
PTUP15/06	Mixed	10	None	Recovered	Negative	2b
PTUP16/06	Mixed	10	None	Recovered	Positive	2b
PTUP17/06	Mixed	10	None	Recovered	Positive	2c
PTUP18/06	Poodle	12	None	Recovered	Positive	2c
PTUP19/06	Mixed	10	None	Recovered	Positive	2b
PTUP20/06	Mixed	10	None	Recovered	Positive	2c
PTUP21/06	Mixed	10	None	Recovered	Positive	2c
PTUP22/06	Mixed	8	None	Died	Positive	2b
PTUP23/06	Mixed	10	None	Died	Positive	2c
PTUP24/06	Mixed	10	None	Died	Positive	2c
PTUP25/06	Mixed	8	Incomplete	Recovered	Positive	2c
PTUP26/06	Mixed	20	None	Recovered	Negative	2c
PTUP27/06*	Mixed	20	None	Recovered	Positive	2b
PTUP28/06	Poodle	16	None	Recovered	Negative	Negative
PTUP29/06*	Mixed	8	None	Recovered	Positive	2c
PTUP30/07	Mixed	10	None	Recovered	Positive	2b

* GenBank accession numbers of submitted CPV sequences: PTUP6/06 (EU273770), PTUP7/06 (EU273771), PTUP27/06 (EU273772), PTUP29/06 (EU273773).

rapid evolution of this virus warrants vigilance for the epidemiological consequences and for the potential need for new vaccines and diagnostic tools.

A sensitivity of 82.76% was calculated for the rapid ELISA compared with real-time PCR. This means that approximately 17% of dogs with clinical signs suggestive of CPV infection may not be positive for CPV by the ELISA. More sensitive in-clinic tests are needed to aid CPV diagnosis in practice. On the other hand, the ELISA was able to detect both CPV-2b and CPV-2c, indicating that CPV-2c will not go

undetected in the field. Interestingly, however, the test failed to detect 4 type 2b viruses. This could very likely have been due to the reduced amount of free virus available for the ELISA because the rapidly developing intestinal immune response to CPV-2 results in the formation of undetectable immune complexes.

Clinicians worry about the emergence of new CPV-2 strains that may be responsible for outbreaks of virulent disease. Some studies suggest that CPV-2c may be more pathogenic than types 2a or 2b,^{2,5} whereas others describe less-severe

Table 2. Nucleotide and amino acid polymorphic positions in the VP2 sequences of Canine parvovirus 2 (CPV-2) isolated from canine feces from clinical cases of CPV enteritis in Portugal.

CPV type	Isolate/GenBank no.	Origin/year	Codon position (amino acid)		
			426	430 (Leu)	580 (Pro)
2b	M74849	United States/1984	GAT (Asp)	TTG	CCT
	DQ340409	Brazil/1985	GAT (Asp)	TTA	CCT
	EU273770	Portugal/2006	GAT (Asp)	TTA	CCA
	EU273772	Portugal/2006	GAT (Asp)	TTA	CCA
2c	AY380577	Italy/2000	GAA (Glu)	TTA	CCA
	EU273771	Portugal/2006	GAA (Glu)	TTA	CCA
	EU273773	Portugal/2006	GAA (Glu)	TTA	CCA

clinical symptoms and lower mortality rates in CPV-2c-infected dogs.⁴ The results presented in the current study did not confirm either hypothesis. Both, CPV-2b and CPV-2c were found in severe disease, and significant differences were not found in the clinical outcome of dogs infected with CPV-2b versus CPV-2c. Further, significant associations were not found between breed, age category (<12 weeks, >14 weeks), vaccination status, or clinical outcome.

The present findings revealed that of the 29 analyzed CPV-2 strains obtained in central Portugal, nearly half were of type 2c, suggesting that this variant is replacing CPV-2a and CPV-2b. Type 2a viruses were not detected in this group of dogs, but more samples should be tested to assess the actual prevalence of this CPV type. The sequence analysis of field isolates in this study also indicated a single nucleotide polymorphism in the VP2 gene, similar to that found in Brazil.¹² To the authors' knowledge, the single nucleotide polymorphism found in codon 580 (T → A) has not been previously reported. This mutation does not result in an amino-acid change in the viral capsid, and the epidemiological consequences of this replacement are yet to be determined. Canine parvovirus 2c sequences obtained from 2 dogs from Portugal were identical to the strain AY380577 from Italy. However, more samples should be analyzed to investigate whether mutations (e.g., those observed in North American CPV-2c isolates^{7,8}) are also present in Europe and whether an international trend in viral evolution can be observed. It is, therefore, important to assess the current prevalence of CPV-2 variants in domestic dog populations, as well as the diagnostic sensitivity of current in-clinic tests and vaccine efficacy.

Acknowledgements. This work was supported by the Foundation for Science and Technology Portugal (FCT) grant SFRH/BD/ 23101/2005 to M. J. Vieira and by Intervet Portugal. The authors thank the National Laboratory for Veterinary Investigation (LNIV, Delegação do Porto) for infrastructural support.

Sources and manufacturers

- a. Witness® Parvo, Symbyotics Corp., Lyon, France.

References

- Appel MJG, Scott FW, Carmichael LE: 1979, Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis. *Vet Rec* 105:156–159.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al.: 2001, Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol* 82:3021–3025.
- Decaro N, Desario C, Addie DD, et al.: 2007, Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 13:1222–1224.
- Decaro N, Desario C, Campolo M, et al.: 2005, Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest* 17:133–138.
- Decaro N, Martella V, Desario C, et al.: 2006, First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53:468–472.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, et al.: 2005, Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods* 121:179–185.
- Hong C, Decaro N, Desario C, et al.: 2007, Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19:535–539.
- Kapil S, Cooper E, Lamm C, et al.: 2007, Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs: 2006–2007. *J Clin Microbiol* 45:4044–4047.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, et al.: 2004, A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol* 42:1333–1336.
- Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, et al.: 2004, A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol* 149:2261–2269.
- Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, et al.: 1988, The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol* 69:1111–1116.
- Pereira CA, Leal ES, Durigon EL: 2007, Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. *Infect Genet Evol* 7:399–409.
- Perez R, Francia L, Romero V, et al.: 2007, First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* 124:147–152.
- Qin Q, Loeffler IK, Li M, et al.: 2007, Sequence analysis of a canine parvovirus isolated from a red panda (*Ailurus fulgens*) in China. *Virus Genes* 34:299–302.
- Schunck B, Kraft W, Truyen U: 1955, A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods* 55:427–433.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC: 2005, High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:379–384.
- Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, et al.: 2008, Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol* 128:48–55.
- Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR: 1996, Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215:186–189.

1.2.2 – Artigo 2 – Emerging Infectious Diseases

(2007), 13(8):1222-1224

Decaro N, Desario C, Addie D, Martella V, Vieira M, Elia G, Zicola A, Davis C, Thmpson G, Thiry E, Truyen U e Buonavoglia C.

“Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe”

Nota: A contribuição científica neste artigo refere-se aos dados obtidos em Portugal.

DISPATCHES

Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe

Nicola Decaro,* Costantina Desario,*
Diane D. Addie,† Vito Martella,*
Maria João Vieira,‡ Gabriella Elia,*
Angelique Zicola,§ Christopher Davis,†
Gertrude Thompson,‡ Ethienne Thiry,§
Uwe Truyen,¶ and Canio Buonavoglia*

Canine parvovirus (CPV), which causes hemorrhagic enteritis in dogs, has 3 antigenic variants: types 2a, 2b, and 2c. Molecular method assessment of the distribution of the CPV variants in Europe showed that the new variant CPV-2c is widespread in Europe and that the viruses are distributed in different countries.

Canine parvovirus type 2 (CPV-2) is a small, nonenveloped DNA virus that emerged suddenly in 1978 as an enteric pathogen of dogs. Two antigenic variants, CPV-2a and CPV-2b, are now distributed worldwide (1). A third CPV variant, first named Glu-426 mutant and subsequently renamed CPV-2c, was detected in Italy in 2000 (2) and is now circulating in that country together with types 2a and 2b (3–5). The new variant 2c has also been reported in Vietnam by Nakamura et al., who developed monoclonal antibodies that can identify specifically such a mutant (6) and more recently in the United States by Saliki et al. (unpub. data) and in South America (7). The antigenic variants differ from the original type CPV-2 for a few amino acids in the VP2 protein, whereas genetic differences among the variants are determined only by residue 426, with types 2a, 2b, and 2c displaying Asn, Asp, and Glu, respectively (8,9). Recently, minor groove binder (MGB) probe assays have been established for characterization of CPV strains and account for the presence of single nucleotide polymorphisms in the genome of the different variants (5). Our objective was to determine the distribution of the CPV variants in different European countries by using the new technology, with particular emphasis on the widespread circulation of CPV-2c in some areas of Europe.

The Study

A total of 232 fecal samples or CPV isolates were obtained from dogs with diarrhea in Italy (n = 107), Germany (n = 37), the United Kingdom (n = 41), Portugal (n = 31), Belgium (n = 13), Spain (n = 1), Switzerland (n = 1), and the Czech Republic (n = 1). The fecal samples collected in Italy, the United Kingdom, Portugal, and Belgium were CPV-positive according to PCRs performed in local laboratories. Samples were collected during 2005–2006, with the exception of samples from Italy that were collected only in 2006 because other studies had assessed the molecular epidemiology of CPV in the previous decade (5). All samples from Germany consisted of cell-culture-adapted CPV strains isolated from dogs with diarrhea in Germany during 1996–2005.

Samples were homogenized (10% w/v) in phosphate-buffered saline (pH 7.2) and subsequently clarified by centrifuging at 1,500× g for 15 min. Viral DNA was extracted from the supernatants of fecal homogenates or from the viral suspensions by boiling for 10 min and chilling on ice. To reduce residual inhibitors of DNA polymerase activity to ineffective concentrations, the DNA extracts were diluted 1:10 in distilled water (10). CPV DNA titers were calculated by using a real-time PCR, based on TaqMan technology and able to recognize all CPV strains (10), whereas characterization of the viral type was obtained by means of MGB probe assays specific for types 2a/2b and 2b/2c (5). To rule out the presence of CPV strains of vaccine origin, which are usually type 2 or less frequently type 2b, we subsequently tested samples recognized as types 2/2a and 2b by MGB probe assays that discriminate between vaccine and field strains of CPV (11,12).

All samples that had CPV-positive results from laboratories located in the countries of sample origin were confirmed by TaqMan assay to contain CPV DNA. CPV infection was also demonstrated in the single samples from Spain, Switzerland, and the Czech Republic (Figure). In Italy, a nearly complete substitution of CPV-2b by CPV-2c was noted; CPV-2a strains were found at low frequency, which confirmed the progressive decrease noted during the past 5 years (3–5). In contrast, CPV-2b is still prevalent in Germany and Portugal, although CPV-2c is also widespread in these countries. Retrospective analysis of archival samples showed that CPV-2c has been circulating in Germany since 1996. An equivalent distribution of types 2a and 2b was assessed in the United Kingdom, where a single CPV-2c strain was detected. In Portugal, no CPV-2a strain was detected, whereas in Belgium all CPVs were type 2a. The single samples from Switzerland and the Czech Republic were CPV-2a, whereas the sample from Spain was CPV-2c. The original type CPV-2 was detected in 1 sample from the United Kingdom and 4 from Italy, but the latter samples had been collected from dogs shortly after vaccination with a classic type-2–based vaccine (12).

*University of Bari, Bari, Italy; †University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK; ‡University of Porto, Porto, Portugal; §University of Liege, Liege, Belgium; and ¶University of Leipzig, Leipzig, Germany

Canine Parvovirus, Europe

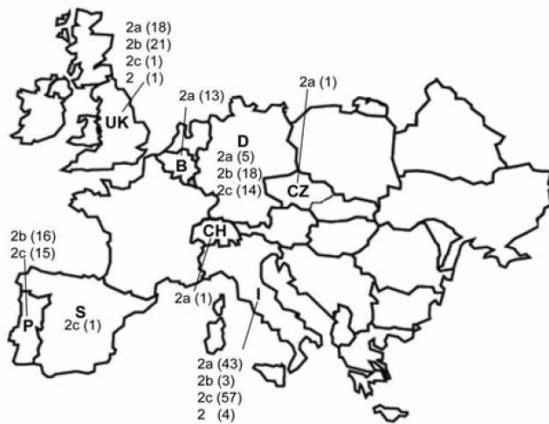


Figure. Geographic distribution of antigenic variants of canine parvovirus (CPV) in Europe. CPV-positive fecal samples or viral isolates from different countries were analyzed by molecular methods; strains CPV-2, 2a, 2b, or 2c are indicated for each country by numbers in parentheses. Samples were collected during 2005–2006, except for samples from Italy (2006) and Germany (1996–2005). P, Portugal; S, Spain; UK, United Kingdom; B, Belgium; CH, Switzerland; D, Germany; CZ, Czech Republic.

Conclusions

Despite its DNA genome, CPV possesses a high genetic substitution rate, similar to that observed for RNA viruses, which is responsible for continuous antigenic evolution and rapid displacement of old types by new antigenic variants (13). CPV-2c, which emerged in Italy in 2000 (2), is spreading with high efficiency in the dog population of Italy and progressively replacing the antigenic variants 2a and 2b (3–5). Such a variant has been detected in Vietnam also (6), but no information is available on its presence and distribution in other European countries, except for a single case report from Spain (14).

Our study shows that the new variant 2c is widespread in some European countries (Italy, Portugal, and Germany) and that it could be detected sporadically in the United Kingdom. In contrast with previous studies of CPV-2a in Europe, our study showed that CPV-2a is most frequent in Belgium, whereas in the United Kingdom, Germany, and Italy, it has been overtaken by CPV-2b or CPV-2c. In Portugal, CPV-2a was not detected at all, but types 2b and 2c were equally distributed. To our knowledge, this is the first report of the new variant 2c in Portugal, the United Kingdom, and Germany. In Germany, CPV-2c was detected in archival samples collected in 1996; thus, it was circulating in Europe 4 years before its first official report in Italy. Such a variable geographic distribution of the CPV variants in Europe may be related to different commercial flows of dogs imported from foreign countries rather than to different vaccination protocols.

The progressive spreading of CPV-2c in the world or, less probably, its independent emergence in different countries, suggests that the Glu-426 mutation provides a certain advantage in viral replication. The replacement of CPV-2 by types 2a and 2b has been associated with increased ability to bind canine transferrin receptors, although it might not rule out the possibility of mutations at residue 426 of the VP2 protein being selected also for their antigenic effects (7). Whether the Glu-426 mutation confers benefit in receptor-binding activity is of interest. Another question is whether the CPV vaccines currently used provide full protection against the new variant or whether they should be replaced by homologous vaccines.

This work was supported by grants from the University of Bari (Ricerca di Ateneo 2006: “Caratterizzazione delle varianti di campo del parvovirus del cane mediante real-time PCR con sonde minor groove binding”).

Dr Decaro is an associate professor at the Faculty of Veterinary Medicine of Bari, Italy. His research interests include the study of viral pathogens of dogs, with particular emphasis on canine parvovirus and canine coronavirus.

References

1. Truyen U. Evolution of canine parvovirus—a need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 2006;117:9–13.
2. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001;82:3021–5.
3. Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, et al. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1333–6.
4. Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, et al. New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005;52:316–9.
5. Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, et al. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods.* 2006;133:92–9.
6. Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HT, Nguyen NH, et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol.* 2004;149:2261–9.
7. Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, Lopez I, Hernandez M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol.* 2007; [Epub ahead of print].
8. Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro J-Y, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 1991;65:6544–52.
9. Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. Genetic and antigenic variation of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes.* 2006;33:11–3.
10. Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Di Trani L, et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol.* 2005;105:19–28.

DISPATCHES

11. Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Buonavoglia D, et al. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J Virol Methods*. 2006;138:10–6.
12. Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, et al. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 2007;25:1161–6.
13. Shackleton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:379–84.
14. Decaro N, Martella V, Desario C, Bellacicco AL, Camero M, Manna L, et al. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006;53:468–72.

Address for correspondence: Nicola Decaro, Department of Animal Health and Well-being, Faculty of Veterinary Medicine of Bari, Strada per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano, Bari, Italy; email: n.decaro@veterinaria.uniba.it

1.2.3 – Artigo 3 – Emerging Infectious Diseases

(2008), 14(4):678-679

Vieira M, Silva E, Desario C, Decaro N, Carvalheira J,
Buonavoglia C e Thompson G.

“Natural Co-Infection with 2 Parvovirus Variants in Dog”

LETTERS

species level and for providing new data about the emergence or reemergence of rickettsioses, as reported here. These assays are, however, time-consuming and only available in specialized reference laboratories.

Clinicians need to be aware of the presence murine typhus in Algeria, especially among patients with unspecific signs and fever of unknown origin. Tetracyclines remain the treatment of choice.

**Nadjet Mouffok,*
Philippe Parola,†
and Didier Raoult†**

*Service des Maladies Infectieuses CHU Oran, Oran, Algeria; and †World Health Organization Collaborative Centre for Rickettsial and Arthropod-borne Bacterial Diseases, Marseilles, France

References

1. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:694–719.
2. Letaief AO, Kaabia N, Chakroun M, Khalifa M, Bouzouaia N, Jemni L. Clinical and laboratory features of murine typhus in central Tunisia: a report of seven cases. *Int J Infect Dis*. 2005;9:331–4.
3. Mouffok N, Benabdellah A, Richet H, Rolain JM, Razik F, Belamadani D, et al. Reemergence of rickettsiosis in Oran, Algeria. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:180–4.
4. Parola P, Miller RS, McDaniel P, Telford SR III, Wongsrichanalai C, Raoult D. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:592–5.
5. Gikas A, Doukakis S, Padiaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselentis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96:250–3.
6. Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. *JAMA*. 1991;266:1365–70.
7. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2715–27.
8. La Scola B, Rydkina L, Ndiokubwayo JB, Vene S, Raoult D. Serological differentiation of murine typhus and epidemic typhus using cross-adsorption and Western blotting. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7:612–6.
9. Mokrani K, Fournier PE, Dalichaouche M, Tebbal S, Aouati A, Raoult D. Reemerging threat of epidemic typhus in Algeria. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3898–900.
10. Parola P, Vogelaers D, Roure C, Janbon F, Raoult D. Murine typhus in travelers returning from Indonesia. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:677–80.

Address for correspondence: Didier Raoult, Unité des Rickettsies, CNRS UMR 6020, IFR 48, WHO Collaborative Centre for Rickettsial and Arthropod-borne Bacterial Diseases, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 27 Blvd Jean Moulin, 13385 Marseilles CEDEX 5, France; email: didier.raoult@medecine.univ-mrs.fr

Natural Co-infection with 2 Parvovirus Variants in Dog

To the Editor: Canine parvovirus (CPV) emerged in the late 1970s, presumably by mutations in feline panleukopenia virus, and became a major viral pathogen of dogs worldwide (1). Between 1979 and 1981, the original type 2 virus (CPV-2) was replaced by a new genetic and antigenic variant, type 2a (CPV-2a). Between 1983 and 1984, CPV-2a was replaced by type 2b (CPV-2b), which differs from type 2a by only 1 epitope located at residue 426 of the VP2 capsid protein (2). CPV-2 does not replicate in cats, but the new variants replicate in dogs and cats (3). Recently, an antigenic change has been observed in a new strain, CPV-2c, isolated from domestic dogs in Italy (4). This variant was also detected in Vietnam (5), other countries in Europe (6), and the United States (7). CPV-2c was recently detected in cats (8) and is characterized by a replacement of aspartic acid with glutamic acid at residue 426 of the VP2 capsid protein.

To identify CPV types 2, 2a, and 2b, PCR methods were developed (9). However, these methods could not distinguish type 2c from type 2b (4). Consequently, we used a PCR–restriction fragment-length polymorphism (RFLP) assay with endonuclease *Mbo*II. This enzyme can distinguish type 2c from other CPVs (4). Recently, a real-time PCR assay based on minor groove binder (MGB) probe technology was developed for rapid identification and characterization of the antigenic variants. This assay is based on 1 nucleotide polymorphism in the VP2 gene (10).

In June 2006, a 10-week-old female dog (PT-32/07) was brought to the veterinary clinic in Figueira da Foz, Portugal, with clinical signs of parvovirus infection, after an episode of gastrointestinal disease in her litter. Three littermates, also brought to the clinic, showed no signs of infection. None of the dogs were vaccinated against CPV. Clinical signs in dog PT-32/07 were lethargy, anorexia, vomiting, diarrhea, and a temperature of 39.3°C. Identical signs were observed in 1 littermate 3 days later; the 2 other dogs did not show any signs other than lethargy and loose stools.

Rectal swab samples from all dogs were screened for CPV by using an immunomigration rapid test (Synbiotics Corporation, Lyon, France). Two of the dogs showed negative results, and 2 showed positive results. Feces, serum, and lingual swab samples were positive for parvovirus DNA. DNA was quantified by using a real-time PCR with TaqMan technology performed in an i-Cycler iQ (BioRad Laboratories, Milan, Italy).

CPV variants were characterized by using MGB probe technology. This technology uses type-specific probes labeled with different fluorophores (FAM and VIC) that can detect single nucleotide polymorphisms between CPV types 2a/2b and 2b/2c (10). MGB probes specific for type 2b were labeled with FAM in both type 2a/2b

LETTERS

and 2b/2c assays, and MGB probes specific for type 2a (type 2a/2b assay) and type 2c (type 2b/2c assay) were labeled with VIC.

All specimens from 1 dog (PT-32/07) were positive for the 2 variants of CPV type 2 (CPV 2b and CPV 2c). Conversely, of the 3 littermates, 2 were positive for CPV type 2b and 1 was positive for CPV type 2c in all samples (Table).

A conventional PCR and RFLP analyses were performed by using the method of Buonavoglia et al. (4) with known positive CPV-2b and CPV-2c samples as controls to confirm our findings. The 583-bp PCR product obtained from the coinfecting dog by using primer pair 555for/555rev was digested with *Mbo*II. Digestion generated 2 fragments (≈500 and 80 bp) in all dog samples. The CPV-2c control sample showed 2 fragments (≈500 and 80 bp), and CPV-2b control sample was not digested with *Mbo*II.

We report CPV-2b and CPV-2c variants in samples from a dog with littermates that were positive for CPV-2b or CPV-2c during an episode of gastrointestinal disease. Co-infection with multiple CPV variants that showed high genetic diversity in the VP2 gene has recently been reported in a domestic cat (8). Continuous and rapid evolution of CPV may cause serious problems in diagnostic testing and vaccine efficacy. Antigenic

variation may negatively affect vaccine efficacy if changes occur at major antigenic sites. Thus, continuous monitoring for novel genetic and antigenic virus types is needed. Additional studies are in progress to characterize nucleotide sequences of all CPV isolates from this case.

Acknowledgments

We thank the Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Porto, Portugal, for infrastructural support.

This work was supported by a fellowship of the Fundação para a Ciência e Tecnologia of the Ministry of Science and Technology, Portugal, and by Intervet Portugal.

**Maria João Vieira,*† Eliane Silva,*
Costantina Desario,‡
Nicola Decaro,‡
Júlio Carvalheira,*
Canio Buonavoglia,‡
and Gertrude Thompson***

*Universidade do Porto, Porto, Portugal;

†Clínica-Clinica Veterinária, Figueira da Foz, Portugal; and ‡University of Bari, Bari, Italy

References

1. Truyen U. Evolution of canine parvovirus: a need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 2006;117:9–13.
2. Parrish CR, Aquandro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA and sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 1991;65:6544–52.
3. Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology.* 1996;215:186–9.
4. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001;82:3021–5.
5. Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HT, Nguyen NM, et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol.* 2004;149:2261–9.
6. Decaro N, Desario C, Addie D, Martella V, Vieira MJ, Elia G, et al. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1222–4.
7. Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo MC, Sanchez S, et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19:535–9.
8. Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prosperi S. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology.* 2006;352:22–6.
9. Senda M, Parrish CR, Harasawa R, Gamoh K, Muramatsu M, Hirayama N, et al. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J Clin Microbiol.* 1995;33:110–3.
10. Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, et al. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods.* 2006;133:92–9.

Address for correspondence: Gertrude Thompson, Department of Veterinary Clinics, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Porto, Portugal; email: gat1@mail.icav.up.pt

Table. Detection by minor groove binder probe assay of CPV antigenic variants in different specimens from dogs from the same litter (10 weeks old), Portugal, 2006*

Dog	Vaccines	Rapid test result for CPV	Days in clinic	Clinical course	Samples	TaqMan probe				CPV
						FAM a/b	FAM b/c	VIC a/b	VIC b/c	
PT-15/07	None	–	7	Recovered	Feces	+	+	–	–	2b
					Lingual swab	+	+	–	–	2b
					Serum	+	+	–	–	2b
PT-16/07	None	+	7	Recovered	Feces	+	+	–	–	2b
					Lingual swab	+	+	–	–	2b
					Serum	+	+	–	–	2b
PT-17/07	None	+	7	Recovered	Feces	–	–	–	+	2c
					Lingual swab	–	–	–	+	2c
					Serum	–	–	–	+	2c
PT-32/07	None	–	7	Recovered	Feces	+	+	–	+	2b/2c
					Lingual swab	+	+	–	+	2b/2c
					Serum	+	+	–	+	2b/2c

*CPV, canine parvovirus.

1.2.4 – Artigo 4 – Veterinary Medicine

(2011), Aceite para publicação

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira A, Carvalheira J e Thompson G.

“Parvovirose Canina em Portugal”

Resumo

A infecção por parvovírus canino (CPV) representa, ainda hoje, uma das doenças infecciosas com maior morbidade e mortalidade em cães jovens. Actualmente, sabe-se que esta pode ser provocada por três subtipos de parvovírus canino designados por CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. Recentemente, têm também sido descritos casos de co-infecção com mais do que um subtipo deste vírus em animais com gastroenterites hemorrágicas.

Durante o período compreendido entre Abril de 2006 e Abril de 2009, foram recolhidas 122 amostras de fezes de animais com sintomatologia característica de infecção por parvovírus (vómito, diarreia, anorexia, apatia). Estas amostras foram recolhidas em centros de atendimento médico-veterinários da zona Norte, Centro e Sul de Portugal.

Após a detecção do CPV nas fezes de 104 animais, procedeu-se à sua caracterização, utilizando métodos moleculares baseados em técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real. Após a tipificação das amostras, caracterizou-se a distribuição geográfica dos subtipos pelas diferentes zonas do país e relacionou-se a sua presença com os dados clínicos, laboratoriais e de prognóstico.

Palavras Chave: Parvovírus Canino, Caracterização Genética, Epidemiologia, Portugal,

Texto**1. Introdução**

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é um vírus de ADN, pequeno e sem invólucro, que emergiu de forma súbita em 1978, como um agente patogénico entérico dos cães. ¹

Este vírus é responsável por uma gastroenterite altamente contagiosa caracterizada com sinais de perda de apetite, vômito, diarreia (desde mucóide a hemorrágica) e leucopénia.²

Esta doença continua associada a elevada morbilidade e mortalidade em cachorros, mas actualmente têm sido descritos casos em cães adultos e em animais vacinados.³

O parvovírus canino representa um dos poucos exemplos onde o processo de transmissão vírica inter-espécies foi observada em “tempo real”. De facto, este vírus sofreu mutações genéticas importantes, que determinaram diferentes propriedades antigénicas, num curto período de tempo.⁴ Estudos de evolução vírica e filogenéticos sugerem que o CPV-2 teve origem num vírus semelhante ao da panleucopénia felina (ancestral comum) que se adaptou e infectou alguns carnívoros selvagens, como os guaxinis, martas e raposas. Este vírus sofreu mais alterações, que lhe permitiram quebrar a barreira inter-espécies e afectar o cão.^{5,6}

Em 1979, surgiu uma nova variante do vírus (designada CPV-2a) que, em cerca de um ano, substituiu o CPV-2 em todo o mundo.⁷ O CPV-2a difere antigenicamente do CPV-2 original em 5 aminoácidos da proteína da cápside, VP2, e infecta tanto cães como gatos.⁸ Hoje em dia, sabe-se que estes aminoácidos são responsáveis pelas propriedades antigénicas e pela gama de hospedeiros que este vírus infecta.⁹

Em 1984, outra variante antigénica do CPV-2 surgiu, designada CPV-2b. As diferenças antigénicas em relação ao CPV-2a são consequência da substituição de apenas um aminoácido (Asn426Asp) localizado na VP2.⁹ Uma terceira variante, CPV-2c, foi primeiramente descrita em Itália em 2000, e circula actualmente por todo o mundo, juntamente com o CPV-2a e o CPV-2b.^{10, 11, 12, 13} O CPV-2c foi também isolado de forma pontual em gatos.¹⁴

Recentemente foi descrita em Portugal a co-infecção de dois subtipos de CPV-2 num cão.¹⁵ A infecção simultânea com mais do que uma variante de CPV-2 também foi identificada

num gato doméstico,¹⁶ assim como a co-infecção com estirpe de campo e vacinal em cães,¹⁷ e com múltiplos vírus relacionados com o género *Parvovirus*, incluindo o parvovírus humano B19.¹⁸ Assim, as co-infecções com múltiplas variantes de parvovírus podem ocorrer de forma frequente, potencialmente facilitando a recombinação genética.¹⁹

O diagnóstico clínico definitivo da infecção por CPV-2 não é possível, pois muitos outros agentes podem causar diarreia em cães. Assim, um diagnóstico clínico deve sempre ser confirmado por métodos laboratoriais.²⁰ De forma rotineira, as fezes de cães com diarreia e suspeitos de infecção por parvovírus são analisadas usando testes ELISA nos próprios centros de atendimento médico-veterinários. Estes testes apresentam, no entanto, baixa sensibilidade. Por outro lado, métodos baseados na detecção de ADN de CPV-2 por técnicas de PCR mostraram ser altamente sensíveis na detecção da presença de vírus. Recentemente, foram desenvolvidos métodos de detecção de ADN por PCR em tempo real. Este método, baseado na tecnologia TaqMan, mostrou ser altamente sensível, específico e reproduzível, com a vantagem de ser um método de diagnóstico rápido.²⁰

Não existe hoje em dia nenhuma técnica, que por si só, caracterize de forma precisa as variantes de CPV-2. O uso de PCR- RFLP (“PCR-restriction fragment length polymorphism”) apresenta como limitações a incapacidade de distinguir entre os subtipos CPV-2, CPV-2a e CPV-2b, tanto em infecções únicas, como em co-infecções entre estes subtipos.¹⁵

Apesar do PCR em tempo real com o uso de sondas MGB (Minor Groove Binding) ser uma técnica bastante precisa e descrita como o “Gold Standard” para a caracterização molecular do CPV-2,²¹ apresentou algumas limitações, nomeadamente, o facto de não distinguir as variantes CPV-2c de casos de co-infecção, num estudo realizado em Portugal (Vieira et al.: Dados não publicados, 2010). Num estudo realizado na Tunísia, não foi

possível determinar com exactidão algumas das variantes de CPV-2 pois algumas mutações impedem a correcta caracterização molecular, usando esta metodologia.²²

Pouco se sabe sobre a circulação das variantes de CPV-2 no País. Em 2008, num estudo conduzido na zona centro do País, determinava-se a existência de CPV-2c em Portugal simultaneamente com a circulação de CPV-2b de uma forma quase equitativa.

Nessa altura, não foi identificada a variante CPV-2a em nenhum animal.²³

O presente trabalho pretende descrever a caracterização das estirpes de parvovírus canino em circulação em Portugal, a sua distribuição geográfica e relacionar os resultados epidemiológicos com a sobrevivência, gravidade e prognóstico desta infecção. Pretende-se também fazer uma avaliação da frequência das variantes na zona Centro do país desde 2006.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras

Durante o período de Abril de 2006 a Abril de 2009 foram recolhidas 122 amostras fecais de cães que se apresentaram à consulta com suspeita de infecção por CPV. As amostras foram recolhidas em diferentes zonas geográficas do país. A variação de idades destes animais situou-se entre as 4 e as 144 semanas de idade. Algumas destas amostras (47) foram rastreadas, usando testes rápidos de detecção de antigénio (ELISA) e vinte e nove destas amostras foram também avaliadas para a presença de Coronavírus canino.

2.2 Detecção e Caracterização Molecular de CPV

Foi realizada a extracção de ADN viral, utilizando a técnica anteriormente descrita por Desario et al, 2005.²⁴ A detecção genérica da presença de ADN viral específico nestas

amostras foi realizada por PCR convencional²⁰ e por PCR em tempo real.²⁴ O PCR em tempo real foi realizado num termociclador Step-One™ Real-Time instrument (Applied Biosystems). A caracterização dos subtipos de CPV foi realizada por PCR-RFLP²⁰ e também usando o PCR em tempo real com sondas MGB.²¹

2.3 Detecção e Caracterização de Coronavírus Canino

O método utilizado para a identificação de Coronavírus nas amostras de fezes neste estudo foi o de PCR por transcriptase reversa em tempo real, descrito por Decaro et al, 2004, tendo como alvo o ORF5 (gene M) do genoma do coronavírus.²⁵

2.4 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados usando o software SAS® (Statistical Analysis - SAS Institute).

A associação de factores de risco, tais como a idade, o sexo, raça, a apresentação clínica, subtipo de vírus, sobrevivência, zona do país foi determinada pelo teste do qui-quadrado, usando um grau de liberdade a um nível de significância estatística de 5%.

3. Resultados

Das 122 amostras fecais utilizadas neste estudo, 104 foram positivas para a presença de CPV, sendo 8 animais da zona norte, 87 de animais da zona centro e 9 de animais da zona sul do país.

Relativamente à tipificação das 104 amostras de CPV, 1 amostra foi tipificada como CPV-2a (1%), 35 amostras como CPV-2b (34%), 50 amostras como CPV-2c (48%) e 18 amostras como co-infecção CPV-2b/CPV-2c (17%) (Figura 1). A amostra de CPV-2a era

uma amostra do norte do país. De uma forma geral, a distribuição dos subtipos 2b e 2c parece ser equitativa em todo o país. Foram detectados casos de co-infecção em todas as zonas do país (Figura 2). O rastreio nas clínicas, usando o teste ELISA, apresentou uma concordância de 81% em relação aos métodos baseados em PCR. Assim, neste estudo, estes testes tiveram 19% de falsos negativos e nenhum falso positivo, o que lhe atribui uma sensibilidade de 81%. De notar que o teste ELISA detectou os subtipos de CPV-2b e 2c, assim como os casos de co-infecção (Figura 3). A única amostra CPV-2a não foi testada usando este método. Não houve qualquer tipo de relação entre o resultado do teste ELISA e a sobrevivência dos animais.

De uma forma geral, a taxa de mortalidade, independentemente do subtipo, foi de 22%, não se tendo detectado significância estatística entre a mortalidade e subtipo de vírus (Figura 4).

Quando analisadas as variáveis raça, sexo, desparasitação interna e vacinação prévia, em relação ao subtipo de vírus, não foi detectada qualquer relação estatística.

Os animais com contacto com a rua têm mais probabilidade de apresentar qualquer um dos subtipos de CPV ($p=0,018$). Todos os animais com co-infecção tinham co-habitantes doentes, assumindo-se este facto como tendo relevância estatística ($p=0,017$). Quando avaliada a sobrevivência, observou-se que os machos têm uma mortalidade superior, quando comparados com as fêmeas ($p=0,015$), que é independente do subtipo de CPV (Figura 5).

Não foi detectada qualquer relação entre a raça, a realização de desparasitação, de vacinação prévia, a presença de co-habitantes e a sobrevivência.

A infecção simultânea por Coronavírus canino foi identificada em 12 (41%) dos 29 animais testados. Não se verificou relação estatística entre a presença do Coronavírus canino nas fezes dos animais e determinado subtipo de CPV, mas houve diferenças

relativamente ao prognóstico, com uma relação significativa entre a presença simultânea de Coronavírus e Parvovírus e a mortalidade.

Dos animais em estudo, 84 % dos animais apresentavam vômito, 85% apresentavam diarreia (dos quais 77% era do tipo hemorrágico). Não se observou qualquer relação entre os sinais clínicos na altura da apresentação com a sobrevivência ou com o subtipo de vírus. Ao exame físico, 43% dos animais apresentavam as mucosas pálidas, 72% encontravam-se desidratados. Quanto à temperatura corporal, 32% tinham a temperatura rectal acima dos 39,2°C e 8% encontravam-se hipotérmicos (temperatura rectal inferior a 36°C). Os animais com temperatura normal tiveram uma taxa de sobrevivência maior, quando comparados com aqueles que na altura da apresentação tinham alterações na temperatura rectal ($p=0.004$).

Foram realizados hemogramas em 74 animais, onde com excepção dos valores dos granulócitos, não foi detectada relação entre os parâmetros hematológicos e a sobrevivência ou subtipo de CPV. Nos animais, que não apresentavam granulocitopenia na altura da apresentação à consulta, foram observadas taxas de sobrevivência maiores ($p=0,020$). A avaliação dos resultados, quando se agruparam os animais por zonas do país e por idades, não evidenciou quaisquer outras tendências. A avaliação da evolução temporal da frequência dos diferentes subtipos na zona Centro identificou uma tendência significativa ($p<0,05$) para o aumento da representação de CPV pelo tipo 2c e uma diminuição da frequência do tipo 2b, desde 2006 até 2009 (Figura 6).

4. Discussão

O CPV é um vírus com características únicas devido ao seu rápido processo evolutivo. A capacidade deste vírus de se adaptar a novos hospedeiros surgiu como resultado de

mutações do seu genoma, tendo quebrado a barreira inter-espécie, o que o coloca como um potencial agente patogénico para outras espécies animais.

O conhecimento da sua patobiologia e o seu diagnóstico precoce assumem grande importância, pois este vírus está associado a uma grande morbilidade e mortalidade.

Os testes ELISA são frequentemente usados na prática clínica para detecção de vírus nas fezes, pois são simples e rápidos de realizar. Estes testes reconhecem a presença de partículas virais, mas não distinguem qual o subtipo de parvovírus em questão, nomeadamente, entre as estirpes de campo e as estirpes vacinais. São, no entanto, uma ferramenta útil no rastreio inicial de animais suspeitos de infecção por Parvovírus.

No estudo em questão, não foi identificado nenhum resultado falso positivo, o que dá ao clínico um grau de certeza elevado quanto à presença de partículas virais na amostra de um animal com resultado positivo (sejam de origem vacinal, sejam estirpes de campo). A capacidade do teste de ELISA para a detecção do vírus não é afectada pelo subtipo envolvido, nem nos casos de co-infecção, o que permite detectar as infecções de forma precoce, usando este método. Estes testes não podem ser usados para determinar prognóstico, pois não houve qualquer relação entre o resultado do teste e a sobrevivência.

A presença dos 3 subtipos de CPV e das co-infecções já tinha sido detectada em Portugal anteriormente, mas apenas com amostras da Zona Centro do País.^{11,15, 23} O presente estudo inclui amostras de todo o território continental e, apesar do número de amostras nas diferentes regiões do país ser desproporcional, mostra que as estirpes de CPV mais representadas são o CPV-2b e o CPV-2c, e que de uma forma geral apresentam distribuições muito semelhantes nas três zonas do país. É interessante notar que os casos de co-infecção apresentam uma percentagem elevada, também nas três zonas de Portugal. A identificação de apenas uma amostra tipificada como CPV-2a pode ter algum significado em termos evolutivos, podendo-se questionar se esta estirpe está em vias de extinção e a

ser substituída pelas estirpes mais recentes, tal como aconteceu com o seu ancestral CPV2. Apesar de no nosso país os dados apontarem nesse sentido, em outros países da Europa, como em Itália, Inglaterra e Bélgica a incidência de infecções por CPV 2a ainda é elevada.¹¹ A presença de co-infecções (CPV 2b/CPV 2c) e seu significado clínico também não está totalmente esclarecido, sendo necessários mais estudos epidemiológicos e com uma amostragem maior para tentar avaliar de forma correcta qual o seu impacto em termos clínicos. No presente estudo, os casos de co-infecções não apresentaram diferenças na apresentação clínica e prognóstico, quando comparadas com as infecções por apenas uma estirpe. Um dado interessante é o de que todos os animais com co-infecções apresentavam co-habitantes doentes.

Neste estudo não foi possível estabelecer uma relação entre a idade e os subtipos de CPV, mas o que se sabe hoje é que há uma variação nas idades dos animais afectados por esta doença infecciosa, tendo-se observado casos de animais adultos, alguns com esquemas vacinais completos, a apresentarem sintomatologia clínica característica e com a presença de vírus subtipo CPV-2c nas fezes ⁴ e uma tendência a que a infecção se manifeste em animais jovens, mas podendo atingir faixas etárias mais avançadas, como os jovens adultos (observação pessoal do autor).

Se, por um lado, a caracterização de estirpes de parvovírus não parece apresentar relevância clínica demonstrada, pois os diferentes subtipos não apresentam diferenças significativas quanto à apresentação clínica, detecção por testes ELISA, prognóstico, além de que os meios de diagnóstico moleculares são dispendiosos para serem usados de forma rotineira na prática clínica diária. Por outro lado, pouco se sabe sobre a eficácia das diferentes vacinas em relação à exposição aos diferentes subtipos. Alguns estudos mostraram não haver diferenças nas respostas à vacina em animais, independentemente da estirpe a que são sujeitos, ¹ enquanto outros estudos demonstraram uma diminuição da

eficácia de alguns protocolos vacinais, com o aparecimento de casos de infecções por CPV 2c em animais com primovacinação correctamente executada.³

Quanto à apresentação clínica, 15% dos animais não apresentavam vômito ou diarreia, sendo a principal queixa apatia e anorexia. Este facto pode ter relevância, pois nem sempre a apresentação clínica da infecção por parvovírus é evidente e esta patologia não deve ser descartada dos diagnósticos diferenciais de animais susceptíveis, com base na ausência de vômito ou diarreia.

A presença de novas estirpes de CPV origina alguma preocupação devido à possibilidade destas poderem ser responsáveis por um pior prognóstico. Apesar de alguns estudos referirem que a estirpe 2c é mais patogénica que a estirpe 2a ou 2b,^{10, 26} outros estudos referem menor mortalidade com a estirpe 2c.²⁷ No presente estudo, não houve diferenças entre os subtipos de vírus e a mortalidade. Mesmo os casos de co-infecção não apresentaram diferenças relativamente ao prognóstico. O sexo do animal apresentou relevância estatística em relação ao prognóstico. Assim, os machos têm maior probabilidade de morrer, quando infectados por CPV, apresentando assim as fêmeas um melhor prognóstico.

A mortalidade de animais infectados por CPV pode variar de acordo com inúmeros factores, nomeadamente, o estado geral do animal na altura da apresentação clínica (alterações da temperatura revelaram um pior prognóstico), alterações laboratoriais (animais com granulocitopénia na altura da admissão nos centros de atendimento apresentaram pior prognóstico), o tipo de cuidados médico-veterinários prestados e também a presença de outros agentes patogénicos entéricos.

Neste estudo, encontrou-se uma relação estatística entre a mortalidade e a presença de dupla infecção com CPV e Coronavírus. Foram identificados casos mortais de infecção por coronavírus na ausência de CPV.²⁸ A verdade é que existem poucos estudos sobre o

efeito aditivo negativo de múltiplas infecções no prognóstico, sendo que os realizados demonstraram um aumento da severidade dos sinais clínicos, quando estes dois agentes se encontram simultaneamente.²⁹

Foram identificados como factores de melhor prognóstico, independentemente do subtipo de CPV, a ausência de alterações na temperatura e do número total de granulócitos na altura da apresentação clínica, o sexo feminino e a ausência de infecção simultânea com Coronavírus canino.

Sobre a tendência evolutiva da distribuição de subtipos na Zona Centro do País (zona de maior amostragem), e apesar do período temporal de estudo ter sido curto, ficou em evidência uma tendência estatisticamente significativa para um aumento da infecção por CPV 2c e uma diminuição do subtipo 2b. O significado destes achados está por esclarecer, mas o que se sabe é que este vírus está em evolução contínua. As estirpes de CPV apresentam altas taxas de substituição de nucleótidos num curto espaço de tempo, o que é semelhante ao que acontece com determinados vírus de RNA.^{1, 9} Esta evolução pode causar sérios problemas no diagnóstico e eficácia da imunização. Uma monitorização contínua do aparecimento de novos subtipos é essencial e a caracterização de estirpes deve ser realizada em termos regionais, de forma a melhor compreender a virulência relativa, o impacto da vacinação, a alteração das características epidemiológicas, a relação com os países vizinhos e a distribuição mundial deste agente.^{15, 22}

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela bolsa de doutoramento SRFH/BD/23101/2005 atribuída a M. J. Vieira pela Fundação para a Ciência e tecnologia (FCT), Portugal e pela Intervet Schering Portugal.

Agradecemos à BioPortugal- Químico Farmacêutica, lda.

Agradecemos aos colegas das Clínicas e Hospitais Veterinários que colaboraram no envio das amostras.

Bibliografia

- 1 – Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus –a need for new vaccines? Vet Microbiol; 117:9-13.
- 2 – Appel, MGJ., Scout, WF., Carmichael, LE., 1979. Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. Vet Rec; 105:156-159.
- 3 – Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M., Buonavoglia, C., 2008. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. New Microbiologica; 31, 125-130.
- 4 – Hoelzer, K., Schackelton, LA., Parrish, CR., Holmes, E., 2008. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of canine parvoviruses. J Gen Virol; 89:2280-2289.
- 5 - Truyen, U., 1999. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. Vet Microbiol; 69: 47-50.
- 6 - Truyen, U., Muller, T., Heidrich, R., Tackman, K. and Carmichael, L.E., 1998. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of ADN sequence from a red fox parvovirus. Epidemiol Infect; 121: 433-440.
- 7 - Parrish, CR., Have, P., Foreyt, WJ., Evermann, JF., Senda, M., Carmichael, LE., 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. J Gen Virol; 69:1111-1116.
- 8 – Truyen, U., Evermann, JF., Vieler, E., Parrish, CE, 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. Virology; 215:186-189.

- 9 - Parrish, CR., Aquadro, CF., Strassheim, ML., Evermann, JF., Sgro, J-Y., Mohammed, HO., 1991. Rapid antigenic-type replacement and ADN sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol*; 65:6544-6552.
- 10 - Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M. Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, D., Elia, G., Decao, N., Carmichal, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol*; 82:3021-3025.
- 11 - Decaro, N., Desario, C., Addie, D., Martella, V., Vieira, MJ., Elia, G., Zicola, A., Davis, D., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007. Molecular epidemiology of canine parvovirus in Europe. *Emerg Infect Dis*; 13:1222-1224.
- 12 - Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, MC., Sanchez, S., Buonavoglia, C., Saliki, T., 2007. Ocurrance of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest*; 19: 535-539.
- 13 - Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuky, M., Phung, HT., Nguyen, NM., Huynh, L., Nguyen, LT., Nguyen, PN., Nguyen, PV., Nguyen, NP., Akashi, H., 2004. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol*; 149: 2261-2269.
- 14 - Battilani, M., Bassani, M., Forti, D., Moranti, L., 2006. Analysis of the evolution of feline parvovirus (FPV). *Veterinary Research Communications*; 1: 223-226.
- 15 - Vieira, MJ., Silva, E., Desario, C., Decaro, N., Carvalheira, J., Buonavoglia, C., Thompson, G., 2008. Natural Co-infection with Parvovirus Variants in Dog. *Emerg Infect Dis*; 14: 678-679.
- 16 - Battilani, M., Scagliarini, A., Ciulli, S., Morganti, L., Prosperi, S., 2006. High genetic diversity of the VP2 gene of canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology*; 352: 22-26.

- 17 - 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.
- 18 - Candotti, D., Etiz, N., Parsyan, A. and Allain, P., 2004. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol*; 78: 12169-12178.
- 19 - Shackelton, LA., Hoeltzer, K., Parrish, CR., and Holmes, EC., 2007. Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol*; 88: 3294-3301.
- 20 - Desario C., Decaro N., Campolo M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods*; 121: 179–185.
- 21 - Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, MS., Narcisi, D., Pierluigi, S., Buonavoglia, C., 2006. Characterization of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods*; 133: 92-99.
- 22 - Touihri, L., Bouzid, I., Daoud, R., Desario, C., Goulli, AF., Decaro, Abderrazak, G., Buonavoglia, C., Bahloul, C., 2009. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. *Virus Genes*; 38: 249-258.
- 23 – Vieira, MJ., Silva, E., Oliveira, O., Vieira, AL., Decaro, N., Desario, C., Muller, A., Carvalheira, J., Buonavoglia, B., Thompson, G., 2008. Canine parvovirus 2c infection in Central Portugal. *J Vet Diagn Invest*; 20:488-491.
- 24 - Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol*; 105: 19-28.

- 25 – Decaro, N., Pratelli, A., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2004. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *J Virol Methods*; 119:145-50.
- 26 – Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, AL., Camero, M., D'Aloja, D., Buonavoglia, C., 2006. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis*; 53:468-772.
- 27 - Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest*; 17:133-138.
- 28 – Evermann, J., Abbott, J., Han, S., 2005. Canine Coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *J Vet Diagn Invest*; 17:610-614.
- 29 - Apple, M., 1988. Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection? *Vet Med*; 36:360-366.

Figuras

Figura 1

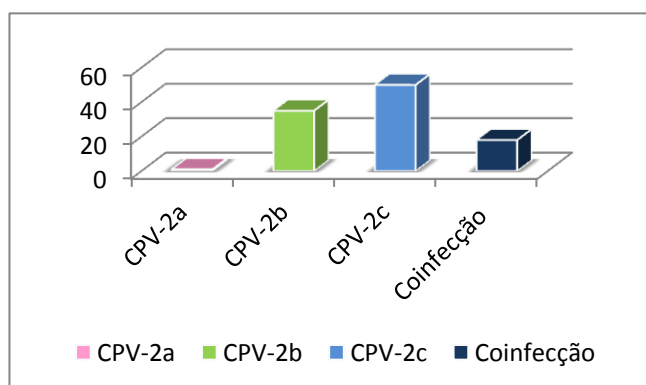


Figura 1: Resultados da tipificação das amostras fecais positivas (104) à presença de DNA de CPV, recolhidas em Portugal entre Abril de 2006 e Abril de 2009.

Figura 2

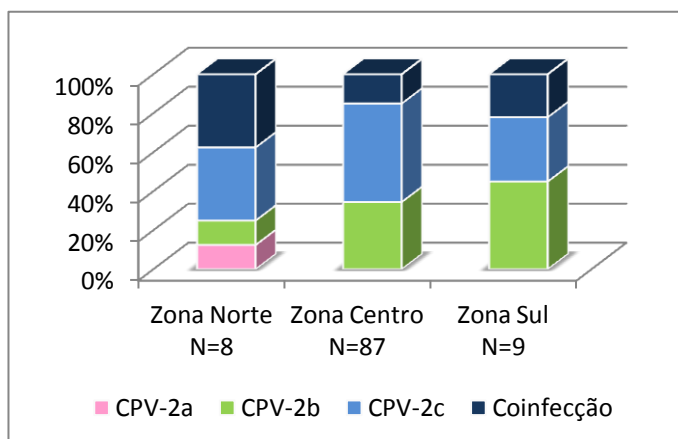


Figura 2: Distribuição relativa dos subtipos de CPV pelas diferentes zonas de Portugal.

Figura 3

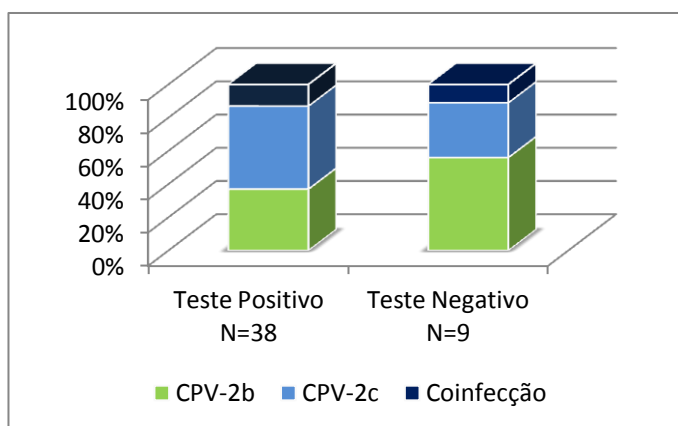


Figura 3: Resultados do teste Elisa e sua relação com os subtipos de CPV determinado por técnicas de PCR.

Figura 4

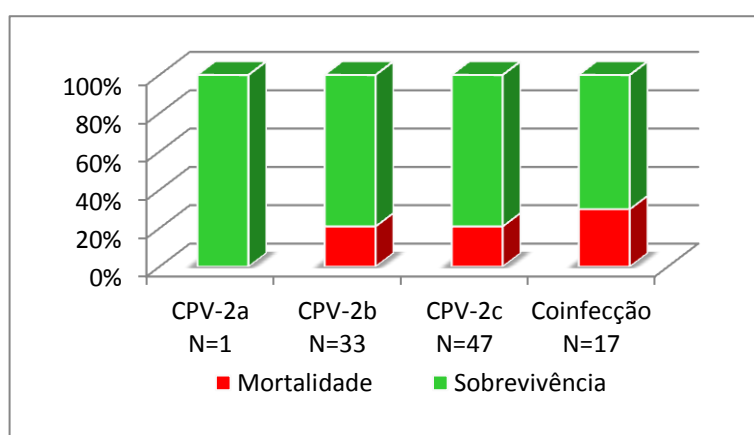


Figura 4: Evolução Clínica dos animais infectados com os diferentes subtipos de CPV.

Figura 5

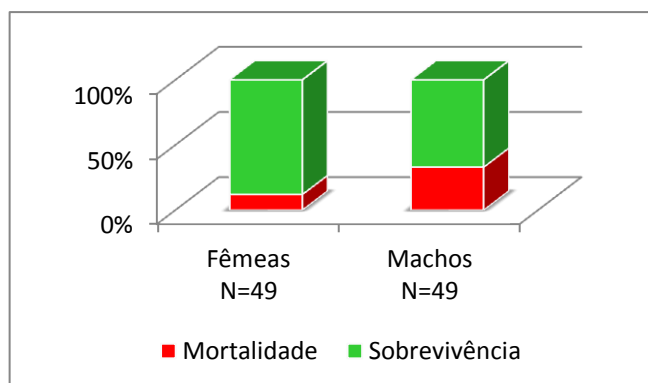


Figura 5: Evolução Clínica dos animais infectados por CPV em relação ao sexo.

Figura 6

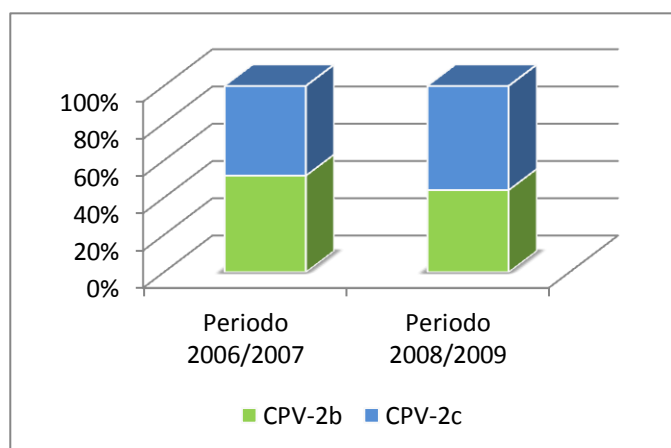


Figura 6: Evolução da distribuição dos subtipos CPV-2b e CPV-2c desde 2006 a 2009 na Zona Centro do País.

Legenda dos Figuras

Figura 1 - Tipificação das amostras fecais (104) recolhidas em Portugal entre Abril de 2006 e Abril de 2009

Figura 2 - Distribuição dos subtipos de CPV pelas diferentes zonas do país.

Figura 3 - Teste Elisa e sua relação com o subtipo de CPV determinados por técnicas de PCR

Figura 4 - Clínica dos animais em relação ao subtipo de CPV.

Figura 5 - Evolução Clínica em relação ao sexo.

Figura 6 - Evolução da distribuição dos subtipos CPV-2b e CPV-2c desde 2006 a 2009 na Zona Centro do País.

2 - ESTRATÉGIAS DE IMUNIZAÇÃO - COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DA PRIMOVACINAÇÃO EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE VACINAÇÃO E EFICÁCIA CONTRA AS DIFERENTES ESTIRPES DE CPV

2 – ESTRATÉGIAS DE IMUNIZAÇÃO – COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DA PRIMOVACINAÇÃO EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE VACINAÇÃO E EFICÁCIA CONTRA AS DIFERENTES ESTIRPES DE CPV

2.1 - Introdução

O Parvovírus Canino tem sofrido uma evolução rápida, originando alterações genéticas em curto intervalo de tempo, que são responsáveis por diferentes propriedades antigénicas dos diferentes subtipos (Hoelzer et al., 2008a). Actualmente, existem em circulação três variantes de CPV: CPV2a, CPV2b e CPV2c, com diferentes distribuições geográficas (Decaro et al., 2007c.). Em Portugal, foi também descrita a ocorrência de co-infecções por CPV com mais do que uma variante de CPV (Vieira et al., 2008a).

O controlo da parvovirose canina na população animal passa obrigatoriamente por medidas imunoproláticas, pela via da vacinação, como forma de estimular a protecção específica contra a infecção.

Sendo a vacinação dos animais uma das formas mais eficazes de profilaxia contra a infecção por CPV, há, no entanto, várias questões que têm sido colocadas sobre o significado clínico e imunológico da identificação de novas variantes do CPV nas populações animais. Alguns dos estudos até agora realizados não demonstraram uma importância significativa das alterações antigénicas sofridas por este vírus, em relação à capacidade do CPV2 vacinal proteger os cães contra as variantes de campo (Appel e Carmichael, 1987 e Greenwood et al., 1995). Sagazio et al. (1998), demonstraram haver reactividade cruzada dos soros de cachorros inoculados com vírus vacinal vivo modificado CPV2 e CPV2b contra os outros subtipos de CPV. Por outro lado, Pratelli et al. (2001), observaram que cachorros inoculados com a vacina CPV2 apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes superiores para o vírus homólogo (CPV2) em relação aos títulos para o vírus heterólogo (CPV2b).

A determinação do título de anticorpos por técnicas de IHA é usada de forma rotineira, para aferir o título de anticorpos contra CPV. A avaliação deste título é útil, para estabelecer o grau de imunidade frente à infecção, pois existe uma correlação entre o título e o grau de imunidade contra CPV (Coyne, 2000 e Pratelli et al., 2001).

Dado que a imunização contra CPV é um dos actos clínicos mais realizados em clínica de animais de companhia, torna-se essencial a obtenção de informação sobre a altura ideal, para iniciar a primovacinação em cães e a frequência dos

reforços vacinais, de forma a garantir um nível adequado de protecção e evitar a sobreestimulação imunitária por excesso de reforços vacinais.

O objectivo deste estudo consistiu em comparar a eficácia de protecção dos animais em condições de campo de três protocolos de vacinação, onde foi utilizado como critério principal a seroconversão. Foi também avaliada a interferência dos anticorpos maternos com seroconversão, bem como a duração de imunidade (um ano) após a vacinação. Os protocolos utilizados variaram entre si no número de reforços vacinais na primovacinação e na idade de início desta.

Devido à diversidade genética do CPV em circulação na população de canídeos, também se comparou a resposta serológica (aferida pelo método de IHA) perante os diferentes subtipos de vírus (CPV2, CPV2b, CPV2c e CPV2b/2c), para cada um dos protocolos vacinais.

2.2 – Material e Métodos

2.2.1 – Animais

Os animais usados no estudo foram 44 cães saudáveis, que se apresentaram no Hospital Veterinário Clínica (Figueira da Foz, Portugal) para iniciar o esquema de vacinação. Destes, 20 eram fêmeas (45 %) e 24 eram machos (55 %). Os animais pertenciam a proprietários que os mantinham em ambiente domiciliário, com acesso à rua, tendo sido seleccionados estes critérios para assim permitir um ambiente semelhante ao da realidade clínica. Os proprietários foram informados dos objectivos do estudo e assinaram um formulário de aceitação dos objectivos e autorização para participação do seu animal no mesmo.

Os critérios de inclusão no estudo estão descritos no Quadro 1.

Critérios de Inclusão		
Grupo A	Grupo B	Grupo C
- 8 a 9 semanas de idade	- 8 a 9 semanas de idade	- 12 a 13 semanas de idade
- Animal saudável dia 1	- Animal saudável dia 1	- Animal saudável dia 1
- Animal não sujeito a imunização activa anterior	- Animal não sujeito a imunização activa anterior	- Animal não sujeito a imunização activa anterior

Quadro 1: Critérios de inclusão dos animais, nos três grupos, no estudo da eficácia da primovacinação.

2.2.2 – Vacinas

Uma vacina comercial multivalente (Intervet® Novibac DHPPI+Leptodog), contendo vírus liofilizado de CDV, CPV, CAV-2, CPI (vírus da parainfluenza canina) e bacterina de *Leptospira icterohaemorrhagiae* na forma líquida (usada como diluente da vacina), foi administrada a cada animal, de acordo com o protocolo pré-estabelecido no estudo. O vírus de CPV contido na vacina é descrito como vírus CPV2 vivo modificado (estirpe 154, com no mínimo $7,0 \log_{10}$ DICT₅₀ de vírus por ml).

2.2.3 – Protocolos de Vacinação

Os 45 animais em estudo foram divididos em três grupos, tendo em conta a idade de apresentação à consulta e de forma aleatória (quando a idade à consulta era a mesma) de acordo com os três protocolos vacinais (Quadro 2).

Os animais foram seguidos durante um ano, tendo sido sujeitos, durante este período, a vacinação e recolha de amostras sanguíneas em diferentes tempos, consoante o protocolo a que tinham sido atribuídos.

Tanto no protocolo A como no protocolo B, o início da primovacinação ocorreu às 8 semanas, estando a diferença entre um e outro relacionada com o número de reforços vacinais. No protocolo A, os animais foram sujeitos a três doses de vacina (separadas entre si por um mês), terminando a primovacinação às 16 semanas. No protocolo B, foram administradas aos animais duas doses da vacina (separadas entre si por um mês) com final da primovacinação às 12 semanas. No protocolo C, o início da primovacinação ocorreu às 12 semanas de idade e foram administradas duas doses de vacina (separadas entre si por um mês).

Todos os animais foram sujeitos a vacinação contra a raiva aos 6 meses de idade (Nobivac Rabies®). O reforço anual com a mesma vacina multivalente foi realizado um ano após a última inoculação.

2.2.4 – Amostras Sanguíneas

Em cada visita, antes da recolha das amostras, era obtida a história clínica e realizado um exame físico detalhado ao animal. As amostras de sangue foram obtidas antes da inoculação da vacina multivalente, uma semana depois e um mês depois (correspondente ao dia de novo reforço vacinal). Foram também recolhidas amostras imediatamente antes da vacinação anti-rábica.

As amostras sanguíneas foram obtidas nos animais por venopunção da veia jugular, para tubos de 5 mililitros. Após formação de coágulo, os tubos foram centrifugados e o soro destes animais foi recolhido e congelado a -20°C até análise. O soro foi posteriormente titulado pelo teste de Inibição da Hemaglutinação para anticorpos contra CPV.

Protocolos de Vacinação	
Protocolo A Início : 8 semanas de idade	1ª Visita - Dia 0 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 2ª Visita - Dia 8 - Amostra de sangue 3ª Visita - Dia 30 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 4ª Visita - Dia 38 - Amostra de sangue 5ª Visita - Dia 60 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 6ª Visita - Dia 68 - Amostra de sangue 7ª Visita - Dia 120 - Amostra de sangue + Vacina da Raiva 8ª Visita - Dia 425 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 9ª Visita - Dia 433 - Amostra de sangue 10ª Visita - Dia 455 - Amostra de sangue
Protocolo B Início : 8 semanas de idade	1ª Visita - Dia 0 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 2ª Visita - Dia 8 - Amostra de sangue 3ª Visita - Dia 30 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 4ª Visita - Dia 38 - Amostra de sangue 5ª Visita - Dia 60 - Amostra de sangue 6ª Visita - Dia 120 - Amostra de sangue + Vacina da Raiva 7ª Visita - Dia 395 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 8ª Visita - Dia 403 - Amostra de sangue 9ª Visita - Dia 425 - Amostra de sanguínea
Protocolo C Início : 12 semanas de idade	1ª Visita - Dia 0 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 2ª Visita - Dia 8 - Amostra de sangue 3ª Visita - Dia 30 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 4ª Visita - Dia 38 - Amostra de sangue 5ª Visita - Dia 60 - Amostra de sangue 6ª Visita - Dia 90 - Amostra de sangue + Vacina da Raiva 7ª Visita - Dia 395 - Vacina multivalente + Amostra de sangue 8ª Visita - Dia 403 - Amostra de sangue 9ª Visita - Dia 425 - Amostra de sangue

Quadro 2: Descrição dos três protocolos usados neste estudo. Em cada protocolo estão descritas as datas de recolha das amostras, da administração de vacina multivalente e de administração da vacina da raiva.

2.2.5 – Titulação de Anticorpos

A titulação de anticorpos específicos foi realizada com recurso à técnica de IHA. Os antígenos utilizados no teste de IHA foram os seguintes:

- **CPV subtipo 2** – origem na vacina Primodog® (Merial), vacina viva modificada de CPV2, estirpe Cornell 780916.
- **CPV subtipo 2b** – origem numa amostra de campo nacional, tipificada por PCR em Tempo Real, por PCR convencional com enzima de restrição MbolI e por sequenciação genética.
- **CPV subtipo 2c** - origem numa amostra de campo nacional, tipificada por PCR em Tempo Real, por PCR convencional com enzima de restrição MbolI e por sequenciação genética.
- **Co-infecção CPV subtipos b/c** - origem numa amostra de campo nacional, tipificada por PCR em Tempo Real e por PCR convencional com enzima de restrição MbolI.

A técnica de IHA foi realizada em condições de temperatura de refrigeração (4°C), com a utilização de eritrócitos de suíno a 0,8%. Foram usadas duas diluições seriadas do soro, inoculadas em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em V, em solução fosfatada tamponada (pH 7,2), com a diluição inicial de 1:10. Os títulos determinados corresponderam à diluição sérica mais elevada capaz de inibir completamente a hemaglutinação.

Em cada protocolo foi utilizado como controlo positivo soro de um animal que, antes de iniciar o protocolo de vacinação, apresentou doença clínica por CPV, posteriormente confirmada PCR convencional e Real Time-PCR. Assim, os controlos positivos foram os soros recolhidos dos animais A11, B10 e C08 do protocolo A, B e C, respectivamente.

2.2.6- Análise Estatística

Antes de proceder à análise estatística dos resultados, foram excluídos os dados referentes aos controlos positivos (animais A11, B10 e C08) e também os dados referentes aos animais A08 e A12 do protocolo A, B04 e B08 do protocolo B e C03 do protocolo C. Estes animais apresentaram na fase inicial do estudo (1º mês) uma subida repentina dos títulos de anticorpos para valores 1:10240 a 1:20480, compatíveis com contacto com vírus de campo e apresentaram simultaneamente alterações gastrointestinais subtis referidas nas histórias

clínicas pelos proprietários. De notar que estas alterações não foram em nenhum dos casos motivos de consulta.

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado um modelo linear, onde a variável dependente consistiu nos valores dos títulos de anticorpos contra CPV em cada protocolo de vacinação, após a sua transformação logarítmica:

$$y = \text{média} + \text{visita} + \text{protocolo} + \text{vírus (protocolo)} + e$$

onde,

y = transformação logarítmica do título de anticorpos;

visita = altura da visita (covariável);

protocolo = A, B e C, correspondendo aos 3 protocolos de vacinação utilizados no estudo;

vírus (protocolo) = efeito dos 4 vírus (CPV2, CPV2b, CPV2c e Coinfecção CPV2b/CPV2c) dentro de cada protocolo;

e = erro do modelo, assumindo uma distribuição $N(0, \sigma^2)$.

Para os estudos de associação da resposta imunitária à vacinação entre protocolos, onde se avaliaram a seroconversão e título de anticorpos protectores em cada reforço de vacinação, foi utilizado o teste exacto de Fisher.

Todas as análises foram efectuadas utilizando software informático de análise estatística SAS (SAS, 1989). As estatísticas avaliadas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

2.3 – Resultados

Os resultados dos testes de IHA, de acordo com os diferentes subtipos de vírus e por protocolo, estão representados no Anexo 1.

Como forma de aferir a resposta à vacina multivalente e determinar o grau de protecção conferido pela vacina, determinou-se que no período da primovacinação (até aos 6 meses de idade), ocorria seroconversão, quando os títulos de anticorpos se elevavam dois níveis (factor 4) acima do título da amostra de soro recolhida anteriormente, independentemente do nível absoluto. No período a partir dos 6 meses de idade, considerou-se um título de anticorpos protector superior a 1:80. As médias geométricas dos valores de inibição de

hemaglutinação em cada dia de amostragem e por tipo de vírus usado no teste de IHA foram calculadas (Tabela 1).

Médias dos Títulos de Anticorpos/Protocolo			
Vírus do Teste	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C
CPV2	1:2893	1:1881	1:2208
CPV2b	1:812	1:539	1:788
CPV2c	1:992	1:1211	1:1097
CPV2b/2c	1:311	1:275	1:281

Tabela 1: Comparação entre as médias ajustadas para o modelo ($Y = \text{média} + \text{visita} + \text{protocolo} + \text{vírus (protocolo)} + e$), em cada protocolo.

As médias geométricas dos títulos foram sempre mais altas, quando se utilizou o vírus CPV2 como antígeno de teste ($P < 0,001$), relativamente aos outros subtipos do vírus, independentemente do protocolo usado, e inferiores sempre que se usou o isolado de co-infecção (CPV2b/2c) como antígeno nos testes de IHA ($P < 0,001$) (Gráficos 1 a 3).

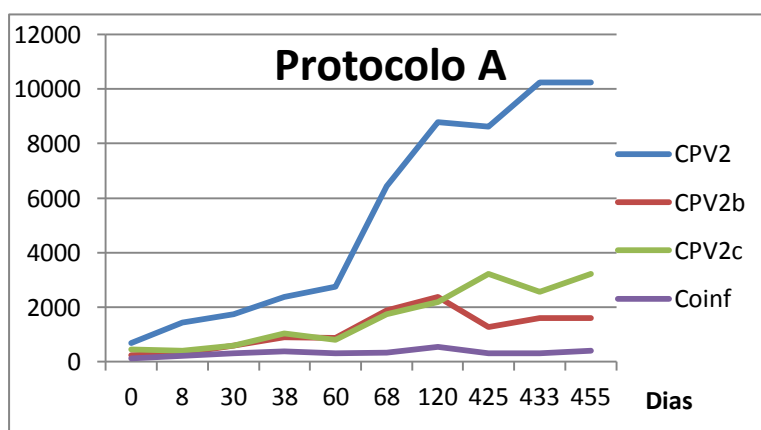


Gráfico 1: Evolução ao longo do tempo das médias geométricas dos títulos de anticorpos dos animais do protocolo A, de acordo com o antígeno usado nos testes de IHA.

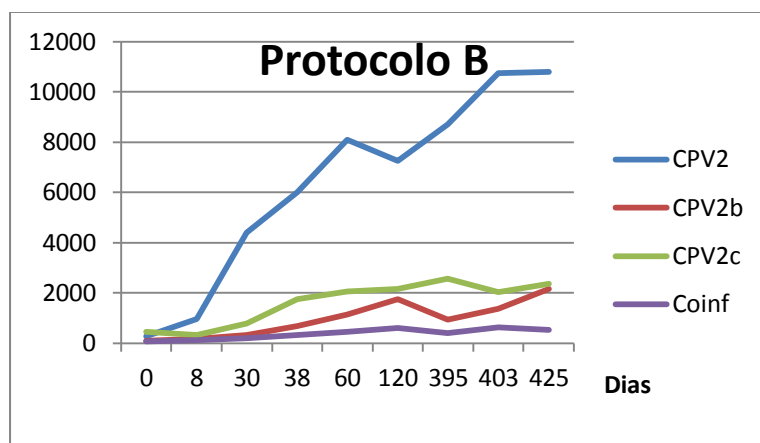


Gráfico 2: Evolução ao longo do tempo das médias geométricas dos títulos de anticorpos dos animais do protocolo B, de acordo com o antígeno usado nos testes de IHA.

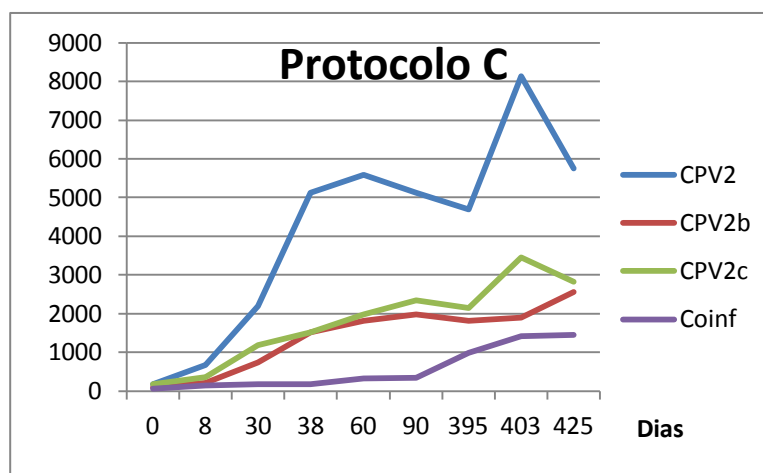


Gráfico 3: Evolução ao longo do tempo das médias geométricas dos títulos de anticorpos dos animais do protocolo A, de acordo com o antígeno usado nos testes de IHA.

Quando comparadas as médias geométricas dos títulos de anticorpos, existe uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre o protocolo A e B, com o primeiro com média de títulos superiores ao segundo. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de titulação de anticorpos ao longo do tempo entre os protocolos A e C e os protocolos B e C.

As médias geométricas dos títulos de IHA, no dia 1, estão apresentadas na Tabela 2.

Médias geométricas da titulação de anticorpos – Dia 1				
	CPV2	CPV2b	CPV2c	Co-infecção
A	1:682	1:234	1:467	1:132
B	1:226	1:92	1:452	1:76
C	1:170	1:96	1:181	1:62

Tabela 2: Médias geométricas obtidas nos três protocolos, referentes ao dia 1 de amostragem (anticorpos maternos) de acordo com o vírus usado no teste de IHA

O título de anticorpos no dia 1 corresponde, em todos os protocolos, ao nível de anticorpos maternos destes animais. Neste estudo, todos os animais tinham títulos de anticorpos contra CPV presentes no primeiro dia de apresentação clínica, o qual varia, no entanto, de acordo com o vírus usado no teste de IHA.

Um título de anticorpos maternos $\geq 1:20$ pode interferir com a vacinação. De uma forma geral, todos os animais nos três protocolos apresentaram títulos de anticorpos $\geq 1:20$, independentemente do tipo de vírus usado no teste de IHA. As únicas exceções foram os animais B12 e C14, do protocolo B e C, respectivamente, que quando testados com vírus CPV2b/2c apresentaram títulos 1:10. Os animais que iniciaram o protocolo vacinal mais tarde (às 12 semanas de idade) apresentaram uma média de título de anticorpos mais baixa, independentemente do vírus utilizado, em relação aos animais com início de vacinação às 8 semanas (Tabela 2). Após a primovacinação, os dados referentes à seroconversão estão representados na Tabela 3.

Seroconversão na Primovacinação - Protocolo												
Vírus	CPV2			CPV2b			CPV2c			Co-infecção		
Reforço	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
Protocolo												
A	55% 6/11	40% 2/5	100% 3/3	45% 5/11	33% 2/6	75% 3/4	45% 5/11	33% 2/6	100% 4/4	55% 6/11	17% 1/6	50% 2/4
B	54% 7/13	67% 4/6		64% 9/14	80% 4/5		21% 3/14	45% 5/11		43% 6/14	57% 4/7	
C	89% 8/9	100% 1/1		67% 6/9	100% 2/2		78% 7/9	100% 2/2		44% 4/9	100% 4/4	

Tabela 3: Percentagem de seroconversão (animais que seroconverteram/total de animais) em cada protocolo, em relação ao tipo de vírus usado no teste de IHA, nos reforços de vacinação consecutivos referentes à primovacinação.

A percentagem de seroconversão por protocolo variou consoante o subtipo de vírus usado como antigénio no teste de IHA. Relativamente à seroconversão, na primeira dose de vacina, não foi identificada qualquer diferença significativa nos animais que iniciam a primovacinação às 8 semanas, dos animais que iniciam a primovacinação às 12 semanas.

As percentagens cumulativas dos cachorros que seroconverteram, e de acordo com o tipo de vírus, estão representadas nos Gráficos 4 a 7.

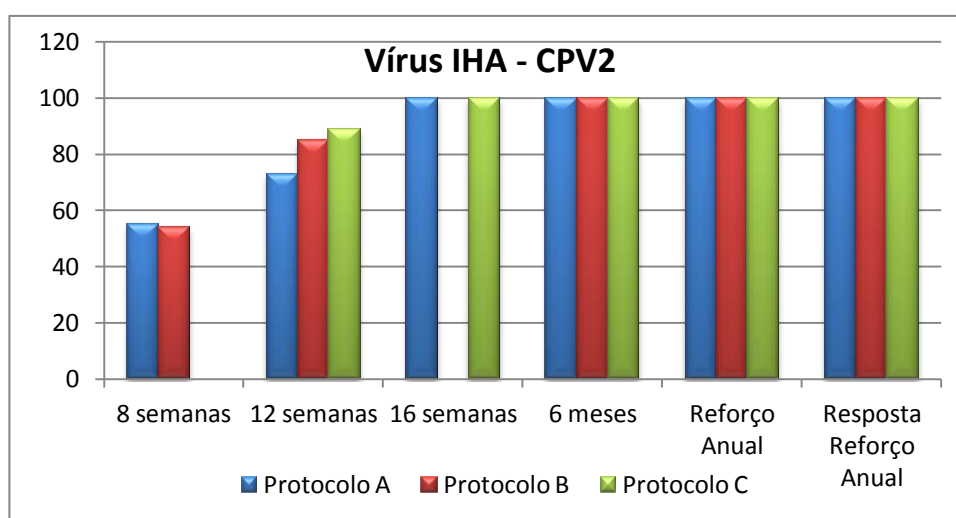


Gráfico 4: Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano (referência à idade dos animais), de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus CPV2.

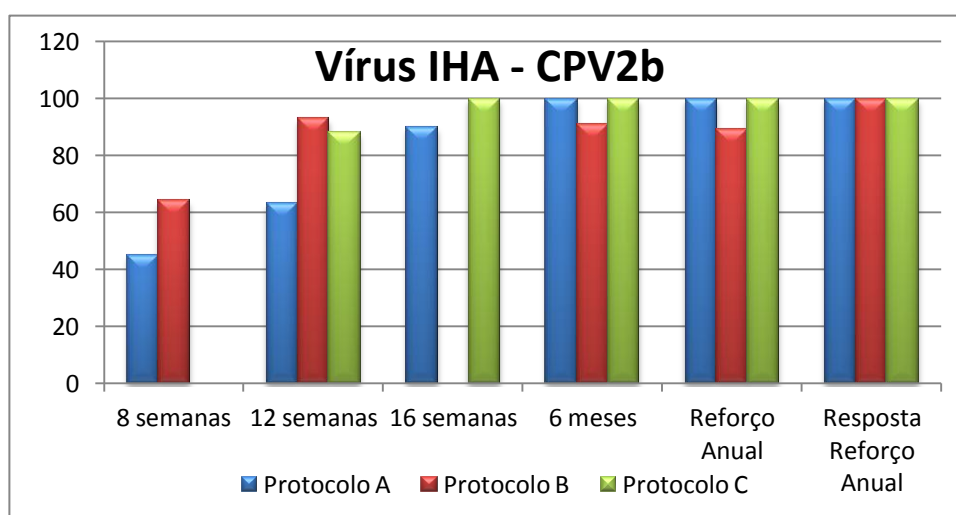


Gráfico 5: Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano (referência à idade dos animais), de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus CPV2b.

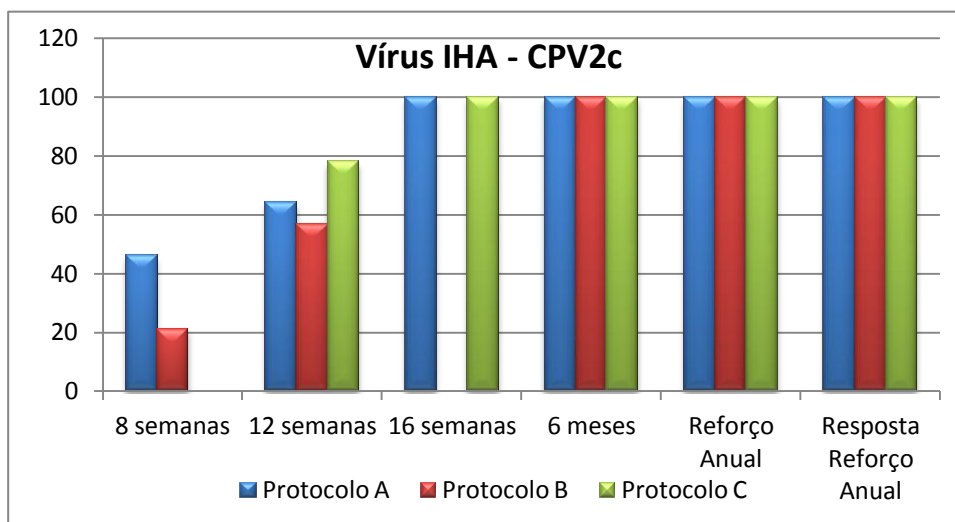


Gráfico 6: Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano (referência à idade dos animais), de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus CPV2c.

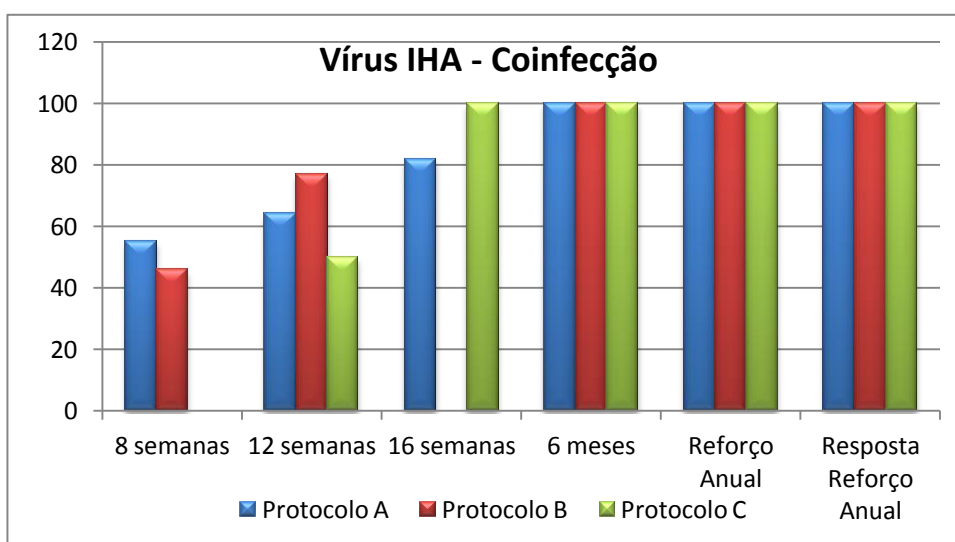


Gráfico 7: Percentagem cumulativa da seroconversão ao longo de um ano (referência à idade dos animais), de acordo com o protocolo, quando se usou como antigénio no teste de IHA o vírus co-infecção CPV2b/2c.

É possível observar que a seroconversão aumentou com a idade dos animais e com o número de reforços de vacinação. A idade na última dose vacinal apresenta-se como um factor determinante, pois os animais que receberam o último reforço às 16 semanas tiveram taxas de seroconversão próximas dos 100% (animais do protocolo A e C). Os animais do protocolo B, que receberam o último reforço vacinal às 12 semanas, tiveram taxas de seroconversão cumulativas menores (85%, 93%, 57% e 77%, quando utilizados os vírus CPV2, CPV2b, CPV2c ou co-infecção CPV2b/2c, respectivamente).

A diferença de seroconversão entre vírus no mesmo protocolo, durante a primovacinação, não foi significativa, assim como a diferença de seroconversão entre protocolos e em respostas aos diferentes reforços vacinais.

Todos os animais que seroconverteram passaram a apresentar um título de anticorpos considerado protector. Alguns animais, que não seroconverteram, já eram portadores de títulos protectores. Na tabela 4, estão representados os animais que não seroconverteram e a sua relação com o nível de protecção.

Nem todos os animais seroconverteram, no final da primovacinação, mas mesmo os animais que não seroconverteram apresentaram títulos de anticorpos considerados protectores, em todos os protocolos, não havendo diferenças significativas entre os protocolos.

Não Seroconversão/Protecção													
Vírus		CPV2			CPV2b			CPV2c			Co-infecção		
Reforço		1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
Protocolo													
Protecção													
A	Sim	100% 5/5	100% 3/3	0% 0/0	33% 2/6	75% 3/4	100% 1/1	50% 3/6	75% 3/4	0% 0/0	20% 1/5	80% 4/5	100% 2/2
	Não	0% 0/5	0% 0/3	0% 0/0	67% 4/6	25% 1/4	0% 0/1	50% 3/6	25% 0/4	0% 0/0	80% 4/5	20% 1/5	0% 0/2
B	Sim	67% 4/6	100% 2/2		80% 4/5	100% 1/1		91% 10/11	100% 6/6		63% 5/8	100% 3/3	
	Não	33% 2/6	0% 0/2		20% 1/5	0% 0/1		9% 1/11	0% 0/6		37% 3/8	0% 0/3	
C	Sim	100% 1/1	0% 0/0		100% 3/3	0% 0/0		100% 2/2	0% 0/0		60% 3/5	0% 0/0	
	Não	0% 0/1	0% 0/0		0% 0/3	0% 0/0		0% 0/2	0% 0/0		40% 2/5	0% 0/0	

Tabela 4: Percentagem de protecção (animais com títulos >1:80/total de animais que não seroconverteram) e não protecção (animais com títulos <1:80/total de animais que não seroconverteram), em cada protocolo, por vírus usado no teste de IHA, nos reforços vacinais consecutivos referentes à primovacinação.

É de realçar que, quando utilizado como vírus de teste o vírus CPV2b/2c, há uma tendência, independentemente do protocolo usado, para que os animais que não seroconverteram possuam títulos considerados não protectores.

Tal como referido anteriormente, o grau de protecção a partir da primovacinação foi definido como um título de IHA > 80. A percentagem de animais que se encontra protegido aos 6 meses de idade (altura da primeira vacina da raiva), ao fim de um ano após a primovacinação e após o reforço anual está representado na Tabela 5.

Nível de Protecção - Anticorpos												
Vírus	CPV2			CPV2b			CPV2c			Co-infecção		
	VR	VA	RVA	VR	VA	RVA	VR	VA	RVA	VR	VA	RVA
A	100% 9/9	100% 3/3	100% 3/3	100% 9/9	100% 3/3	100% 3/3	100% 9/9	100% 3/3	100% 3/3	100% 9/9	100% 3/3	100% 3/3
B	100% 12/12	100% 10/10	100% 9/9	91% 10/11	89% 8/9	100% 8/8	100% 12/12	100% 10/10	100% 9/9	100% 12/12	100% 10/10	100% 8/8
C	100% 8/8	100% 8/8	100% 6/6	100% 8/8	100% 8/8	100% 7/7	100% 8/8	100% 8/8	100% 7/7	100% 8/8	100% 8/8	100% 7/7

Tabela 5: Percentagem de protecção (animais que têm título > 1:80/total de animais) em cada protocolo, por vírus usado no teste de IHA, na altura da vacina da raiva (VR) – 6 meses de idade, ao fim de um ano da primovacinação (VA) e um mês após o reforço anual (RVA). Legenda: VR- vacina raiva; VA- vacina multivalente anual e RVA- Resposta à vacina multivalente anual.

De notar que tanto no protocolo A como no C, a partir dos 6 meses de idade, todos os animais apresentaram títulos considerados protectores, independentemente da estirpe de vírus utilizado no teste como antigénio, significando que todos os animais incluídos no protocolo A e C tinham anticorpos a um nível considerado protector na altura do reforço anual. No protocolo B, ocorreu a mesma situação referida para o protocolo A e C, com a excepção de que, quando foi utilizado a estirpe CPV2b como antigénio nos testes de IHA, e antes da vacina anual, houve um animal que não possuía anticorpos a um nível considerado protector.

Após o reforço anual, todos os animais enquadrados nos diferentes protocolos e independentemente do subtipo de vírus usado nos testes de IHA, foram considerados protegidos. Também se verificou que, a partir dos 6 meses de idade, cerca de 100% dos cães possuía título de anticorpos protector, independentemente do protocolo e do tipo de vírus usado no teste de IHA, não se detectando qualquer diferença significativa entre protocolos.

2.4- Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que todos os cachorros incluídos nos diferentes protocolos de imunização seroconverteram em resposta à vacina multivalente. No entanto, em cada período de observação, o grau de seroconversão foi diferente, não só em relação ao protocolo usado, mas também em relação ao tipo de vírus usado no teste de IHA. Foi possível observar também que a resposta à vacinação, quando usado o vírus homólogo, foi sempre superior à obtida quando usados os vírus de campo (vírus heterólogos). Estas diferenças foram significativas ($P < 0,001$). Esta observação já tinha sido efectuada por Pratelli et al. (2001), quando utilizou o teste de seroneutralização. Estes resultados levam à sugestão de que poderá existir uma vantagem no uso e aplicação de novas vacinas com estirpes de campo.

Neste estudo, verificou-se que o título de anticorpos foi sempre significativamente inferior, quando se utilizou a estirpe de co-infecção (CPV2b/2c) como antigénio no teste. A importância deste resultado é desconhecida, assim como as suas implicações clínicas, mas, num país em que os casos de parvovirose canina provocada por coinfeções assumem uma elevada incidência (Vieira et al., 2011), deverá merecer uma especial atenção e avaliação. Esta observação sugere também a possível vantagem do uso de mais de uma estirpe de campo nas formulações das vacinas contra CPV.

Foi demonstrado que os títulos considerados protectores podem variar consoante a estirpe de vírus (antigénio) usada no teste de IHA. Um título protector, quando usado o CPV2, pode corresponder a um título não protector, quando usado um vírus de campo. Assim, quando se usa o vírus vacinal no teste de IHA, pode estar a sobrestimar-se o nível de protecção desse animal. É necessário estabelecer se essas variações se reflectem em diferenças de protecção contra a infecção de campo. Em termos clínicos, estas diferenças podem não ser significativas, visto que a infecção por parvovírus canino secundária à falha vacinal não parece ser muito frequente, e os cães possuem anticorpos contra os vírus heterólogos (Pratelli et al., 2001). Mas o real impacto desta questão ainda está por determinar.

Determinou-se também que a seroconversão, para um determinado tipo de antigénio utilizado nos testes de IHA, não significa a ocorrência de seroconversão para todos os tipos de vírus. Este facto leva-nos a sugerir que a técnica de IHA

deve ser padronizada para os vários tipos de vírus em circulação, pois os títulos de anticorpos obtidos são diferentes consoante o tipo de antigénio utilizado no teste.

Os cães recém-nascidos estão normalmente protegidos da infecção por CPV devido à transferência de anticorpos maternos através do colostro. Neste estudo, todos os animais apresentavam anticorpos maternos contra CPV. À medida que a imunidade passiva diminui, os cachorros podem tornar-se susceptíveis à infecção por CPV se portadores de títulos $\leq 1:80$. Os animais do protocolo C, com 12 semanas de idade, possuíam imunidade passiva com um nível de anticorpos maternos inferiores aos animais dos protocolos A e B (8 semanas de idade). Este facto já era esperado e deve-se à diminuição dos anticorpos maternos ao longo do tempo (Pollock e Carmichael, 1982).

Uma das principais causas de falha da vacinação é a interferência desta com os anticorpos maternos (Pollock e Carmichael, 1982; O'Brien et al, 1986). Os animais em estudo apresentaram diferentes títulos de anticorpos maternos, mas às 16 semanas de idade, a taxa de seroconversão foi elevada (perto dos 100%), o que indica que a vacina conseguiu, nesta altura, ultrapassar o efeito negativo da presença de anticorpos maternos. Um título de anticorpos maternos $\geq 1:20$ pode interferir com a vacinação, mas não evita a infecção com vírus virulento (Waner et al., 1996; Buonavoglia et al., 1992; Martella et al., 2005). Foi observado que a maioria dos animais possuía anticorpos maternos com títulos capazes de interferir com a imunização activa. Considera-se nestes casos que a falha na seroconversão ocorre devido à interferência destes anticorpos, mas não foram identificadas diferenças nas taxas de seroconversão, independentemente da idade de início da primovacinação (8 ou às 12 semanas). Alguns animais, que não seroconverteram, tinham títulos de anticorpos protectores, o que sugere que, mesmo não havendo resposta à vacinação, estes animais se encontravam protegidos. Possuíam anticorpos maternos elevados, que possivelmente interferiram com a eficácia da vacinação.

Não se registaram diferenças significativas entre os protocolos utilizados relativamente à eficácia de seroconversão, no entanto, as taxas de seroconversão são superiores quando o último reforço vacinal ocorre às 16 semanas, quando comparadas com o último reforço às 12 semanas. Este resultado vai de encontro às actuais orientações de vacinação canina, que sugerem que a última dose de

uma vacina nuclear na primovacinação deve ser realizada pelo menos às 14 semanas de idade ou mais tarde, seguidas de uma revacinação após um ano e posteriormente os reforços não mais frequente que em cada 3 anos. Estes protocolos são adequados para oferecer um nível de protecção igual à alcançada pela revacinação anual (Schultz, 2006).

Aos 6 meses de idade e independentemente do protocolo utilizado e do vírus do teste de IHA, todos os animais possuíam níveis de anticorpos protectores, sendo assim considerados como protegidos contra infecção por CPV. Salienta-se que apesar dos animais do protocolo B apresentarem uma taxa de protecção, após o último reforço vacinal da primovacinação de 85%, 93%, 57% e 77%, quando usados os vírus CPV2, CPV2b, CPV2c ou de co-infecção CPV2b/2c, respectivamente; quando testados aos 6 meses de idade, apresentavam taxas de protecção superiores, nomeadamente (100%, 91%, 100%, 100%). Este resultado pode significar que a resposta imunitária à vacinação pode durar mais do que os 30 dias, ou que os animais tiveram contacto com vírus de campo, ou que a presença contínua de anticorpos em animais, na ausência de qualquer reforço vacinal, pode ocorrer como uma consequência directa da produção contínua de anticorpos pelas “células B de memória efectoras”. Apesar de controverso, nos estudos de duração da imunidade tanto em cães como em gatos, as “células B de memória efectoras” continuam a produção de anticorpos por muitos anos. A capacidade de detecção de anticorpos, apesar do título num animal previamente vacinado demonstra que as “células B de memória efectoras” estão presentes e funcionais e sugere também que as células B de memória (não efectoras) estão, muito provavelmente, presentes (Schultz, 2006).

Antes do reforço anual da vacina multivalente, o grau de protecção contra CPV era próxima dos 100%, não havendo diferenças significativas entre protocolos, o que sugere que a imunidade conferida pela primovacinação tem a duração de pelo menos um ano, o que suscita a questão da necessidade de realizar o reforço anual. Após o reforço anual, todos os animais se encontravam protegidos contra CPV, independentemente do protocolo de primovacinação e do tipo de vírus usado no teste de IHA. É importante, contudo, referir que estes dados devem ser considerados específicos da vacina, pois estas variam de acordo com as estirpes imunizantes, potência, adjuvante, grau de atenuação e tipo de vacina. Dadas as condições em que foi realizado este estudo, condições de campo, foi impossível assegurar o isolamento destes animais e evitar possíveis contactos com as

variantes de campo. De qualquer forma, estas mesmas condições permitem reproduzir uma situação de estudo mais próxima da realidade clínica.

3 - VALORES HEMATOLÓGICOS EM CÃES JOVENS E SUA ALTERAÇÃO EM RESPOSTA À VACINAÇÃO POLIVALENTE

3 – VALORES HEMATOLÓGICOS EM CÃES JOVENS E SUA ALTERAÇÃO EM RESPOSTA À VACINAÇÃO POLIVALENTE

3.1- Introdução

A informação actual sobre os parâmetros hematológicos em cães jovens, usando os sistemas modernos de contagem automática de células sanguíneas, é escassa. Com base numa população de 45 animais saudáveis, foi objectivo deste estudo determinar os valores hematológicos de referência para esta população, desde as 8 semanas até às 68 semanas de idade, utilizando um contador automático de células sanguíneas (método da impedância).

As vacinas polivalentes são universalmente usadas nos planos profilácticos nucleares de cães em todo o mundo. Apesar desse facto, o efeito das vacinas polivalentes nos valores hematológicos dos cães jovens está pouco clarificado. Usando como valores de referência os obtidos no estudo anterior, objectivou-se determinar o efeito das vacinas polivalentes nos valores hematológicos de cães sujeitos à primovacinação com vacina polivalente.

3.2- Resultados

3.2.1 – Artigo 5 – Vieira MJ, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G. “Canine hematologic values: reference values in young dogs and the effects of immunization with multivalent vaccines”. **The Veterinary Journal** (Submetido).

3.2.1 – Artigo 5 – The Veterinary Journal

(2011), Submetido para publicação.

Vieira MJ, Oliveira J, Vieira AL, Carvalheira J, Thompson G.

“Canine hematologic values: reference values in young dogs and the effects of immunization with multivalent vaccines”

Abstract

There is scarce information regarding reference values of hematologic parameters in young dogs using automated cell counting systems. It has also been reported that vaccine can induce immunosuppression but little is known about the actual influence of vaccination on haematological parameters. In this study, reference hematologic values are presented from 45 clinically healthy dogs, from 8 to 68 weeks of age. The effect of a multivalent canine vaccine on these parameters was also evaluated. The findings demonstrate that the multivalent vaccine used in this study significantly decreases white blood cell count, platelet count and absolute lymphocyte count. These findings were present only after the first vaccine inoculation and were short-lived, but could be sufficient to potentiate or allow the onset of infections that would otherwise remain unapparent.

Keywords: Dogs, Hematologic values, multivalent vaccines, reference range.

Introduction

Reference ranges are essential to the interpretation of hematological test results, with values typically considered normal when they fall within reference ranges (Lumsden et al., 1979). Reference values should be used to assist interpretation of results from an animal or animals of comparable origin (similar subpopulations) and when the same laboratory techniques are used (Lumsden et al., 1979). Although ideal, it is often not practical or even possible for each veterinary laboratory to develop reference values with adequate sample size for each subpopulation (Lumsden et al., 1979).

Many of the hematological reference values available were determined using manual methods, which are time-consuming and operator dependent (Knoll, 2000). A number of automated and semi-automated hematology instruments are now available for analysis of veterinary samples, which, when used properly, offer more efficient and precise testing than that achievable through manual methods (Knoll, 1996). An increasing number of veterinary practitioners perform in-office hematology testing; however there is scarce information about the reference values of hematologic parameters in dogs using these types of automated cell counting systems.

Some studies have focused on the effects of age and sex in hematologic values, but much of what is known about age and sex effects has been derived from studies performed in beagles or in selected breeds (Lumsden et al., 1979; Harper et al., 2003). It is important to realize that interbreed differences could be important in the interpretation of many diagnostic test results, but some studies state that there are no substantial differences between breeds for calculated hematologic reference ranges (Harper et al., 2003). Breed did not appear to be as important as age and does not warrant particular concern in the interpretation of clinical data (Lund et al., 2000; Harper et al., 2003).

The unique anatomic and physiologic features of newborn and pediatric patients unadvise the routine use of adult reference values. Moreover, much laboratory data differs dramatically in newborn and pups compared with adult reference values (McMichael, 2005). Changes are most evident during the first year of life, reflecting growth and maturation of the puppies. In some instances, values for puppies diverge markedly from reference values for adults, imposing the use of age-specific reference ranges for interpretation of clinical data (Harper et al., 2003). Young dogs (younger than one year)

usually show lower numbers of erythrocytes and lower values for hemoglobin concentration, packed cell volume and erythrocyte indices. They also show higher absolute numbers of lymphocytes, resulting in a decrease of the neutrophil to lymphocyte ratio (Knoll, 2000; Comazzi et al., 2004). It is also during the first year of life that most dogs start their vaccine series.

It is common in human and in veterinary medicine to vaccinate for several pathogens using multivalent vaccines, containing multiple viral and bacterial components. However, most studies of viral induced immunosuppression have investigated the effects of only monovalent vaccines (Krakowka et al., 1982; Brenner et al., 1989), whereas inconsistent information is available on the immunosuppressive role of multivalent vaccines (Dhein and Gorham, 1986). Thus, little is known about vaccine viruses interactions, their potential immunosuppressive effects and influence of vaccination on hematologic values (Philips et al., 1989).

Dogs are routinely vaccinated with attenuated multivalent vaccines. These vaccines are commercially available in a variety of combinations consisting of Distemper virus (CDV), Canine Adenovirus type-1 (CAV-1), Canine Adenovirus type-2 (CAV-2), Canine Parainfluenza virus (CPI) and Canine Parvovirus (CPV) (Philips et al., 1989). Vaccine induced immunosuppression has been reported in humans with many different vaccines and it was also reported in dogs with some multivalent vaccines (Philips et al., 1989). In fact, the immune response and hematologic changes after the administration of multivalent vaccines were studied with conflicting results. In a study conducted by Phillips et al. (1989), some multivalent vaccines caused significant suppression of lymphocyte response to mitogens and suppression of absolute lymphocyte count, but did not significantly affect

the total white blood cell count, absolute polymorphonuclear neutrophil (PMN) count or absolute monocyte count. The practical significance of the decreased lymphocyte responsiveness is currently unknown (Philips et al., 1989).

Multivalent canine vaccines have been demonstrated to be efficacious (Acree et al., 1982; Philips et al., 1989). Although there is a limited number of studies on immunity in dogs receiving canine parvovirus (CPV) in mono or multivalent vaccinations and the induction of immunosuppression by CPV has been demonstrated in many investigations (Philips et al., 1989; Miyamoto et al., 1995; Strasser et al., 2003). It is believed that the reason why clinical disease is not widely associated with the use of these multivalent vaccines is that the duration of the lymphocyte suppression is relatively short (approximately one week) (Philips et al., 1989). On the other hand, a study performed by Strasser, et al. (2003) showed an increase in the total number of white blood cells and lymphocyte count after multivalent vaccine administration. Another study performed by Ciarlini, et al. (2004) suggests that multivalent vaccines do not interfere with neutrophil oxidative metabolism, nor with the leukogram. Strasser, et al. (2003) found that the reduced T-cell mitogenic responses to phytohemagglutinin (PHA) were accompanied by simultaneous increases in humoral immunity, suggesting a transient shift in the balance between cell-mediated and humoral immunity rather than immunosuppression after vaccination with modified live vaccines in the dog. He also found that the serum activity of the complement system almost doubled, compared to values before immunization, indicating a strong up-regulation and increased production of complement components (Strasser et al., 2003). The reasons underlying the so-called “immunosuppressive” changes after multivalent vaccination are still not very well understood (McDonald, 1992; Strasser et al, 2003). A myriad of factors can influence the efficiency of the immune system. Immunosuppressed animals that develop

disease following vaccination have also been reported (Strasser et al., 2003). It is possible that vaccine-induced immunosuppression may potentiate the severity of a concurrent disease or allow unapparent infection to become clinically apparent (Schultz, 1976; Potgieter et al., 1981; Phillips et al., 1989). Vaccination in itself represents a stress on the immune system of the dog and must be applied only in healthy animals and strictly according to the rules and regulations provided by the manufacturer (Strasser et al., 2003).

Present knowledge on normal hematologic values in puppies, obtained via automatic counting are scarce, and little is known about the influence of vaccination on these values. As multivalent vaccines are widely applied on vaccination protocols in dogs and little is known about their influence on hematologic values, we aimed at characterizing reference hematologic values and their response to vaccination during the first 68 weeks of life.

Material and methods

Samples

The animals used in this study were 45 clinically healthy dogs, that presented to Clínica Veterinária Hospital (Figueira da Foz-Portugal). Of them, 20 were female (44.44%) and 25 were male (55.56%); 23 were purebred (51.11%).

Blood samples were collected from all the dogs by jugular venipuncture following proper restraint with minimal excitement. All blood samples were collected in two milliliter (mL) containers with EDTA.

Samples were collected at 8, 12, 16, 24, 60, 64 and 68 weeks of age with the purpose of constituting the hematological profile.

To establish the hematological response to multivalent vaccines, blood samples were also collected one week after each vaccination (9, 13, 17 and 61 weeks).

Multivalent vaccine

A commercially available multivalent vaccine (Intervet[®] Nobivac DHPPI + Lepto) against CDV, CPV, CAV-2, CPI and leptospirosis was administered at 8, 12, 16 and 60 weeks of age.

Hematological analyzer

Samples were analyzed within one h from collection with the hematological analyzer MS-4 (Melet Schloesing Laboratories, France). This hematologic analyzer performs cell counting through an electric impedance method. In order to start a new test, the analyzer performs a self-control routine and a reagent validity check.

Hematologic Parameters

The following parameters were measured in all samples: red blood cell count (RBC), packed cell volume (PCV), hemoglobin concentration (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentrations (MCHC), white blood cell (WBC), differential leukocyte count (lymphocyte, monocyte and granulocyte absolute and relative count), and platelet count (Plt).

Statistical analysis

All the results obtained were statistically processed using proper statistical software (Statistical Analysis SAS[®] - SAS Institute) with the purpose of constituting the hematological profile of pups. Independent variables were age (weeks), sex and body weight, the latter two as covariates. Linearity of the covariates was checked for all

parameters, using simple regression approaches. Only those variables that were significant ($P<0.05$) were kept in the models. For the first exploratory analysis of variance, the linear model included the independent variables as main effect and respective interactions. Whenever sex was not significant, the model resulted in a regression analysis and, when appropriate, the coefficients were used for predictions. Mean hematologic results for each age group and correlation with age and sex were determined for each parameter. This data was used as reference to assess the effect of multivalent vaccines in hematological parameters. The same method was used to statistically process the hematological profile in dogs one week after vaccination with multivalent vaccine. The data before and after vaccination was compared and statistically analyzed. Differences were tested for significance at probability levels of $P<0.05$.

Results

Hematologic reference values

Descriptive statistics, indicating the age (weeks), minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each variable are represented in Table 1 (females) and Table 2 (males). Using regression analysis, linearity was analyzed for each parameter with the independent variables (age and sex). The following parameters were significantly ($P<0.05$) influenced by sex : lymphocyte relative count, RBC, PCV, MCV, MCH, MCHC and Hb. For this reason, Table 3 presents different regression equations for females and males.

Body weight was also tested as a covariant but there was no statistically significant correlation ($P>0.05$) between body weight and hematologic parameters.

Dispersion graphics are presented for some of the parameters, on which a statistically significant correlation was found, based on a regression equation (presented with each

graphic), plotting each parameter with the dependent variable, and giving a lower and upper boundary (Fig. 1-3).

Hematological values after immunization with multivalent vaccine

The hematologic values obtained one week after each immunization, the minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in females and males one week after the first immunization, are presented in Table 4.

In the dogs under investigation the decrease of WBC absolute count (Fig. 3), lymphocyte absolute count and platelet count was significant ($P=0.0394$, $P=0.0140$ and $P=0.0208$, respectively). This effect was noticed only after the first vaccine inoculation and was more obvious in male than in female dogs. We were not able to detect any significant differences when comparing all other hematologic parameters before and after vaccination.

Discussion

The hematological values obtained from this study confirm that there were significant differences in hematologic values for different ages and gender. Moreover, we found that weight does not significantly influence hematologic values.

Regarding age effects on hematologic values, we found that WBC count decreases until the 24th week. At 60, 64 and 68 weeks the WBC count is relatively constant (Fig. 1). This result was found both in males and females. Granulocyte count was found to increase during the first year of life (Fig. 1). Lymphocyte and monocyte count were found to decrease during the first year of age, both in males and females (Fig. 1). Females showed lower absolute and relative lymphocyte and monocyte counts. With RBC, PCV, MCV, MCH, MCHC and Hb there was a positive trend with age, reaching a plateau after one year

of age (Fig. 2). The results we obtained do not differ significantly from other results determined for specific breeds, with the exception of MCV (Earl et al., 1973; Fukuda et al., 1989; Harper et al., 2003). In our study, the MCV value increased with age, following a different trend from the one found in previous publications (Harper et al., 2003). The general agreement of our results with those determined via manual count methods allows us to assert that automatic blood cell counting is an expeditious and sensible tool for evaluation of hematologic parameters (Earl et al., 1973; Fukuda et al., 1989; Harper et al., 2003). Moreover, these are more practical tests to perform on the daily veterinary practice, when compared with the more time-consuming manual methods.

As described by Philips et al. (1989), the hematologic values in response to vaccination showed a significant decrease in WBC counts, platelet counts and absolute lymphocyte counts one week after the first vaccine inoculation (Fig. 3). The decrease was more pronounced in males than in females, and was only observed after the first vaccine inoculation. All other hematologic parameters remained unaltered after vaccination. One month after the first vaccine inoculation, WBC, platelet and absolute lymphocyte counts were normal, which supports the theory that post vaccine hematologic changes are transient and relatively short-lived (Phillips et al., 1989). Even these relatively short spanned changes could be sufficient to potentiate or allow the onset of infections that would otherwise remain unapparent. It is well known that a functional suppression of lymphocytes may be related with interaction between certain strains of CDV with CAV-1 or CAV-2 and that CPV vaccination can induce immunosuppression (Phillips et al., 1989). The role of this immunosuppression and its relation to vaccine failure has not been established. Regarding CPV vaccination it has not been established how it contributes to neither cellular immunosuppression nor the role of maternal antibodies on vaccine failure.

What is well established is that most of vaccine failures occur within the first week after immunization, which is coincidental with cellular immunosuppression associated with vaccination (Phillips et al., 1989). After the second and subsequent vaccine boosters (including the first year booster), we could not find any significant changes in hematologic parameters. The reason for this last result has not been established. It could be related to the age of the animal, but more probably to the previous immunizations. The presence of protecting antibodies could prevent a cellular response similar to the one found after the first immunization.

Conclusion

The complete blood count is one of the most frequently used laboratory tests in veterinary medicine. Since the reference intervals for specific tests become outdated with changes in laboratory methods and with the increasing use of automated instrumentation, there is a need to constantly update normal reference values. In this study, we present the hematologic values of 45 healthy dogs, from 8 to 68 weeks of age. This data can be used as reference hematologic values in puppies analyzed via automatic counting methods.

We also characterized the hematologic response of puppies to multivalent vaccines. The hematologic values after vaccination showed a significant decrease in WBC, platelet and absolute lymphocyte count, but these findings occurred only after the first booster of the vaccine. The relationship between this decrease in cellular count and clinical immunosuppression remains to be clarified. If this association is proven, it will be important to understand the immunosuppressive mechanisms that occur subsequent to vaccination because they could be the same as those occurring after natural infections. This could help finding more adequate and effective therapeutic strategies in the future.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has any financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Foundation for Science and Technology Portugal (FCT) grant SRFH/BD/23101/2005 to M. J. Vieira and by Intervet Schering Portugal.

References

- Acree, W.M., Edwards, B.G., Fulker, R.H., Bandy, D.M., 1982. Serological and safety evaluation of a combination distemper-hepatitis-parainfluenza-parvovirus vaccine with leptospira bacterin in dogs. *Canine Practice* 9, 19-21.
- Brenner, J., Markus, R., Klopfer-Orgad, U., Trainin, Z., 1989. The possible enhancement of parvovirus vaccination on the mortality rate of diseased dogs. *Journal of Veterinary Medicine Serie B* 36, 547-550.
- Ciarlini, P.C., Patrício, R.F., Couto, R., Bonello, F.L., 2004. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. *Arquivo do Instituto Biológico* 71, 323-327.
- Comazzi, S., Pieralisi, C., Bertazzolo, W., 2004. Haematological and biochemical abnormalities in canine blood: frequency and associations in 1022 samples. *Journal of Small Animal Practice* 45, 343-349.
- Dhein, C.R., Gorham, J.R., 1986. Host response to vaccination. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 16, 1227-1245.
- Earl FL, Melveger BE, Wilson RL, 1973. The hemogram and bone marrow profile of normal neonatal and weanling beagle dogs. *Laboratory Animal Science*. 23, 690-5.
- Fukuda, S., Kawashima, N., Iida, H., Aoki, J., Tokita, K., 1989. Age dependency of hematological values and concentrations of serum biochemical constituents in normal beagles from 1 to 14 years of age. *Journal of Veterinary Science* 51, 636-641.
- Harper, E. J., Hackett, R.M., Wilkinson, J., Heaton, P.R., 2003. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in beagles and Labrador retrievers. *Journal of American Veterinary Medical Association* 223, 1436-1442.

- Knoll, J.S., Rowell, S.L., 1996. Clinical hematology: In-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 26, 981-1002.
- Knoll, J.S. Clinical automated hematology systems, in: Schalm's veterinary hematology, Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 5th ed, 2000, pp. 1057-1063. Lippincott Williams and Wilkens, Maryland, PA.
- Krakowka, S., Olsen, R.G., Axthelm, M.K., Rice, J., Winters, K., 1982. Canine parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified-live-virus vaccine. *Journal of American Veterinary Medical Association* 180, 137-139.
- Lumsden, J.H., Mullen, K., McScherry, B.J., 1979. Canine hematology and biochemistry reference values. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 43, 125-131.
- Lund, C., Kuhl, S., Mischke, R., Gunzel-Apel, A.R., 2000. Reference values of the red blood profile in beagle, german shepherds and golden retriever puppies. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 113, 447-53.
- McDonald, L.J., 1992. Factors that can undermine the success of routine vaccination protocols. *Veterinary Medicine* 87, 223-230.
- McMichael, M., 2005. Pediatric Emergencies. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 35, 421-434.
- Miyamoto, T., Taura, Y., Une, S., Yoshitake, M., Nakama, S., Watanabe, S., 1995. Immunological responses to multivalent canine vaccines in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57, 347-349.
- Phillips, T.R., Jensen, J.L., Rubino, M.J., Yang, W.C., Schultz, R.D., 1989. Effects of vaccines on the canine immune system. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53, 154-160.
- Potgieter, L.N.D., Jones, J.B., Patton, C.S., Webb-Martin, T.A., 1981. Experimental parvovirus infection in dogs. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 45, 212-216.
- Schultz, RD, 1976. Failure of attenuated canine distemper virus (Rockborn strain) to suppress lymphocyte blastogenesis in dogs. *Cornell Veterinarian* 66, 27-31.
- Strasser, A., Thomsen, M.K., 1990. Effects of different proinflammatory mediators on canine neutrophil chemotaxis and aggregation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 25, 209-217.
- Strasser, A., May, B., Teltscher, A., Wistrela, E., Nierdemuller, H., 2003. Immune modulation following immunization with multivalent vaccines in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94, 113-121.

Table Legends

Table 1: Minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in female puppies.

Table 2: Minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in male puppies.

Table 3: Regression Equations for parameters with statistically significant correlation with age.

Table 4: Minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in male and female puppies one week after the first immunization.

Tables

Table 1: Minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in female puppies with age.

	8 weeks		12 weeks		16 weeks		24 weeks		60 weeks		64 weeks		68 weeks	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
^a WBC (10 ⁹ /L)	11.06	18.93	7.77	27.58	8.00	28.22	8.46	18.38	9.67	18.50	4.97	15.77	9.03	22.52
^b Lymph (%)	29.70	43.10	6.90	50.80	22.40	47.90	28.00	46.00	24.00	39.10	25.10	37.00	22.90	62.60
^c Mon (%)	3.70	7.40	3.10	8.40	2.10	8.70	2.50	7.40	2.90	5.10	1.70	5.80	2.50	14.10
^d Gran (%)	3.10	5.90	0.50	6.30	2.00	5.90	2.50	5.130	2.60	4.60	2.30	5.70	3.00	4.50
^e RBC (10 ¹² /L)	0.40	1.00	0.30	45.30	0.20	1.20	0.20	0.90	0.30	0.60	0.10	0.90	0.30	1.00
^f PCV (%)	53.50	67.00	6.10	66.70	48.70	74.70	50.60	69.50	56.30	72.60	57.30	71.30	33.10	74.10
^g MCV (fL)	6.20	11.80	3.90	18.40	4.80	18.30	5.30	11.11	6.50	13.140	3.00	9.40	6.20	9.20
^h MCH (pg)	4.65	6.31	5.10	7.060	5.440	7.79	5.50	7.70	6.54	7.76	6.98	8.10	6.66	9.53
ⁱ MCHC (g/L)	31.90	41.80	30.80	47.00	38.60	61.50	44.00	77.80	49.20	61.70	51.40	62.30	49.80	74.20
^j Hb (g/L)	62.20	71.50	52.60	73.00	65.00	79.00	62.50	78.60	74.80	79.60	73.70	80.50	72.70	78.70
^k Plt (10 ⁹ /L)	18.50	24.50	17.80	28.50	18.10	26.80	19.40	28.40	25.00	29.20	23.90	28.00	25.90	29.70
	28.60	35.70	27.30	36.50	27.90	35.10	29.10	38.30	31.70	37.90	31.60	36.30	34.00	37.70
	10.70	13.30	10.50	15.10	12.90	20.90	14.40	20.20	16.50	22.70	16.70	22.40	17.00	26.60
	79.0	604.0	28.0	444.0	72.0	1002.0	114.0	295.0	187.0	878.0	140.0	939.0	166.0	388.0

^a white blood cells; ^b lymphocyte; ^c monocyte; ^d granulocyte; ^e red blood cell; ^f packed cell volume; ^g mean corpuscular volume; ^h mean corpuscular hemoglobin, ⁱ mean corpuscular hemoglobin concentration; ^j hemoglobin; ^k platelet; Min – minimum (mean - 2SD); Max – maximum (mean + 2SD).

Table 2: Minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in male puppies with age.

	8 weeks		12 weeks		16 weeks		24 weeks		60 weeks		64 weeks		68 weeks	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
^a WBC (10 ⁹ /L)	10.00	21.17	6.46	21.21	8.77	18.99	10.11	14.56	9.66	19.58	8.71	18.65	9.35	15.34
^b Lymph (%)	34.80	61.20	29.70	56.30	31.0	61.00	20.70	49.50	28.10	54.40	18.90	55.00	21.10	15.20
^c Mon (%)	3.83	9.80	2.10	8.90	3.00	9.20	2.30	5.90	3.10	10.30	2.60	10.30	2.80	7.70
^d Gran (%)	3.50	20.00	3.00	6.50	2.80	6.70	2.10	5.40	2.20	4.80	2.20	7.40	2.60	4.80
^e RBC (10 ¹² /L)	0.50	2.40	0.23	1.10	0.20	1.30	0.20	0.61	0.40	0.50	0.20	0.80	0.40	0.70
^f PCV (%)	27.00	60.10	37.70	66.80	36.00	65.40	46.00	76.30	41.50	69.0	41.90	77.70	45.20	76.30
^g MCV (fL)	3.24	11.60	4.13	13.40	4.40	9.20	5.20	9.60	5.20	8.90	5.60	13.40	5.40	11.00
^h MCH (pg)	3.56	7.38	4.54	8.920	5.34	9.130	6.18	7.990	6.97	8.410	6.25	7.90	5.44	7.97
ⁱ MCHC (g/L)	28.20	47.60	32.90	53.00	35.60	65.50	42.90	51.40	52.70	63.40	47.00	60.30	38.90	63.80
^j Hb (g/L)	61.60	79.20	54.30	81.40	64.00	75.90	64.40	76.40	73.40	79.80	71.90	79.50	71.60	80.30
^k Plt (10 ⁹ /L)	17.70	25.90	13.30	26.80	19.60	27.10	18.10	29.00	24.90	27.40	23.70	28.60	23.70	30.00
	27.80	39.90	24.50	36.10	29.40	36.50	22.80	39.50	31.20	36.80	26.40	38.10	31.40	38.90
	8.00	18.80	10.20	17.00	12.60	19.30	14.40	18.70	18.40	21.60	16.20	21.40	12.90	22.50
	139.0	571.0	124.0	681.0	123.0	388.0	209.0	392.0	112.0	277.0	65.0	395.0	120.0	743.0

^a white blood cells; ^b lymphocyte; ^c monocyte; ^d granulocyte; ^e red blood cell; ^f packed cell volume; ^g mean corpuscular volume; ^h mean corpuscular hemoglobin, ⁱ mean corpuscular hemoglobin concentration; ^j hemoglobin; ^k platelet; Min – minimum (mean - 2SD); Max – maximum (mean + 2SD).

Table 3: Regression Equations for parameters with statistically significant correlation with age.

Regression Equations	
^a WBC (10 ⁹ /L)	$Y=16.12 - 0.2403 \times \text{age} + 0.0028 \times \text{age}^2$
^b Lymph (%)– F	$Y=38.59 - 0.1070 \times \text{age}$
^b Lymph (%)– M	$Y=43.04 - 0.1431 \times \text{age}$
^b Lymph (10 ⁹ /L)	$Y=7.13 - 0.1603 \times \text{age} + 0.0017 \times \text{age}^2$
^c Mon (%)	$Y=5.95 - 0.1471 \times \text{age} + 0.0017 \times \text{age}^2$
^d Gran (%)	$Y=47.28 + 0.7031 \times \text{age} - 0.0071 \times \text{age}^2$
^e RBC (10 ¹² /L)– F	$Y=4.73 + 0.1214 \times \text{age} - 0.0011 \times \text{age}^2$
^e RBC (10 ¹² /L)– M	$Y=4.12 + 0.1625 \times \text{age} - 0.0017 \times \text{age}^2$
^f PCV (%)– F	$Y=26.89 + 1.3886 \times \text{age} - 0.0139 \times \text{age}^2$
^f PCV (%)– M	$Y=28.42 + 1.029 \times \text{age} - 0.0104 \times \text{age}^2$
^g MCV (fL) – F	$Y=67.01 + 0.1605 \times \text{age}$
^g MCV (fL) – M	$Y=68.58 + 0.1181 \times \text{age}$
^h MCH (pg) – F	$Y=21.35 + 0.0838 \times \text{age}$
^h MCH (pg) – M	$Y=21.63 + 0.0790 \times \text{age}$
ⁱ MCHC (g/L)– F	$Y=31.89 + 0.0425 \times \text{age}$
ⁱ MCHC (g/L) – M	$Y=31.76 + 0.0440 \times \text{age}$
^j Hb (g/L)– F	$Y=9.16 + 0.3932 \times \text{age} - 0.0033 \times \text{age}^2$
^j Hb (g/L)– M	$Y=8.77 + 0.3869 \times \text{age} - 0.0034 \times \text{age}^2$

^a white blood cells; ^b lymphocyte; ^c monocyte; ^d granulocyte; ^e red blood cell; ^f packed cell volume; ^g mean corpuscular volume; ^h mean corpuscular hemoglobin, ⁱ mean corpuscular hemoglobin concentration; ^j hemoglobin; ^k platelet; F- female; M – male.

Table 4: Minimum (mean - 2SD) and maximum (mean + 2SD) range for each hematologic parameter in male and female puppies one week after the first immunization.

	Female		Male	
	Min	Max	Min	Max
^a WBC (10 ⁹ /L)	5.9	27.41	7.4	13.8
^b Lymph (%)	20.9	55.5	27.5	55.8
Lymph (10 ⁹ /L)	2.2	15.2	2.4	6.7
^c Mon (%)	3.1	8.1	3.1	8.1
Mon (10 ⁹ /L)	0.2	1.4	0.4	0.77
^d Gran (%)	39.6	74.6	38.1	69.2
Gran (10 ⁹ /L)	3.1	11.6	3.65	9.29
^e RBC (10 ¹² /L)	4.67	6.97	3.60	7.11
^f PCV (%)	3.6	46.6	27.4	45.1
^g MCV (fL)	64.5	72.1	63.5	78.3
^h MCH (pg)	17.9	23.3	17.5	27.1
ⁱ MCHC (g/L)	26.8	33.2	27.2	36.3
^j Hb (g/L)	10.6	13.4	8.9	15.1
^k Plt (10 ⁹ /L)	60	655	82	444

^a white blood cells; ^b lymphocyte; ^c monocyte; ^d granulocyte; ^e red blood cell; ^f packed cell volume; ^g mean corpuscular volume; ^h mean corpuscular hemoglobin, ⁱ mean corpuscular hemoglobin concentration; ^j hemoglobin; ^k platelet.

Figure legends**Fig. 1 – White Blood Cells counts**

- a) – Predicted and 95% confidence intervals for WBC count in dogs (females and males). plotted against age. Predicted values were determined by the regression equation. $y = 16.12 - 0.2403 \times \text{age} + 0.00028 \times \text{age}^2$.
- b) - Predicted and 95% confidence intervals for relative granulocyte count in dogs (females and males). plotted against age. Predicted values were determined by the regression equation. $y = 47.28 + 0.7031 \times \text{age} - 0.0071 \times \text{age}^2$.
- c) - Predicted and 95% confidence intervals for relative lymphocyte count in female dogs. plotted against age. Predicted values were determined by the regression equation. $y = 38.59 - 0.1070 \times \text{age}$.
- d) - Predicted and 95% confidence intervals for relative lymphocyte count in male dogs. plotted against age. Predicted values were determined by the regression equation. $y = 43.04 - 0.1431 \times \text{age}$.

Fig. 2 – Red Blood Cells counts

- a) - Predicted and 95% confidence intervals for absolute RBC count in female dogs. plotted against age. Predicted values were determined by the regression equation. $y = 4.73 + 0.1214 \times \text{age} - 0.0011 \times \text{age}^2$.
- b) - Predicted and 95% confidence intervals for absolute RBC count in male dogs. plotted against age. Predicted values were determined by the regression equation. $y = 4.12 + 0.1625 \times \text{age} - 0.0017 \times \text{age}^2$.

Fig. 3 – Absolute WBC count before and after the first immunization (mean values)

Figure 1

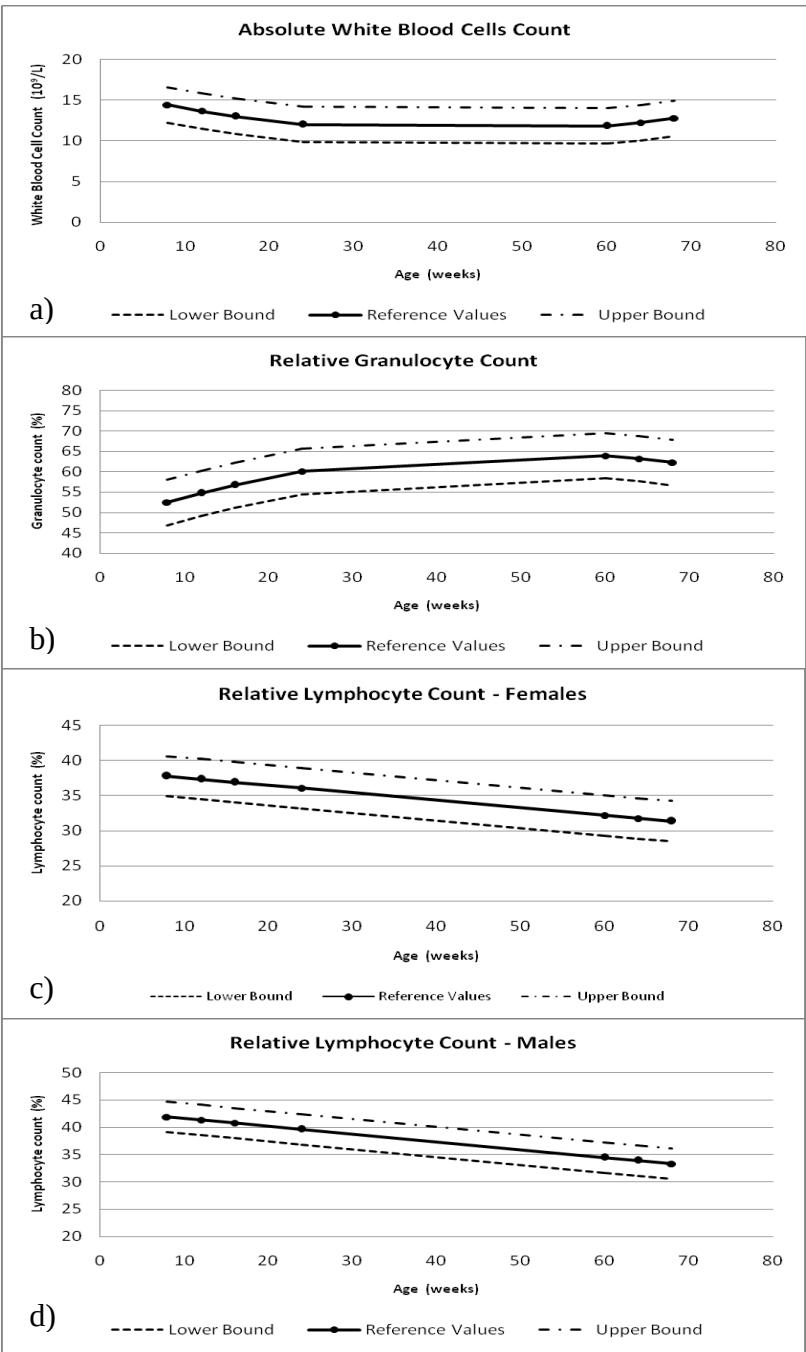


Figure 2

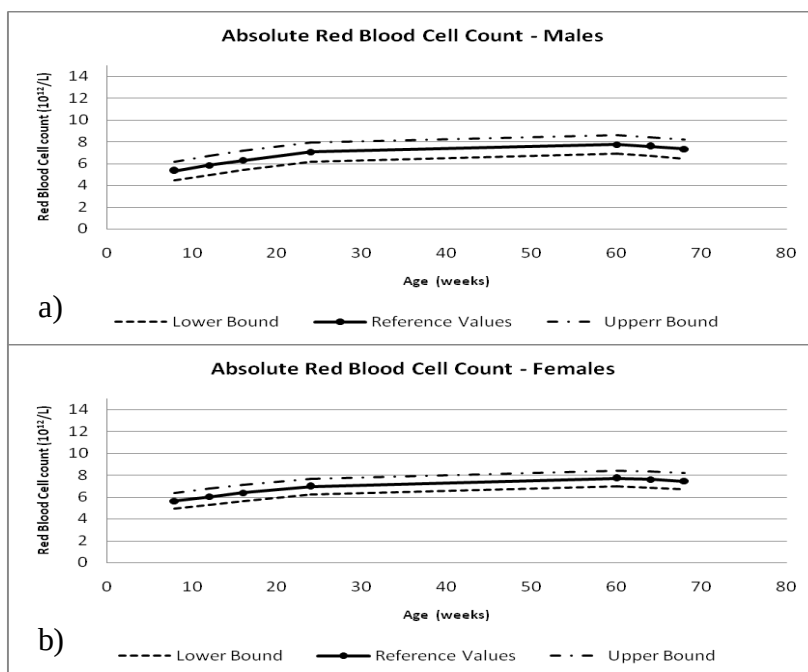
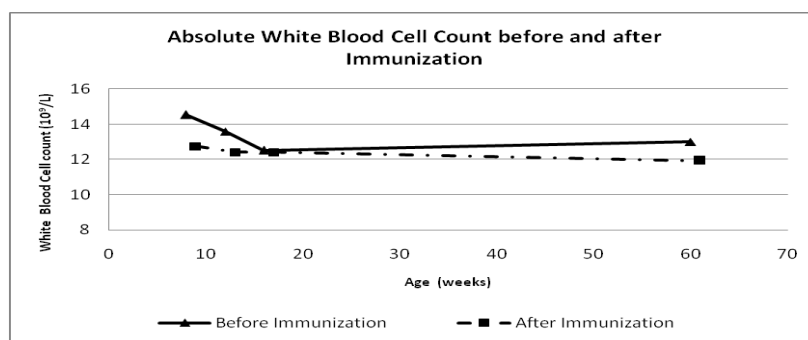


Figure 3



4 – CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO NATURAL

4 – CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO NATURAL.

4.1 – Introdução

As alterações no sistema imunitário induzidas pela infecção por CPV traduzem-se, não só pelas alterações dos valores hematológicos, mas também por alterações das citocinas e proteínas de fase aguda e da produção de anticorpos séricos específicos contra CPV (Yule et al., 1997; McCaw e Hoskins, 2006; Goddard et al., 2008).

As alterações hematológicas características da infecção por CPV são a leucopenia, que pode ser severa, e que normalmente é transitória. A leucopenia, que se pode traduzir em neutropénia, monocitopenia e eosinopénia severa, é indicativa de um mau prognóstico (Potgieter et al., 1981; McCaw et al., 1996; Goddard et al., 2006). Dada a destruição dos órgãos linfoproliferativos causada por este vírus, é um achado característico a ocorrência de linfopenia, que costuma ser mais acentuada que a neutropénia (Weiss et al., 1999 e Goddard et al., 2008). A contagem dos glóbulos vermelhos pode diminuir ao longo do curso da doença, mas a anemia não é um achado constante da infecção (Parrish, 1995; McCaw and Hoskins, 2006).

A resposta inflamatória de fase aguda é regulada por dois grupos principais de citocinas: as pro-inflamatórias e as anti-inflamatórias. As citocinas pro-inflamatórias são produzidas predominantemente pelos macrófagos activados e estão envolvidas na “up-regulation” das reacções inflamatórias. Como exemplos, temos a IL1, a IL6, a IL12, INF- γ , entre outras. As citocinas anti-inflamatórias pertencem ao grupo de citocinas derivadas das células T e estão envolvidas na “down-regulation” da reacção inflamatória e são exemplos destas citocinas a IL4, a IL10 e IL11. Investigação recente em saúde humana sugere que o principal determinante para o prognóstico da síndrome inflamatória sistémica pode ser o desequilíbrio entre a regulação do sistema pro-inflamatório e a resposta anti-inflamatória compensatória (Carrigan et al., 2004; Kjelgaard-Hansen et al., 2007). Foi demonstrado que a produção excessiva da citocina anti-inflamatória IL 10 é um dos mais importantes factores preditivos de gravidade e está normalmente relacionado com um mau prognóstico em seres humanos com sépsis (Gogos et al., 2000). O INF- γ é uma citocina pró-inflamatória que tem um papel muito importante na regulação do sistema imune na infecção viral. Apresenta um mecanismo de acção antivírico, pela indução da expressão de enzimas anti-virais

e também antibacteriano, activando o papel microbicida dos macrófagos (Schroder et al., 2004).

Na infecção por CPV, os títulos de anticorpos séricos começam a aumentar no 3º dia PI, atingindo o seu máximo cerca de 7 dias PI. Estes anticorpos podem manter-se de forma elevada e constante pelo menos durante um ano (McCaw e Hoskins, 2006) e é a acção destes anticorpos neutralizantes a responsável pelo término da virémia secundária (Guilford, 1996). A presença destes anticorpos pode, por si só, conter o processo infeccioso, ao prevenir a disseminação do vírus para locais de replicação secundários, como os intestinos, diminuindo assim a gravidade e duração da infecção por CPV (Rice et al., 1982).

Os objectivos deste trabalho consistiram na avaliação da resposta imunológica secundária à infecção por CPV. Assim, pretendeu-se determinar as alterações hematológicas em animais com infecção por CPV e relacionar essas alterações com o subtipo de CPV e o prognóstico; determinar a expressão de citocinas (IL-10 e INF- γ) no sangue de animais com infecção por CPV e quantificar o título de anticorpos, em animais com infecção com CPV, ao longo do tempo de internamento, utilizando as subtipos CPV2, CPV2b e CPV2c nos testes de IHA, de forma a aferir a resposta humoral.

4.2 – Animais

Neste estudo, foram incluídos 33 animais, com idades compreendidas entre as 8 semanas e as 36 semanas, que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário Clínicão (Figueira da Foz, Portugal), no período de Abril de 2006 a Janeiro de 2007, cujos sinais clínicos eram compatíveis com infecção por parvovírus canino (anorexia, depressão, vômito, diarreia). Dos 33 animais, 19 (57%) eram machos e 14 (43%) eram fêmeas. Deste conjunto de animais, alguns não estavam vacinados e outros não possuíam o esquema de primovacinação completo. Todos foram internados de forma a ser instituída a terapêutica indicada.

Os proprietários foram informados dos objectivos do estudo e assinaram um formulário de aceitação e consentimento para a participação no mesmo.

4.3 – Amostras

Antes da recolha das amostras, foi efectuada e registada uma história clínica, assim como um exame físico detalhado a cada animal.

Foi recolhida de cada animal, uma zaragatoa rectal no dia 1, que foi colocada num tubo com 0,5 ml de soro fisiológico estéril e congelada a -20°C até análise posterior. Foram também recolhidas amostras de sangue, por venopunção da jugular, para tubos de 5 mililitros. Para a avaliação dos valores hematológicos, foram recolhidos 2 mililitros de sangue para tubos com EDTA. Após centrifugação destes tubos, o soro e o plasma destes animais foram congelados a -20°C, até análise. A recolha de amostras sanguíneas foi repetida a cada dois dias, num total de três colheitas por animal.

4.4 – Detecção e tipificação do vírus

4.4.1 – Procedimento

No dia de apresentação clínica, todos os animais realizaram um teste rápido (ELISA comercial) para a pesquisa de antígeno de CPV nas fezes.

Utilizando a zaragatoa rectal, foi realizada a extracção de ADN viral, utilizando a técnica anteriormente descrita por Desario et al., 2005. De forma sucinta, o ADN foi extraído do sobrenadante de cada amostra, após fervura durante 10 minutos, seguido de arrefecimento. A detecção genérica da presença de ADN viral específico nestas amostras foi realizada por PCR convencional, usando os primers 555-for e 555-rev (Desario et al, 2005) e por PCR em tempo real (Decaro et al., 2005b). O PCR em tempo real foi realizado num termociclador Step-One™ Real-Time instrument (Applied Biosystems). A caracterização dos subtipos de CPV foi realizada por PCR-RFLP (Buonavoglia et al., 2001) e também por PCR em tempo real com sondas MGB (Decaro et al., 2006a).

4.4.2 – Resultados

4.4.2.1 Caracterização Molecular de CPV

Dos 33 animais incluídos neste estudo, 32 foram positivos à presença de ADN de CPV nas fezes. Destes 32 animais foi possível genotipar, com exactidão, 29 das amostras, em que 14 (48%) corresponderam a infecção por CPV2b, 13 (45%) a infecção por CPV2c e 2 (7%) foram casos de co-infecção CPV2b/2c (Quadro 1). Quanto ao prognóstico, 20 (70%) animais sobreviveram e 9 (30 %) morreram. Não se verificou qualquer relação entre a mortalidade e subtipo de CPV.

4.4.2.2 Teste Rápido – ELISA

Os resultados do teste de ELISA permitiram identificar 22 (76%) animais com o resultado do teste positivo, e 7 (24%) animais apresentaram um resultado do teste negativo. Com este teste, foi possível identificar todos os subtipos de CPV (CPV2b e CPV2c) e também os casos de co-infecção CPV2b/2c, que se confirmaram posteriormente com a realização da genotipagem molecular (Quadro 1).

Resultado da Genotipagem de CPV							
Animal ID	Tipo CPV	Prognóstico	Teste Elisa	Animal ID	Tipo CPV	Prognóstico	Teste Elisa
1	2b	M	N	17	Coinf	S	N
3	2c	M	P	18	2b	S	P
4	2c	S	N	19	2c	S	P
5	2b	S	P	20	2c	S	P
6	2b	S	P	21	2b	S	P
7	2b	S	N	22	2c	S	P
8	2c	S	P	23	2c	S	P
9	2b	S	P	24	2b	M	P
10	2b	M	P	25	Coinf	M	P
11	2b	S	N	26	2c	M	P
12	2b	S	P	27	2c	S	P
13	2c	M	P	28	2c	S	N
14	2c	M	P	29	2b	S	P
15	2b	M	P	32	2c	S	P
16	2b	S	N				

Quadro 1: Resultados da genotipagem molecular das estirpes de CPV, resultado do teste rápido (ELISA) e prognóstico, nos animais com infecção por CPV. Legenda: ID – identificação do animal; M – morte; S – sobrevivência; N – negativo; P – positivo; 2b – CPV2b; 2c – CPV2c; Coinf – Co-infecção CPV2b/2c.

4.5 – Imunidade Inespecífica

4.5.1 – Valores Hematológicos

4.5.1.1 Procedimento

Para a avaliação dos valores hematológicos dos animais em estudo, foram recolhidas amostras de sangue nos dias 1, 3 e 5 de internamento. As amostras foram analisadas na primeira hora pós-colheita, num aparelho de contagem

automática de células sanguíneas MS-4 (Melet Schloesing Laboratories, France). Este contador celular realiza a contagem de células por um mecanismo de impedância eléctrica. Sempre que se inicia uma nova análise, o aparelho realiza um teste de autocontrolo e de validação dos reagentes.

Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram a contagem de eritrócitos (RBC), hematócrito (PCV), concentração de hemoglobolína (HB), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), contagem total de leucócitos (WBC), contagem diferencial de leucócitos (contagem absoluta e diferencial de linfócitos, monócitos e granulócitos) e contagem de plaquetas (Plt).

4.5.1.2 Análise Estatística

Para cada parâmetro hematológico, foi calculada a média por dia de internamento. Estas foram posteriormente comparadas usando o T-Test. As alterações nos parâmetros hematológicos foram analisadas com estudos de associação para os subtipos de CPV e para o prognóstico, usando o teste exacto de Fisher.

Para ambas as análises foi estabelecido um nível de significância de $P < 0,05$.

4.5.1.3 Resultados

A média da contagem total de leucócitos (WBC), por dia de internamento e por subtipo de infecção por CPV, está representada no Gráfico 1.

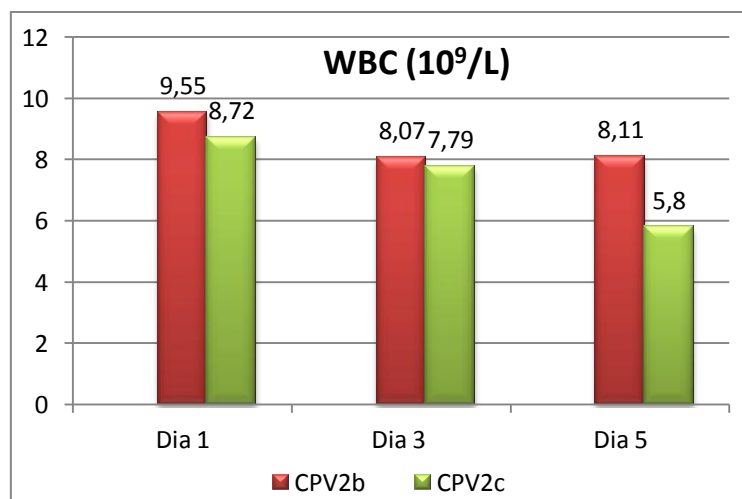


Gráfico 1: Contagem de WBC (10⁹/L), de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos 5 dias de internamento.

Não se verificou relação entre a média da contagem de WBC e o subtipo de CPV, mas houve um aumento significativo do número de animais com leucopenia ($P < 0,05$) do dia 1 de internamento para o dia 3 (Gráfico 2).

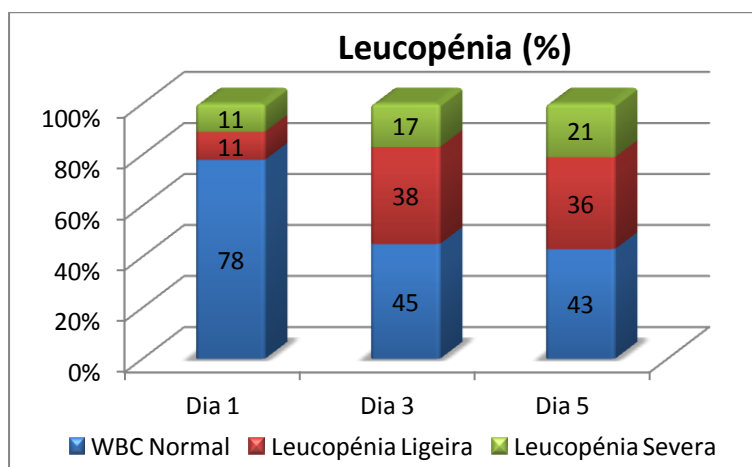


Gráfico 2: Relação entre a percentagem de animais com leucopenia (ligeira ou grave) e a percentagem de animais com contagem WBC normal, ao longo do tempo de internamento.

Não se detectou relação entre a presença de leucopenia ou gravidade da leucopenia e o subtipo de CPV envolvido. Apesar de não se verificar uma associação entre a leucopenia e a mortalidade, todos os animais que morreram estavam leucopénicos. A média da contagem total de granulócitos (Gra), não mostrou qualquer diferença significativa entre esta e a infecção pelos diferentes subtipos de CPV (Gráfico 3).

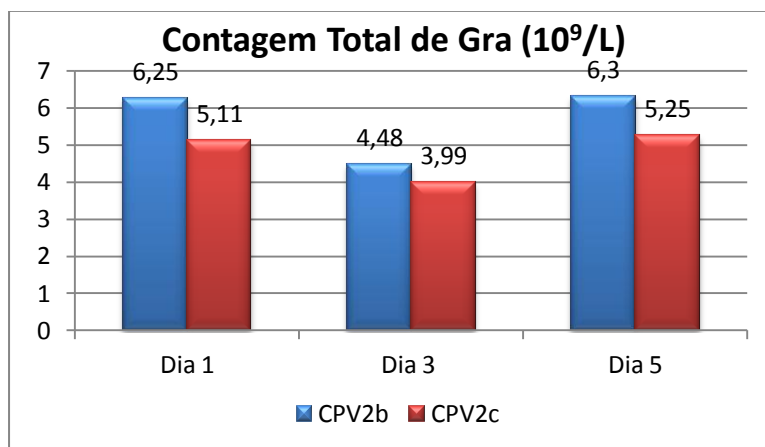


Gráfico 3: Contagem total de Gra ($10^9/L$), de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos 5 dias de internamento.

A média da contagem de Gra apresentou-se acima do limite inferior considerado como normal ($3 \times 10^9/L$), mas no dia 1, no dia 3 e no dia 5 estavam

granulocitopénicos 16%, 63% e 57% dos animais, respectivamente. Esta diminuição da contagem total de granulócitos foi significativa entre o primeiro e o segundo dia de internamento ($P < 0,05$) (Gráfico 4). Não houve relação entre a granulocitopénia e o subtipo de vírus infectante, nem relação com a mortalidade.

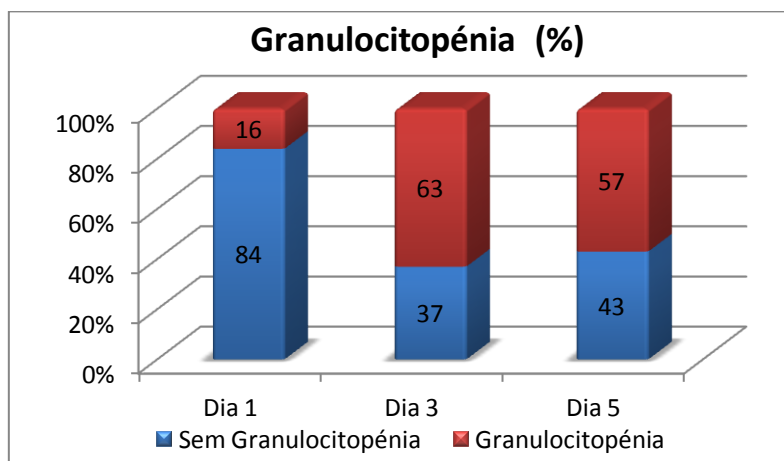


Gráfico 4: Relação entre a percentagem de animais com granulocitopénia e a percentagem de animais com contagem de Gra normal, ao longo do tempo.

A média de contagem total de linfócitos (Linf) não demonstrou diferenças significativas nem entre os dias de internamento, nem com o subtipo de CPV (Gráfico 5). De realçar que só no dia 3 de internamento se observaram 2 animais com linfopenia ($\text{Linf} < 0,6 \times 10^9/\text{L}$).

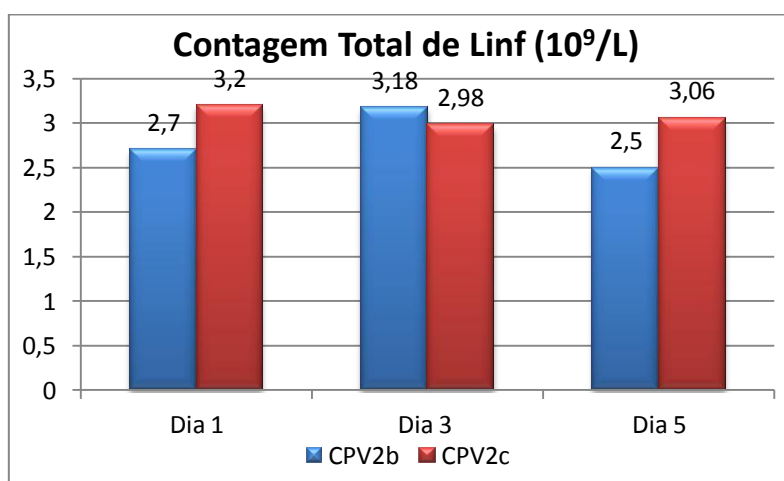


Gráfico 5: Contagem total de Linf ($10^9/\text{L}$), de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos 5 dias de internamento.

Ao longo dos dias de internamento, registou-se uma diminuição significativa da média do número de eritrócitos (RBC) ($P < 0,05$) (Gráfico 6). Não se registou uma

diferença significativa entre as médias da contagem de RBC e subtipos de CPV intervenientes.

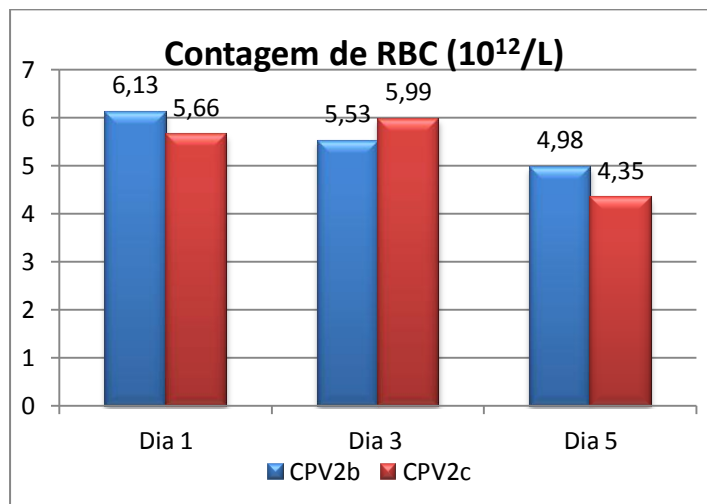


Gráfico 6: Contagem de RBC (10¹²/L), de acordo com o subtipo de CPV, ao longo dos 5 dias de internamento.

Ao longo dos dias de internamento, foi aumentando a percentagem de animais com anemia (RBC < 5,5×10¹²/L) (Gráfico 7), não se verificando relação, no entanto, entre a anemia e o subtipo de CPV, ou mortalidade. De igual modo, também não foi verificada qualquer relação entre a anemia e a presença de diarreia com sangue.

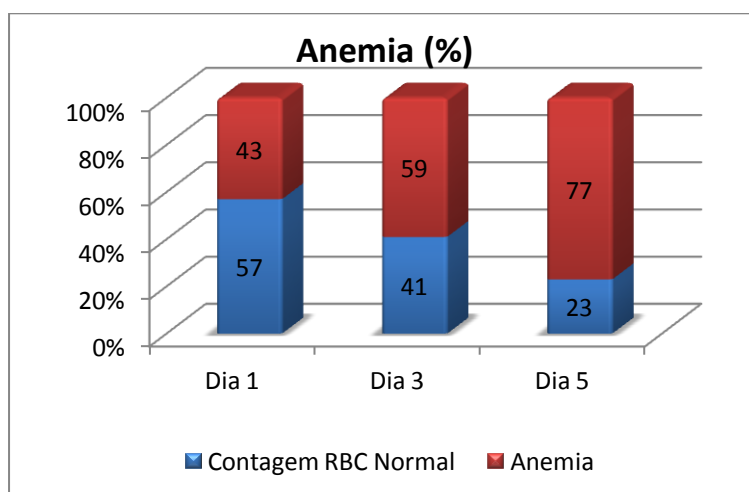


Gráfico 7: Relação entre a percentagem de animais com anemia e a percentagem de animais com contagem de RBC normal, ao longo do tempo.

Não foram observadas alterações significativas relativamente aos outros parâmetros hematológicos.

4.5.2 - Citocinas

4.5.2.1 Procedimento

Para a quantificação da IL-10 e IFN- γ no plasma sanguíneo foi utilizado o teste de ELISA comercial (Quantikine Canine IL-10 e Quantikine Canine IFN- γ - R&D Systems, respectivamente). Este é um teste quantitativo que se baseia num método imunoenzimático em “sandwich” e foi realizado de acordo com as normas do fabricante. Foram incluídas amostras padrão das respectivas citocinas em diluições seriadas e amostras de soro de animais com infecção por CPV2b, CPV2c e co-infecção CPV2b/2c. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. Para o cálculo das concentrações das citocinas estabeleceu-se uma curva de calibração, em que a média das absorvâncias padrão ficou no eixo dos X, e as concentrações no eixo dos Y. O cálculo da concentração das respectivas citocinas baseou-se na média dos valores de densidade óptica dos duplicados da amostra, após a subtração da média da densidade óptica do padrão (“branco”).

4.5.2.2 Resultados

Os resultados obtidos estão representados no Quadro 2.

Doseamento da IL10 e INF γ em animais com infecção por CPV						
Animal ID	Tipo CPV	Prognóstico	IL10 (ng/L)		INF γ (ng/L)	
			Dia 1	Dia 3	Dia 1	Dia3
1	CPV2b	M	ND	ND	ND	ND
3	CPV2c	M	ND	1385,4	ND	ND
4	CPV2c	S	ND	ND	ND	ND
5	CPV2b	S	ND	ND	ND	ND
7	CPV2b	S	ND	ND	ND	ND
8	CPV2c	S	ND	ND	ND	ND
9	CPV2b	S	ND	ND	ND	ND
10	CPV2b	M	ND	ND	ND	ND
11	CPV2b	S	ND	ND	ND	ND
13	CPV2c	M	18,2	ND	ND	ND
14	CPV2c	M	ND	ND	ND	ND
15	CPV2b	M	ND	ND	247,4	ND
17	CPV2b/2c	S	ND	ND	ND	ND
20	CPV2c	S	47,8	ND	ND	ND
24	CPV2b	M	ND	ND	ND	ND
25	CPV2b/2c	M	29,8	ND	60,1	ND
26	CPV2c	M	ND	ND	ND	ND
27	CPV2c	S	ND	ND	ND	ND
29	CPV2b	S	ND	ND	ND	ND
32	CPV2c	S	ND	ND	ND	ND

Quadro 2: Doseamento da IL10 e INF- γ em animais com infecção por CPV. Está também representado o subtipo de CPV e o prognóstico. Legenda: ID – identificação do animal; ND – não doseável; M – morte; S – sobrevivência.

Os valores de referência da concentração de IL-10 estão situados desde o não doseamento até 52 ng/L. Apenas o animal 3, no 3º dia de internamento, apresentou valores muito acima do considerado normal.

Relativamente ao INF- γ , os valores de referência situam-se entre o não doseamento e os 97 ng/L. Apenas o animal 15 apresentou valores de INF- γ acima do considerado normal, no primeiro dia internamento.

Não foi possível identificar qualquer relação entre o doseamento destas citocinas, nem com subtipo de CPV, nem com a mortalidade.

4.6 – Imunidade Específica

4.6.1 – Titulação de Anticorpos

4.6.1.1 Procedimento

A titulação de anticorpos foi realizada pelo teste de IHA. Os vírus utilizados como antígeno no teste de IHA consistiram em:

- **CPV subtipo 2** – origem na vacina Primodog® (Merial), vacina viva modificada de CPV2, estirpe Cornell 780916.
- **CPV subtipo 2b** – origem numa amostra de campo nacional, tipificada por PCR em Tempo Real, por PCR convencional com enzima de restrição MbolI e por sequenciação genética.
- **CPV subtipo 2c** - origem numa amostra de campo nacional, tipificada por PCR em Tempo Real, por PCR convencional com enzima de restrição MbolI e por sequenciação genética.

Após a diluição seriada dos soros em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em V, realizadas numa solução fosfatada tamponada (pH 7,2), iniciando com diluições 1:10, o teste de IHA decorreu a uma temperatura de 4º C, e foram utilizados eritrócitos de porco a 0,8 %. Todas as amostras foram testadas usando 8 Unidades de Hemaglutinação de vírus. Os títulos expressos foram aqueles referentes à diluição sérica mais alta capaz de inibir completamente a hemaglutinação.

4.6.1.2 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados referentes à titulação de anticorpos por dia de internamento, foi utilizado um modelo linear, onde a variável dependente

consistiu nos valores dos títulos de anticorpos contra CPV em cada dia de internamento, após a sua transformação logarítmica:

$$y = \text{média} + \text{dia de internamento} + \text{vírus (dia)} + e$$

onde,

y = transformação logarítmica do título de anticorpos;

dia de internamento = dia de recolha da amostra sanguínea (covariável);

vírus (dia) = efeito dos 3 vírus (CPV2, CPV2b, CPV2c) dentro de cada dia de internamento;

e = erro do modelo, assumindo uma distribuição $N(0, \sigma^2)$.

Para a análise estatística dos dados referentes à titulação de anticorpos e sua relação com variáveis como prognóstico, WBC, Gra, RBC, foi utilizado um modelo linear, onde a variável dependente consistiu nos valores dos títulos de anticorpos contra CPV em cada dia de internamento, após a sua transformação logarítmica:

$$y = \text{média} + \text{dia de internamento} + \text{variável (dia e vírus)} + e$$

onde,

y = transformação logarítmica do título de anticorpos;

dia de internamento = dia de recolha da amostra sanguínea (covariável);

variável (dia e vírus) = efeito da variável (prognóstico, WBC, Gra, e RBC) dentro de cada dia de amostragem e dentro de cada vírus;

e = erro do modelo, assumindo uma distribuição $N(0, \sigma^2)$.

Todas as análises foram efectuadas utilizando software informático de análise estatística SAS (SAS, 1989). As estatísticas avaliadas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4.6.1.3 - Resultados

Os resultados da tipificação do subtipo de CPV, o seu prognóstico e a sua relação com as titulações de anticorpos nos teste de IHA, usando como antigénio o vírus CPV2, CPV2b e CPV2c estão representados no Anexo 2.

As médias geométricas dos valores de inibição de hemaglutinação em cada dia de amostragem e por tipo de vírus usado no teste de IHA, em animais com infecção por CPV, foram calculadas (Tabela 1).

Médias dos Títulos de Anticorpos/Dia de internamento			
Vírus do Teste	Dia 1	Dia 3	Dia 5
CPV2	1:829	1:3641	1:13360
CPV2b	1:773	1:3641	1:7332
CPV2c	1:812	1:6003	1:13360

Tabela 1: Comparação entre as médias ajustadas para o modelo ($y = \text{média} + \text{dia de internamento} + \text{vírus (dia)} + e$), por dia de internamento, em animais com infecção por CPV.

Independentemente do subtipo de CPV envolvido nas infecções dos animais, verificou-se um aumento significativo do título de anticorpos com o tempo, sendo que o título de anticorpos no dia 5 foi bastante superior ao detectado no primeiro dia da apresentação clínica (Gráfico 8).

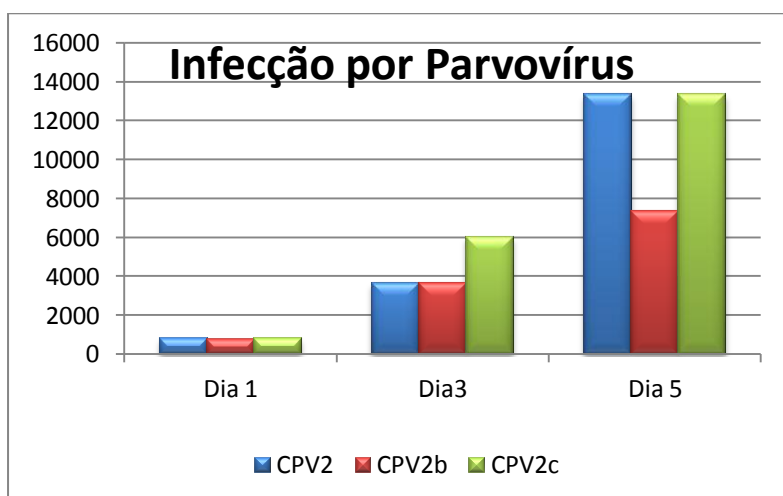


Gráfico 8: Evolução ao longo dos dias de internamento do título de anticorpos, usando como antigénio nos testes de IHA os vírus CPV2, CPV2b e CPV 2c.

As médias geométricas dos valores de inibição de hemaglutinação em cada dia de amostragem e por tipo de vírus usado no teste de IHA foram calculadas, para animais com infecção por CPV2b e CPV2c (Tabela 2).

Médias dos Títulos de Anticorpos/Dia de internamento						
Vírus do Teste	Infecção CPV2b			Infecção CPV2c		
	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 1	Dia 3	Dia 5
CPV2	1:1212	1:4866	1:13767	1:572	1:3042	1:11499
CPV2b	1:1394	1:4583	1:9228	1:450	1:2697	1:5115
CPV2c	1:925	1:7406	1:13767	1:672	1:4915	1:14472

Tabela 2: Comparação entre as médias ajustadas para o modelo ($y = \text{média} + \text{dia de internamento} + \text{vírus (dia)} + e$), por dia de internamento, em animais com infecção por CPV2b e CPV2c.

O aumento significativo ao longo dos dias de internamento também foi observado, quando se comparou o título de anticorpos de animais com infecção por CPV2b e CPV2c (Gráfico 9 e 10).

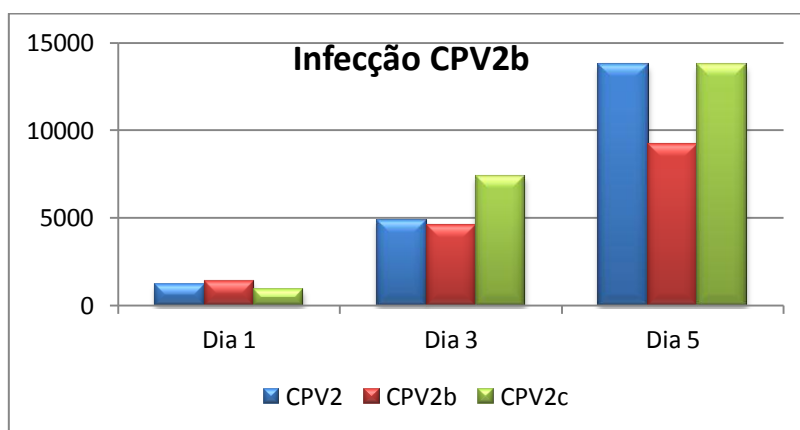


Gráfico 9: Evolução ao longo dos dias de internamento, dos animais com infecção pela estirpe CPV2b, do título de anticorpos, usando como antígeno nos testes de IHA os vírus CPV2, CPV2b e CPV2c.

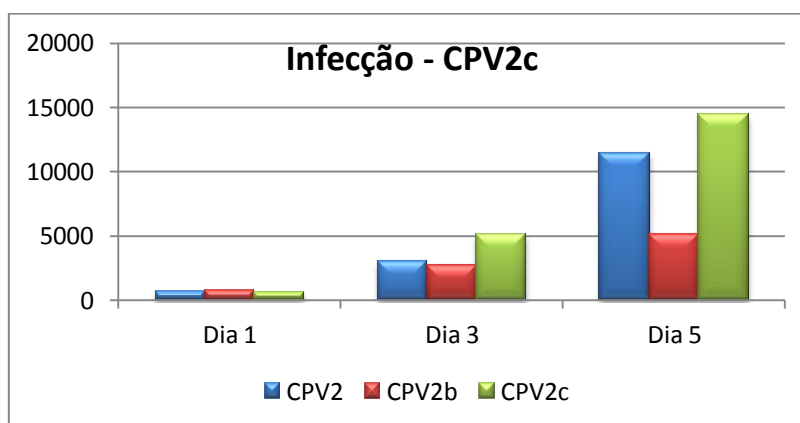


Gráfico 10: Evolução ao longo dos dias de internamento, dos animais com infecção pela estirpe CPV2c, do título de anticorpos, usando como antígeno nos testes de IHA os vírus CPV2, CPV2b e CPV2c.

Não se verificaram diferenças significativas nas titulações de anticorpos contra CPV, quando se usaram os diferentes subtipos de vírus (CPV2, CPV2b e CPV2c) no teste de IHA.

Neste estudo, não se registou nenhuma associação entre os títulos de anticorpos contra CPV e o prognóstico (morte versus sobrevivência), a contagem de WBC, a contagem absoluta de Gra e a contagem de RBC.

4.7– Conclusões

Quanto às alterações dos parâmetros hematológicos em animais com infecção por CPV, este estudo demonstrou que, de uma forma geral, o envolvimento dos diferentes subtipos de CPV não apresenta diferenças significativas nas alterações hematológicas que induzem, nomeadamente na contagem de WBC, de Gra, de Linf e de RBC.

Verificou-se também que não há diferença significativa entre a média da contagem total de leucócitos ao longo do tempo de internamento, contudo, existe um aumento significativo de animais com leucopenia ao longo do curso clínico, como já foi referido por outros autores (McCaw e Hoskins, 2006). Apesar de a leucopenia ser considerada uma alteração característica desta doença, a verdade é que está presente em menos de metade dos animais infectados na altura da sua admissão hospitalar (Prittie, 2004). Se forem efectuados leucogramas seriados ao longo do curso clínico da doença, é possível detectar leucopenia em cerca de 85% dos casos (McCaw e Hoskins, 2006).

A descrição de que a linfopenia é mais acentuada que a neutropénia (Parrish, 1995; McCaw and Hoskins, 2006), não foi observada neste estudo (tendo sido detectada apenas em dois animais no 3º dia de internamento) e a leucopenia apresentada pelos animais neste estudo ocorre principalmente à custa de uma granulocitopénia.

Ao longo do internamento, foi possível observar um aumento significativo dos animais com anemia, não tendo sido possível estabelecer uma associação entre esta e a presença de diarreia hemorrágica. Também não foi possível associar as alterações hematológicas a factores de prognóstico, nem com o subtipo de vírus implicado.

A avaliação das citocinas IL-10 e INF- γ dos animais com infecção por CPV permitiu verificar que os níveis de IL-10 não parecem estar aumentados nos animais com infecção clínica por CPV, o mesmo acontecendo em relação aos níveis de INF- γ . Dado o grande número de animais, em que não foi possível dosear estas

citocinas, talvez fosse importante utilizar outros métodos de medição mais sensíveis para determinar diferenças subtis entre as concentrações destas proteínas. O carácter pulsátil da sua produção também torna difícil o seu doseamento (Céron et al., 2005).

A titulação de anticorpos dos animais com infecção por CPV permitiu registar o aumento dos mesmos ao longo do tempo de internamento, independentemente do tipo de variante de CPV envolvida. Este aumento do título já era esperado, pois a resposta imune promove a produção de anticorpos séricos de forma a terminar com a virémia (Meunier et al, 1985b). Não se observaram diferenças significativas no título de anticorpos dos animais com determinada estirpe de CPV, quando sujeitos ao teste de IHA com vírus homólogo ou heterólogo. Este tipo de observação é dificultada nas condições de campo deste estudo, pois os dias de apresentação clínica dos animais diferem em relação ao tempo pós-infecção.

5 – PESQUISA DE RESERVATÓRIOS DE CPV

5 – PESQUISA DE RESERVATÓRIOS DE DOENÇA

5.1 – Introdução

Após a infecção com o CPV, a excreção vírica acontece normalmente durante 7 a 12 dias, mas considera-se que pode também ocorrer excreção crónica (Decaro et al., 2005a e McCaw e Hoskins, 2006). Pouco se sabe sobre a prevalência da excreção crónica de CPV, não só em animais com sinais gastrointestinais, como também em animais assintomáticos (Schmitz et al., 2009), tendo esta sido identificada em outros membros da família *Parvoviridae*, nomeadamente no parvovírus da doença Aleutian da marta, alguns parvovírus de roedores e no caso do parvovírus humano B19 (Schackelton et al., 2007), tendo a excreção persistente ou periódica de CPV nas fezes sido observada esporadicamente (Swango, 1983).

Os gatos são susceptíveis à infecção por estirpes de campo do CPV2, nomeadamente o CPV2a, CPV2b e CPV2c, onde a infecção causa sinais clínicos indistinguíveis do FPV (Truyen et al., 1995; Battilani et al., 2006 e 2011). Ikeda et al. (2002), observaram que as novas variantes de CPV podem persistir em gatos infectados, ao identificar CPV2a e CPV2b em gatos clinicamente assintomáticos. O papel dos felinos na disseminação do parvovírus canino também ainda está por determinar.

Apesar de se considerar que a persistência do vírus no ambiente é mais importante na perpetuação da doença do que a existência de portadores crónicos (McCaw e Hoskins, 2006), não existe nenhum estudo no qual se determine a existência de animais que excretam o vírus de forma crónica.

O objectivo deste trabalho consistiu em detectar a presença de vírus excretado nas fezes de uma população de cães e de uma população de gatos, sem sinais de infecção por CPV.

5.2 – Material e Métodos

5.2.1 – Animais

Entraram no estudo 74 animais, sendo 30 cães e 44 gatos, tendo as amostras sido colhidas durante o mês de Fevereiro de 2008. A população canina (25% fêmeas e 75% machos) tinha idades compreendidas entre 1 e os 14 anos. Apresentaram-se à consulta no Hospital Veterinário Clinição (Figueira da Foz, Portugal), quer por motivos de doença, quer por motivos de terapêutica

profiláctica. Os proprietários foram informados dos objectivos do estudo e consentiram na participação dos seus animais neste estudo.

A população felina consistiu em 44 animais (52% fêmeas e 48% machos) que foram incluídos numa campanha de controlo da natalidade instituída pela Associação Protectora de Animais da Figueira da Foz e Câmara Municipal da Figueira da Foz, que permitiram a recolha de amostras durante o procedimento anestésico dos animais. A história médica de todos os felinos era desconhecida e eram animais com acesso livre ao ambiente exterior.

5.2.2 – Amostras

As amostras recolhidas nos animais consistiram em zaragatoas rectais. Estas foram colocadas em tubos de transporte com 0,5 ml de soro fisiológico estéril e congeladas a - 20°C até serem analisadas.

5.2.3 – Detecção de CPV

Para a detecção de CPV nas amostras, foi primeiro realizada a extracção de DNA viral, utilizando a técnica anteriormente descrita por Desario et al, 2005. De forma sucinta, o DNA foi extraído do sobrenadante de cada amostra após fervura durante 10 minutos, seguido de arrefecimento em gelo. A detecção genérica da presença de DNA viral específico nestas amostras foi realizada por PCR convencional, usando os primers 555-for e 555-rev (Desario et al., 2005) e por PCR em tempo real (Decaro et al., 2005b). O PCR em tempo real foi realizado num termociclador Step-One™ Real-Time instrument (Applied Biosystems).

5.3 – Resultados

Em nenhuma das amostras testadas, pelas diferentes técnicas, foi identificada a presença de DNA de CPV.

5.4 – Conclusões

Apesar de não ter sido detectada a presença de CPV nas amostras fecais destes animais, não se pode excluir a presença de animais com excreção crónica de vírus nas fezes, porque o número de animais é reduzido e não pode ser considerado como representativo da população em geral. De igual modo a excreção pode ocorrer de forma esporádica, o que pode tornar mais difícil a sua detecção. Finalmente, a escolha de animais feita de forma aleatória pode não

incluir os animais que comprovadamente tiveram infecção por CPV no passado. Assim, uma nova abordagem sobre este tema deveria centrar a sua atenção no seguimento de animais com infecção anterior por CPV, quer em caninos, quer felinos.

CAPÍTULO III - DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO III - DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Parvovírus Canino

O Parvovírus Canino surgiu nos finais dos anos 70 como causa de uma nova doença nos cães, tendo desde essa altura sofrido uma disseminação de forma quase imediata por todo mundo, com consequências graves para a população canina, que se encontrava imunologicamente desprotegida (Truyen et al., 1995; Shackelton et al., 2005). O CPV tem demonstrado uma capacidade enorme de evolução, podendo alterações de um só nucleótido no seu genoma levar a alterações fenotípicas dramáticas. As alterações já verificadas causaram mudanças na gama de hospedeiros e nas respostas imunitárias dos animais afectados (Lamm e Rezabek, 2008). Actualmente, existem em circulação no mundo três variantes antigénicas de CPV (CPV2a, CPV2b e CPV2c), que apresentam diferentes distribuições relativas.

- O presente estudo levou à identificação em Portugal, não só da presença do subtipo CPV2c, mas também à determinação de que os subtipos predominantes, de forma equitativa, da amostragem usada, são os subtipos CPV2b e CPV2c (as variantes antigénicas mais recentes). O estudo evolutivo do vírus, em anos sucessivos, permitiu observar que, na zona Centro do país (zona de maior amostragem), houve uma tendência significativa ($P < 0,05$) para um aumento dos casos de infecção pela nova variante CPV2c, em detrimento do número de casos de infecção pelo CPV2b.

A taxa de substituição nucleotídica do parvovírus é elevada, sendo mais similar à encontrada nos vírus de RNA do que de ADN. Esta característica pode dever-se, não só a uma forte pressão de selecção positiva, mas também a uma elevada taxa de mutação intrínseca (Hoelzer et al., 2008a). Considera-se que este último processo tem uma maior influência na ocorrência de mutações no CPV e que a recombinação genética pode ser potenciada pela existência de co-infecções com os diversos subtipos no mesmo hospedeiro (Shackelton et al., 2007; Hoelzer et al., 2008b). Co-infecções com múltiplas estirpes do vírus têm ocorrido em membros da família *Parvoviridae*, nomeadamente no parvovírus humano B19 (Candotti et al., 2004). Assim, as situações de co-infecção com várias estirpes de parvovírus parecem ocorrer de forma frequente, facilitando potencialmente a recombinação e a diversidade genética. Battilani et al. (2007), chegou a sugerir

que a nova variante, CPV2c, poderia favorecer a ocorrência de múltiplas infecções e consequentemente o polimorfismo genético.

- No presente estudo, foram identificados casos de co-infecção com os subtipos CPV2b e CPV2c. A taxa de co-infecções detectada assume valores muito significativos (17% das amostras), o que faz deste achado a primeira descrição em cães.

O impacto clínico da infecção pelos diferentes subtipos tem apresentado resultados contraditórios. Alguns estudos sugerem que o CPV2c é mais patogénico que as variantes CPV2a e CPV2b (Buonavoglia et al., 2001; Pérez et al., 2007), enquanto outros descrevem sinais clínicos menos graves e taxas de mortalidade mais baixas associadas a infecção por CPV2c (Decaro et al., 2005a).

- No estudo realizado, não foi detectada qualquer diferença na apresentação clínica, gravidade clínica, alterações hematológicas e prognóstico, quando estiveram em causa os subtipos CPV2b, CPV2c, e nos casos de co-infecção CPV2b/2c.
- A pesquisa de antígeno de CPV nas fezes com a utilização dos testes rápidos (de utilização rotineira na prática clínica) demonstrou igual capacidade de detecção dos diferentes subtipos de vírus presentes nas amostras, significando que estes testes continuam a ser uma ferramenta útil no rastreio inicial da doença.
- A infecção simultânea de Parvovírus Canino com Coronavírus entérico canino foi detectada numa alta percentagem de infecções (41%). Esta associação esteve relacionada com um pior prognóstico. Estes resultados reforçam a importância da detecção da presença da co-infecção destes dois vírus (CPV e CCoV) para estabelecer um prognóstico, no caso de animais suspeitos de enterite vírica.

A infecção por CPV promove uma resposta inflamatória sistémica, com alterações hematológicas características. É comum observar-se leucopenia, linfopenia e neutropenia. Já anteriormente foi descrito que a linfopenia é mais severa que a neutropenia e a presença de anemia não é um achado constante (Parrish, 1995; McCaw and Hoskins, 2006).

- Neste estudo, determinou-se que as alterações hematológicas observadas em animais com infecção por CPV foram independentes do subtipo de vírus implicado.
- Registou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da quantidade de animais com leucopenia e anemia ao longo do curso clínico. A leucopenia

verificada foi devida a granulocitopenia, pois os animais em estudo não apresentaram uma linfopenia significativa, ao contrário do descrito por Parrish (1995) e McCaw and Hoskins (2006).

- Não foi possível estabelecer nenhuma associação entre as alterações hematológicas e o prognóstico (morte versus sobrevivência) dos animais em estudo.

A produção de anticorpos constitui o mecanismo de resposta imune específica contra a infecção por CPV, a qual começa a aumentar no 3º dia PI, atingindo o seu máximo cerca de 7 dias PI (McCaw e Hoskins, 2006).

- Os resultados deste estudo detectaram o aumento significativo ($P < 0,05$) do título de anticorpos ao longo do tempo de internamento, independentemente do subtipo de CPV envolvido. É a acção de anticorpos neutralizantes a responsável pelo término da virémia secundária (Guilford, 1996).
- Ao comparar o título de anticorpos dos animais infectados com determinado subtipo de CPV, utilizando o teste de IHA, com vírus homólogo ou heterólogo, não foi possível observar diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a titulação de anticorpos para vírus homólogo, da titulação de anticorpos para vírus heterólogo.

Estudos epidemiológicos do parvovírus canino e dos parvovírus de outras espécies, a nível mundial, permitem uma monitorização contínua do surgimento de novos subtipos, o que é essencial para a compreensão do percurso evolutivo do vírus e evitar o impacto negativo que as novas mutações podem implicar. A rápida dinâmica evolutiva pode favorecer a capacidade de disseminação do CPV pelos hospedeiros carnívoros (Shackelton et al., 2004).

- É, por conseguinte, fundamental acompanhar os casos de infecção por CPV no nosso país, nomeadamente com uma vigilância epidemiológica apertada e monitorização de novas alterações genotípicas que poderão estar relacionadas com novas expressões fenotípicas.
- A presença de co-infecções com vários subtipos de CPV e respectivo significado clínico não está totalmente esclarecido, sendo necessários mais estudos epidemiológicos onde se utilize uma amostragem maior para avaliação do seu impacto na prática clínica.
- O desenvolvimento de novas técnicas de caracterização molecular, mais eficientes e menos laboriosas para a detecção dos casos de co-infecção, deve ser priorizado.

A monitorização contínua dos subtipos existentes e sua caracterização é essencial e deve ser realizada em termos regionais, de forma a melhor compreender a virulência relativa, o impacto da vacinação, a alteração das características epidemiológicas, a relação com os países vizinhos e o padrão de distribuição mundial do CPV.

Imunoprofilaxia

A vacinação contra o CPV assume um papel muito importante nas estratégias de prevenção desta doença. Este assunto tem sido alvo de debate, nomeadamente sobre a decisão de quando iniciar a primovacinação dos cachorros, do número de reforços vacinais indicados na primovacinação, da necessidade de reforços anuais, da duração da imunidade após uma primovacinação correcta, do efeito de vacinas multivalentes nos valores hematológicos dos cachorros, do efeito da vacinação com uma determinada estirpe de CPV em relação à protecção contra a outras estirpes, entre outros.

O efeito das vacinas multivalentes, na alteração dos valores hematológicos, está pouco estudado e apresenta alguns dados contraditórios. Para poder avaliar de forma precisa as alterações hematológicas subsequentes à vacinação, é necessário saber quais os valores hematológicos considerados normais em cachorros até um ano de idade, visto que estes variam significativamente dos valores hematológicos dos animais adultos (McMichael, 2005). Existe ainda falta de informação sobre os valores hematológicos de referência, quando se utilizam os métodos de contagem celulares automáticos, e a informação existente resulta da utilização de populações pequenas de animais, com raças definidas e com o uso do método manual de contagem de células sanguíneas (Lumsden et al., 1979; Harper et al., 2003).

- No presente estudo, utilizando uma população de cães de várias raças, estabeleceram-se os valores hematológicos de referência em cachorros até um ano de idade, utilizando um contador automático de células sanguíneas. Os valores hematológicos variaram significativamente com o sexo e com a idade ($P < 0,05$), não tendo sido observada qualquer relação entre os parâmetros hematológicos e o peso dos animais.

Pouco se sabe sobre o efeito das vacinas multivalentes nos valores hematológicos dos cachorros e factos contraditórios têm sido publicados sobre o possível efeito

imunossupressor das vacinas multivalentes e seu efeito directo nas contagens de células sanguíneas (Philips et al., 1989; Strasser et al, 2003).

- Tendo utilizado como referência os valores hematológicos obtidos, avaliou-se, neste estudo, a resposta dos valores hematológicos em cachorros após os reforços com vacina multivalente na primovacinação e após o reforço anual com vacina multivalente, tendo-se verificado que a vacina multivalente induz a alterações significativas ($P < 0,05$) em alguns parâmetros hematológicos, no entanto, só após o primeiro reforço vacinal.

Phillips et al. (1989), associaram as vacinas multivalentes com um estado transitório de imunossupressão, contudo o papel desta imunossupressão nas falhas vacinais não foi estabelecido. Sabe-se que as falhas vacinais são mais comuns na primeira semana após a vacinação, o que é coincidente com a imunossupressão celular associada à vacina (Phillips et al., 1989).

- Os estudos realizados permitiram concluir que o primeiro reforço da primovacinação induz a uma diminuição significativa ($P < 0,05$) da contagem total de leucócitos, da contagem absoluta de linfócitos e da contagem de plaquetas. Apesar destas alterações serem transitórias, podem ser suficientes para potenciar ou permitir o aparecimento de doenças infecciosas que de outra forma podiam passar despercebidas.
- Verificou-se que os reforços subsequentes de vacina multivalente não originaram alterações nos valores hematológicos. A razão para estes resultados não está claramente estabelecida, mas pode dever-se ao efeito das imunizações anteriores, em que a presença de anticorpos pode prevenir uma resposta celular similar à que ocorre na primeira imunização.

As alterações envolvidas na resposta à vacinação devem ser compreendidas, pois podem potenciar a gravidade de uma doença simultânea ou permitir que infecções inaparentes se tornem clinicamente evidentes (Schultz, 1976; Potgieter et al., 1981; Phillips et al., 1989).

- Assim, a relação entre a diminuição da contagem celular resultante do primeiro reforço vacinal e uma imunossupressão clínica deve ser esclarecida.

Actualmente, a vacina mais utilizada na profilaxia da parvovirose canina é baseada na estirpe CPV2 (original). Uma das questões que tem sido discutida é a de saber se as mutações que originaram os diferentes subtipos de CPV

provocaram alterações na imunidade natural e induzida por vacinas. Alguns investigadores sugerem que as novas mutações podem diminuir a eficácia das vacinas actuais contra CPV, especialmente contra a nova variante CPV2c (Martella et al., 2004; Truyen, 2006).

- No estudo realizado sobre a eficácia de diferentes protocolos vacinais, a resposta serológica à vacinação foi significativamente mais elevada ($P < 0,05$) quando foi utilizado o vírus homólogo da vacina (CPV2) e significativamente menor quando usada uma combinação de CPV2b/CPV2c nos testes de Inibição da Hemaglutinação.
- Também se detectou uma taxa de seroconversão inferior, quando usadas as estirpes de campo nos testes de IHA, comparativamente às taxas de seroconversão com o CPV2 como antígeno neste teste.

Esta observação já tinha sido descrita por Pratelli et al., 2001, usando testes de seroneutralização. A importância deste facto em termos clínicos e de protecção cruzada efectiva é desconhecida, no entanto, leva a sugerir que poderia existir uma vantagem no uso de novas vacinas com estirpes de campo.

- Numa perspectiva de futuro e num país em que os casos de parvovirose canina que resultam de co-infecções assumem uma incidência elevada (Vieira et al., 2011), deve ser levada em consideração a sugestão de que as vacinas devem ser elaboradas de acordo com as estirpes mais prevalentes de cada país, sendo que no nosso país poderá mesmo haver uma vantagem do uso de mais de uma estirpe de campo nas formulações das vacinas contra CPV.

A determinação do título de anticorpos por técnicas de IHA é usada de forma rotineira para aferir o título de anticorpos contra CPV. A avaliação destes títulos é útil para estabelecer o grau de imunidade frente à infecção, pois existe uma correlação directa entre estes e o grau de imunidade contra CPV (Coyne, 2000 e Pratelli et al., 2001). Usualmente é utilizado o subtipo CPV2 como antígeno no teste de IHA, apesar de existirem alguns estudos que utilizam estirpes de campo como antígeno.

- Foram avaliados os títulos de anticorpos numa mesma amostra pelo método de IHA, utilizando os diferentes subtipos de CPV. Observou-se que um título protector, quando usado o CPV2 no teste de IHA, pode corresponder a um título não protector, quando usado um vírus de campo

no teste de IHA. Quando se usa o vírus vacinal no teste de IHA, podemos estar a sobrestimar o nível de protecção desse animal.

Segundo Schultz et al. (2010), o título mínimo de anticorpos necessário para conferir protecção contra a exposição experimental com CPV2 deve ser $> 1:80$, aplicando o método de IHA, em cães com anticorpos maternos, tendo estes valores sido definidos com a utilização do subtipo CPV2 como antigénio no teste de IHA.

- Com a não existência do subtipo CPV2 em circulação, a técnica de IHA deve ser padronizada para os vários subtipos de vírus existentes. Foram determinadas respostas diferentes na concentração de anticorpos específicos em determinadas amostras, que dependeram do tipo de vírus utilizado no teste. É necessário estabelecer se estas variações se reflectem em diferenças de protecção contra as infecções de campo.

Sendo a interferência dos anticorpos maternos uma das principais causas de falha da vacinação em animais jovens (Pollock e Carmichael, 1982; O'Brien et al, 1996), os resultados deste estudo indicaram que:

- Todos os animais apresentavam anticorpos maternos na altura do primeiro reforço vacinal. A média dos anticorpos maternos era menor nos animais com 12 semanas, comparativamente aos animais com 8 semanas. Apesar deste resultado, não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) nas percentagens de seroconversão entre animais com 8 semanas e animais com 12 semanas, sendo que às 16 semanas a percentagem de animais que seroconverteu após a vacinação era próxima dos 100%. Estes resultados sugerem que, independentemente da data de início do protocolo de primovacinação, às 16 semanas de idade, a vacina consegue ultrapassar o efeito negativo da presença de anticorpos maternos.
- Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os protocolos usados (dois versus três reforços vacinais), mas as percentagens de seroconversão são superiores, quando o último reforço vacinal ocorre às 16 semanas, quando comparadas com o último reforço às 12 semanas. Este achado vai de encontro às actuais recomendações de vacinação canina que sugerem que a última dose de uma vacina nuclear na primovacinação deve ser realizada pelo menos às 14 semanas de idade ou mais tarde (Schultz, 2006).

- Aos 6 meses de idade e independentemente do protocolo utilizado, a vacinação induziu uma protecção em 98% dos animais do estudo que se prolongou durante um ano. Após o reforço multivalente anual, 100% dos animais do estudo tinham anticorpos protectores.

A vacinação não deve ser considerada um procedimento inócuo. Assim, deve ser realizada de forma individualizada, sendo que cada animal é um caso e o protocolo de vacinação deve ser avaliado de forma única, tendo em conta variáveis como a idade, o grau de risco de exposição, o ambiente em que vive, o tipo de proprietários que possui, etc. A verdade é que a optimização dos esquemas de vacinação deveria basear-se na realização de avaliações serológicas prévias a cada reforço vacinal, de forma a avaliar o título de anticorpos do animal e evitar a sobrestimulação do sistema imunitário e gastos económicos desnecessários aos proprietários. A aplicação prática, enquanto objectivo a alcançar, apresenta-se ainda longínqua, não só pelas determinantes económicas que acarreta, mas também, porque em termos técnicos, é difícil aferir o grau de protecção para todas as doenças infecciosas contra as quais, de forma rotineira, as vacinas multivalentes conferem protecção.

CAPÍTULO IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmagid O, Larson L, Payne L, Tubbs A, Wasmoen T, Schultz R, 2004. "Evaluation of the efficacy and duration of immunity of a canine combination vaccine against virulent parvovirus, infectious canine hepatitis virus, and distemper virus experimental challenges". *Veterinary Therapeutics* 5:173-186.
- Afonina I, Zivarts M, Kutayavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer R, 1997. "Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder". *Nucleic Acids Research* 25(13):2657-2660.
- Appel M, Carmichael L, 1987. "Can a commercial vaccine protect pups against a recent isolate of canine parvovirus?" *Veterinary Medicine* 10:1091-1093.
- Apple M, 1988. "Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection?" *Veterinary Medicine* 36:360-366.
- Battilani M, Bassani M, Forti D, Morganti L, 2006. "Analysis on the evolution of feline parvovirus (FPV)". *Veterinary Research Communications* 30:223-226.
- Battilani M, Gallina L, Vaccari F, Morganti L, 2007. "Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV2)". *Veterinary Research Communications* 31(1): 209-212.
- Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S, 2011. "Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats". *Veterinary Research* 42 doi: 10.1186/1297-9716-42-43 (In press).
- Bienenstock J, Befuo A, 1980. "Mucosal immunology". *Immunology* 41: 249-270.
- Brenner J, Markus R, Klopfer-Orgad U, Trainin Z, 1989. "The possible enhancement of parvovirus vaccination on the mortality rate of disease dogs". *Journal of Veterinary Medicine Series B* 36:547-550.
- Bruner C, Swango L, 1993. "Canine Parvovirus Infection: Effects on the immune system and factors that predispose to severe disease". In: Burrows, C.F. (ed) *Gastroenterology in Practice. The Compendium Collection*: 289-298.

- Buonavoglia C, Tollis M, Buonavoglia D, Puccini A, 1992. "Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine". *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 15(4):281-283.
- 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 type 2 in Italy". *Journal of General Virology* 82:3021-3025.
- Calderon M, Mattion N, Bucafusco D, Fogel F, Remorini P, La Torre J, 2009. "Molecular characterization of the pathogenic variant CPV 2c in vaccinated dogs". *Journal of Virological Methods* 159:141-145.
- Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J, 2004. "Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples". *Journal of Virology* 78(22):12169-12178.
- Carmichael L, Joubert M, Pollock R, 1980. "Hemagglutination by Canine Parvovirus: serologic studies and diagnostic applications". *American Journal of Veterinary Research* 41(5):784- 791.
- Carmichael L, Joubert J, Pollock R, 1981. "A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. 1- Viral attenuation and dog response". *The Cornell Veterinary Journal* 71:408-427.
- Carmichael L, Joubert J, Pollock R, 1983. "A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response". *The Cornell Veterinarian* 73(1):13-29.
- Carmichael L, 1983. "Immunization strategies in puppies - why failures? Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 5:1043-1052.
- Carmichael L, 1999. "Canine viral vaccines at a turning point - a personal perspective". *Advances in Veterinary Medicine* 41:289-307.
- Carmichael L, 2005. "An annotated historical account of canine parvovirus". *Journal of Veterinary Medicine Series B* 52:303-311.
- Carrigan S, Scott G, Tabrizian M, 2004. "Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis". *Clinical Chemistry* 50:1301-1314.

- Casseb A, Casseb L, Vieira C, Camargo D, Molnár L, Molnár LE, 2009. "Diagnóstico da Parvovirose Canina pela Técnica de Hemaglutinação". *Revista de Ciências Agrárias* 51:83-98.
- Céron J, Eckersall P, Martínez-Subiela S, 2005. "Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives". *Veterinary Clinical Pathology* 34 (2):85-99.
- Chang S, Sgro J e Parrish C, 1992. "Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties". *Journal of Virology* 66(12):6858:6867.
- Chapman M, Rossmann G, 1995. "Single -Stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus". *Current Biology* 3(2):151-162.
- Ciarlini P, Patrício R, Couto R e Bonello F, 2004. "Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães". *Arquivos do Instituto Biológico* 71:323-327.
- Costa A, Leite J, Labarthe N, Garcia R, 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(8):735-43.
- Cotmore S, Tattersall P, 1996. "Parvovirus DNA Replication" in Melvin L (ed), *DNA Replication in Eukaryotic Cells*. Cold Spring Harbor Monograph Series, USA. Cap 31: 799-813.
- Cotmore S, Tattersall P, 2007. "Parvoviral host range and cell entry mechanisms". *Advances in Virus Research* 70:183-232.
- Coyne M, 2000. "Seroconversion of puppies to Canine Parvovirus and Canine Distemper Virus: A comparison of two combination vaccines". *Journal of the American Animal Hospital Association* 36:137-42.
- Dattee V, Imbert S, Bonin J, 1999. "Estudio sobre la erradicación de dos focos de parvovirosis canina: utilización de una vacuna a base de antígeno

concentrado”. Consulta Difusión Veterinaria 59(7):61-64.

Day M, Horzineck M, Schultz D, 2007. “Guidelines for vaccination of dogs and cats”. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). Journal of Small Animal Practice 48.

Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci D, Lorusso E, Buonavoglia C, 2005a. “Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant”. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 17:133-138.

Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani L, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C, 2005b. “A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs” Veterinary Microbiology 105:19-28.

Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Lucente M, Belaccio A e Buonavoglia C, 2005c. “New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains”. Journal of Veterinary Medicine Series B 52:316-319.

Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, Cirone F, Lorusso E, Lucente M, Narcisi D, Scalia P, Buonavoglia C, 2006a. “Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology”. Journal of Virological Methods 133:92-99.

Decaro N, Elia G, Desario C, Roperto S, Martella V, Campolo M, Lorusso A, Cavalli A, Buonavoglia C, 2006b. “A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus”. Journal of Virological Methods 136:65-70.

Decaro N, Martella V, Desario C, Bellacicco A, Camero M, Manna L, D’Aloja D, Buonavoglia C, 2006c. “First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain”. Journal of Veterinary Medicine Series B 53:468-472.

Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martello V, Buonavoglia C, 2007a. “Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma”. Vaccine

- 25:1161-1166.
- Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni M, Lorusso A, Buonavoglia C, 2007b. "Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs". *Veterinary Microbiology* 121:39-44.
- Decaro N, Desario C, Addie D, Martello V, Vieira M, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C, 2007c. "Molecular Epidemiology of canine parvovirus, Europe". *Emerging Infectious Disease* 13(8):1222-1224.
- Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C, 2008. "Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c". *New Microbiologica* 31: 125-130.
- Decaro N, Desario C, Billi M, Mari V, Elia G, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C, 2009. "Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs". *The veterinary Journal*, 187:195-199.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C, 2005. "Canine parvovirus infection: wich diagnostic test for virus?" *Journal of Virological Methods* 126:179-185.
- Dhein R, Gorham J, 1986. "Host response to vaccination". *Veterinary Clinics of North American, Small Animal Practice* 16:1227-1245.
- Esfandiari J, Klingeborn B, 2000. "A comparative study of a new rapid one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink". *Journal of Veterinary Medicine Series B* 47:145-153.
- Fenner J, Gibbs E, Murphy F, Rott R, Studdert M, White D, 1993. "Parvoviridae" in *Veterinary Virology*, Academic Press 2^a edition, San Diego, USA. Chapter 16: 307-319.
- Filipov C, Decaro N, Desario C, Amorisco F, Sciarretta R, Buonavoglia C, 2011. "Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23:152-154.
- Glickman L, Domanski L, Patronek G e Visintainer F, 1985. "Breed-related risk factors

- for canine parvovirus enteritis". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187(6):589-94.
- Goddard A, Leisewitz A, Christopher M, Duncan N, Becker P, 2008. "Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis". *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22(2):3009-16.
- Gogos C, Droosou E, Bassaris H, Skoutelis A, 2000. "Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options". *Journal of Infectious Diseases* 181:176-180.
- Gordon J, Angrick E, 1988. "Canine parvovirus: Environmental effects on infectivity". *American Journal of Veterinary Research* 47(7):1464-1467.
- Gore T, Lakshmanam N, Duncan K, Coyne M, Lum M, Sterner F, 2005. "Three-Year duration of immunity in dogs following vaccination against canine adenovirus type-1, canine parvovirus, and canine distemper virus". *Veterinary Therapeutics* 6(1):5-14.
- Govindasamy L, Hueffer K, Parrish C, Agbandje-McKenna M, 2003. "Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvovirus and mutants". *Journal of Virology* 77(22):12211-12221.
- Greene C, Schultz R, 2006. "Immunoprophylaxis" in: Greene, CE (ed.) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders, 3ª Ed, Missouri, USA. Cap 100.
- Greenwood N, Chalmers W, Baxendale W, Thompson H, 1995. "Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains". *Veterinary Record* 136:63-67.
- Guilford W, 1996. "Gastrointestinal Tract Infections, Parasites and Toxicoses" in: Guilford W, Strombeck D, Williams D e Meyer D (ed). *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, WB Saunders 3ª edição, Philadelphia, USA. Cap 21:411-432.
- Harbinson C, Chiorini A, Parrish C, 2008. "The Parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus". *Trends in Microbiology* 16(5):208-214.
- Harper E, Hackett R, Wilkinson J, Heaton P, 2003. "Age-related variations in

- hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador retrievers". *Journal of American Veterinary Medical Association* 223:1436-1442.
- Hoelzer K, Shackelton L, Parrish C, Holmes E, 2008a. "Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of canine parvoviruses". *Journal of General Virology* 89:2280-2289.
- Hoelzer K, Shackelton L, Holmes E, Parrish C, 2008b. "Within host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats". *Journal of Virology* 82(22):11096-11105.
- Hoelzer K e Parrish C, 2010. "The emergence of parvoviruses of carnivores" *Veterinary Research* 41:39.
- Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo M, Sanchez S, Buonavoglia C, Saliki J, 2007. "Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19:535-539.
- Horiuchi M, Mochizuki M, Ishiguro N, Nagasawa H, Shinagawa M, 1997. "Epitope mapping of monoclonal antibody specific to feline panleukopenia virus and mink enteritis virus". *Journal of Veterinary Medical Science* 59(2):133-136.
- Houston D, Ribble C, Head L, 1996. "Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991)". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208(4):542-546.
- Hueffer K, Parrish R, 2003. "Parvovirus host range, cell tropism and evolution". *Current Opinion in Microbiology* 6(4):392-398.
- Hueffer K, Parker J, Weichert W, Geisel R, Sgro J, Parrish C, 2003. "The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor". *Journal of Virology* 77(3):1718-1726.
- Human Virology at Stanford, 2005. Data de acesso: 05 de Setembro de 2010. Disponível em: <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Parvoviruses.html>
- Humm K e Hughes D, 2009. "Canine Parvovirus Infection" in: Silverstein D, Hopper K

- (eds). Small Animal Critical Care, Saunders Missouri, USA. Cap 112:482-485.
- Hurtado A, Rueda P, Nowicky J, Sarraseca J, Casal I, 1996."Identification of domains in canine parvovirus VPE essential for the assembly of virus-like particles". Journal of Virology 70(8):5422-5429.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of virus – Virology Division IUMS. Virus Taxonomy List 2009. Data de acesso: 28 de Agosto de 2010. Disponível em: <http://ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>
- ICTVdB Management, 2006. Parvoviridae. In: *ICTVdB*, "The Universal Virus Database" version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mochizuki M, 2002. "Feline host range of *Canine parvovirus*: Recent emergence of new antigenic types in cats". Emerging Infectious Diseases 8(4):341-346.
- Jeoung S, Ahn S, Kim D, 2008. "Genetic analysis of VP2 gene of canine Parvovirus isolates in Korea". Journal of Veterinary Medical Science 70(7):719-722.
- Johnson B, Castro A, 1984. "Isolation of canine parvovirus from a dog brain with severe necrotizing vasculitis and encephalomalacia". Journal of American Veterinary Medical Association 184:1398-1399.
- Kalli I, Leontides L, Mylonakis M, Adamama-Moraitou, Rallis T, Koutinas A, 2010. "Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection". Research in Veterinary Science 89:174-178.
- Kapil S, Cooper E, Lamm C, Murray B, Rezabek G, Johnston L, Campbell G, Johnson B, 2007. "Canine parvovirus type 2c and 2b circulating in North American Dogs in 2006 and 2007". Journal of Clinical Microbiology 45(12):4044-4047.
- Kennedy M, Mellon V, Caldwell G, Potgieter L, 1995. "Virucidal efficacy of the newer quaternary ammonium compounds". Journal of the American Animal Hospital Association 31(3):254-258.
- Kjelgaard-Hansen M, Luntang-Jensen M, Wilesen J, Jensen A, 2007."Measurement of serum interleukin-10 in the dog". The Veterinary Journal 173:361-365.
- Kogika M, Pereira D, Elias F, Notomi M, Delayte E, Kawahara R, Hagiwara M, 2003.

- “Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e acid- α - glycoprotein in dogs with haemorrhagic gastroenteritis”. *Ciência Rural*, 33(3):513-517.
- Kok J, Wiegerinck E, Giesendorf B, Swinkels D, 2002. “Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MBGprobes)”. *Human Mutation* 19:554-559.
- Krakowka S, Olsen R, Axthelm M, Rice J, Winters K, 1982. “Canine parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified-live-virus vaccine”. *Journal of American Veterinary Medical Association* 180:137-139.
- Kumar M, Nandi S, 2010. “Development of a Sybergreen based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples”. *Journal of Virological Methods* 169:198-201.
- Kutyavin I, Afonina A, Mills A, Gorn V, Lukhtanov E, Belousov E, Singer M, Walburger D, Lokhov S, Gall A, Dempcy R, Reed M, Meyer R, Hedgpeth J, 2000. “3´-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures”. *Nucleic Acids Research* 28(2):655-661.
- Lacheretz A, Laperrousaz C, Kodjo A, Brajon N, Crevat D, Guillosoy S, 2003. “Diagnosis of canine parvovirus by rapid immunomigration on a membrane”. *The Veterinary Record* 152:48-50.
- Lamm C, Rezabek G, 2008. “Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals”. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 38: 837-850.
- Larson L, Schultz R, 2008. “Do two current canine parvovirus type 2 and type 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant?” *Veterinary Therapeutics* 9:94-101.
- Lenghaus C, Studdert M, 1984. “Acute and chronic viral myocarditis”. *American Journal of Pathology* 115:316-319.
- Lobetti R, 2003. “Canine Parvovirus and Distemper”. *Proceedings of the 28th Worlds Congress of the World Small Animal Association*. Thailand. Data de Acesso: 25 de Fevereiro de 2011. Disponível em:
- <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6671&O=Generic>

- Lumsden J, Mullen K, McScherry B, 1979. "Canine hematology and biochemistry reference values". *Canadian Journal of Comparative Medicine* 43:125-131.
- Macartney L, McCandlish I, Thompson, Cornwell H, 1984a. "Canine parvovirus enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection". *Veterinary Record* 115:201-210.
- Macartney L, McCandlish I, Thompson H, Cornwell H, 1984b. "Canine parvovirus enteritis 2: pathogenesis". *Veterinary Record* 115:453-460.
- Macintire D, Smith-Carr S, 1997. "Canine parvovirus, Part II Clinical signs, diagnosis and treatment". *Compendium of Continued Education for the Practicing Veterinary* 19(3):291-299.
- Mann F, Boon G, Wagner-Mann C, Ruben D, Harrington D, 1998. "Ionized and total magnesium concentrations in blood from dogs with naturally acquired parvoviral enteritis". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212(9):1398-401.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C, 2004. "A canine parvovirus mutant is spreading in Italy". *Journal of Clinical Microbiology* 42(3):1333-1336.
- Martella V, Cavalli A, DDecaro N, Elia G, Desario C, Campolo M, Bozzo GG, Tarsitano E, Buonavoglia C, 2005. "Immunogenicity of na intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b in pups with maternally derived antibodies". *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12 (10):1243-1245.
- Mathys A, Mueller R, Pedersen N, Theilen H, 1983. "Comparison of hemagglutination and competitive enzyme linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces". *America Journal of Veterinary Research* 44:152-154.
- McCaw, D, Hoskins J, 2006. "Canine Viral Enteritis" in: Greene, C. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, WB Saunders 3ª edição, Philadelphia, USA. Cap 8: 63-71.
- McDonald L, 1992. "Factors that can undermine the success of routine vaccination

- protocols". Veterinary Medicine 87:223-230.
- McMichael M, 2005. "Pediatric Emergencies". Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice 35:421-434.
- Meers J, Kyaw-Tanner M, Bensink Z, Zwijnenberg R, 2007. "Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia". Australian Veterinary Journal 85(10):392-396.
- Meunier P, Cooper B, Appel M, Slauson D, 1984. "Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups". Veterinary Pathology 21:509-515.
- Meunier P, Cooper B, Appel M, Lanieu M, Slauson D, 1985a. "Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies". Veterinary Pathology 22:617-624.
- Meunier P, Cooper B, Appel M e Slauson D, 1985b. "Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia". Veterinary Pathology 22:60-71.
- Miyamoto T, Taura, Y, Une S, Yoshitake M, Nakama S, Watanabe S, 1995. "Immunological responses to multivalent canine vaccines in dogs". Journal of Veterinary Medical Science 57:347-349.
- Mochizuki M, Hida S, Hsuan S, Sato H, 1984. "Fecal examination for diagnosis of canine parvovirus infection". Journal of Veterinary Science 46:587-591.
- Mochizuki M, Hashimoto M, Ishida T, 2001. "Recent Epidemiological status of canine viral enteric infections and *Giardia* infections in Japan". Journal of Veterinary Medical Science 63(5):573-575.
- Mohan Raj J, Mukhopadhyay H, Thanislass J, Antony P, Pillai R, 2010. "Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus". Infection, Genetics and Evolution 10:1237-1241.
- Moon H-S, Lee S-A, Lee S-G, Choi R, Jeoung S-Y, Kim D, Hyun C, 2008. "Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates". Veterinary Microbiology 131:47-56.
- Nakamura M, Nakamura K, Miyazawa T, Tohya Y, Mochizuki M, Akashi H, 2003. "Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of *Canine*

- parvovirus*". Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10:1085-1089.
- Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung H, Nguyen N H, Huynh L, Nguyen L, Nguyen P N, Nguyen P V, Nguyen N P, Akashi H, 2004. "A novel variant of *canine parvovirus* from a Vietnamese dog". Archives of Virology 149:2261-2269.
- Nandi S, Chidri S, Kumar M, 2009. "Molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus isolate in India". Veterinari Medicina 54:483-490.
- Ntafis V, Xylouri E, Kalli I, Desario C, Mari V, Decaro N, Buonavoglia C, 2010. "Characterization of canine parvovirus 2 variants circulating in Greece". The Veterinary Record 167:196-201.
- O'Brian S, Roth J, Hill B, 1986. "Response of puppies to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine". Journal of the American Veterinary Medical Association 188:699-701.
- O'Brien S, 1994. "Serologic response of pups to the low-passage, modified-live canine parvovirus-2 component in a combination vaccine". Journal of the American Veterinary Medical Association 204(8):1207-1209.
- Ohshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M, 2008. "Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan". Journal of Veterinary Medical Science 70 (8):769-775.
- Oliveira J, 2001. "Enterite por Parvovirus Canino". Dissertação elaborada com vista à obtenção do Grau de Licenciatura em Medicina Veterinária pelo Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.
- Otto C, Drobatz K, Soter C, 1997. "Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis". Journal of Veterinary Internal Medicine 11:65-70.
- Otto C, Jackson C, Rogell E, Prior R, Ammons W, 2001. "Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) for treatment of parvovirus enteritis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial". Journal of Veterinary Internal Medicine 15:355-360.
- Palermo L, Hueffer K, Parrish C, 2003. "Residues in the apical domain of the feline and

- canine transferring receptors control host-specific binding and cell infection of canine and feline parvoviruses". *Journal of Virology* 77(16):8915-8923.
- Paludan S, 1998. "Interleukin-4 and interferon- γ : the quintessence of a mutual antagonistic relationship". *Scandinavian Journal of Immunology* 48:459-468.
- Paradiso P, Rhode S, Singer I, 1982. "Canine Parvovirus: a Biochemical and Ultrastructural Characterization". *Journal of General Virology* 62:113-125.
- Park J, Choi B, Vijayachandran L, Ayyappan V, Chong C, Lee K, Kim S, Choi C, 2007. "Immunodetection of Canine Parvovirus (CPV) in clinical samples by polyclonal antisera against CPV-VP2 protein expressed in *Escherichia coli* as an antigen". *Journal of Virological Methods* 146:281-287.
- Parker J, Parrish C, 1997. "Canine Parvovirus host range is determined by specific conformation of an additional region of the capsid". *Journal of Virology* 71(12):9214-9222.
- Parrish C, Carmichael L, 1983. "Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus". *Virology* 148:121-132.
- Parrish C, 1990. "Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses". *Advances in Virus Research* 38:403-450.
- Parrish C, Aquandro C, Strassheim M, Evermann J, Sgro J, Mohammed H, 1991. "Rapid antigenic-type replacement and DNA sequences evolution of canine Parvovirus". *Journal of Virology* 65(12):6544-6552.
- Parrish C, 1995. "Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus". *Baillière's Clinical Haematology* 8(1):57-71.
- Parrish C, 1999. "Host range relationships and the evolution of canine parvovirus". *Veterinary Microbiology* 69:29-40.
- Paul M, Carmichael L, Childers H, Cotter S, Davidson A, Ford R, Hurley K, Roth J, Schultz R, Thacker E, Welborn L, 2006. "2006 AAHA Canine vaccine guidelines, revised" Report of the American Animal Association (AAHA) canine vaccine task force.

- Pereira C, Monezi T, Mehnert D, D'Angelo M, Durigon E, 2000. "Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polimerase chain reaction assay". *Veterinary Microbiology* 75: 197-200.
- Pereira C, Leal E, Durigon E, 2007. "Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus". *Infection, Genetics and Evolution* 7(3):399-409.
- Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernnández M, 2007. "First detection of canine parvovirus type 2c in South America". *Veterinary Microbiology* 124:147-152.
- Phillips T, Schultz R, 1992. "Canine and Feline Vaccines" in: Kirk, R e Bonagura, J (Eds.). *Current Veterinary Therapy XI*. WB Saunders, Philadelphia, USA. pp 202-206.
- Phillips T, Jensen J, Rubino M, Yang W, Schultz R, 1989. "Effects of vaccines on canine immune system". *Canadian Journal of Veterinary Research* 53: 154-160.
- Pollock R, Carmichael L, 1982. "Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180(1):37-42.
- Pollock R, Carmichael L, 1983. "Canine viral enteritis". *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 13(3):551-566.
- Pollock R, Carmichael L, 1990. "Canine Viral Enteritis" in: Greene, CE (ed.) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. WB Saunders, Philadelphia, USA. Cap. 21: 268-279.
- Potgieter L, Jones J, Patton C, Webb-Martin T, 1981. "Experimental parvovirus infection in dogs". *Canadian Journal of Comparative Medicine* 45:212-216.
- Pratelli A, Tempesta M, Roperto F, Sagazio P, Carmichael L, Buonavoglia C, 1999. "Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11:550-553.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael L, Buonavoglia C, 2001. "Canine parvovirus (CPV) vaccination: Comparison of neutralizing

- antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine". *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:612-615.
- Prittie J, 2004. "Canine Parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention". *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 14(3):167-176.
- Qin Q, Loeffler I, Li M, Tian K, Wei F, 2007. "Sequence analysis of a canine parvovirus isolated from a red panda (*Ailurus fulgens*) in China". *Virus Genes* 34(3):299-302.
- Reed A, Jones E, Miller T, 1988. "Nucleotide sequence and genome organization of Canine Parvovirus". *Journal of Virology* 62(1):266-276.
- Rice J, Winters K, Krakowka S, Olsen R, 1982. "Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis". *Infection and Immunity* 38(3):1003-1009
- Robinson W, Huxtable C, Pass D e Howell J, 1979. "Clinical and electrocardiographic findings in suspected viral myocarditis of pups" *Australian Veterinary Journal* 55(8):351-355.
- Robinson W, Wilcox G, Flower R, 1980. "Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis". *Veterinary Pathology* 17:589-599.
- Sagazio P, Tempesta M, Buonavoglia D, De Palma M, Buonavoglia C, 1998."Antigenic relationship between CPV2 and CPV2b: results of a serological study" p. 43. *Proceedings of the 1st International Meeting, Virology of Carnivores, Utrecht, Holanda.*
- Sakulwira K, Oraveerakul K, Poovorawan Y, 2001. "Detection and genotyping of canine parvovirus in enteric dogs by PCR and RFLP". *Science Asia* 27:143-147.
- SASInstitute, 1989. *SAS/STAT User's Guide, Version 6. Vol. 2. Fourth ed.* SAS Institute, Inc.
- Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel HJ, Neiger R, 2009. "Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction". *Journal of Veterinary Diagnostic*

Investigation 21:344-345.

- Schoeman J, Goddard A, Herrtage M, 2007. "Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea". *Journal of American Veterinary Medical Association* 231(10):1534-1539.
- Schroder K, Hertzog P, Ravasi T, Hume D, 2004. "Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions". *Journal of Leukocyte Biology* 75:183-189.
- Schultz R, 1976. "Failure of attenuated canine distemper virus (Rockborn strain) to suppress lymphocyte blastogenesis in dogs". *The Cornell Veterinarian* 66:27-31.
- Schultz D, Arnold P, 1990. "Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein and fibrinogen". *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 20(3):129-147.
- Schultz R, 1998. "Current and future canine and feline vaccination programs". *Veterinary Medicine* 93:233-254.
- Schultz R, 2006. "Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review". *Veterinary Microbiology* 117:75-79.
- Schultz R, Thiel B, Mukhtar E, Sharp P, Larson L, 2010. "Age and long-term protective immunity in dogs and cats". *Journal of Comparative Pathology* 142:102-108.
- Scwartz D, Green B, Carmichael L, Parish C, 2002 "The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus". *Virology* 302(2):219-223.
- Senda M, Parrish C, Harasawa R, Gamoh K, Muramatsu M, Hirayama N, Itoh O, 1995. "Detection by PCR of wild-type Canine Parvovirus wich contaminates dog vaccines". *Journal of Clinical Microbiology* 33:110-113.
- Shackelton L, Parrish C, Truyen U, Holmes E, 2005. "High rate of viral evolution associated with the emergence of canine parvovirus". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(2):379-384.
- Shackelton L, Hoelzer K, Parrish C, Holmes E, 2007 "Comparative analysis reveals

- frequent recombination in the parvoviruses". *Journal of General Virology* 88:3294-3301.
- Sherding R, 1996. "Virus intestinales" in: Birchard, S; Sherding, R. (eds) *Manual Clínico de Pequenas Especies*. McGraw Hill Interamericana 1ª Edição, Espanha. Cap 7:129-137.
- Simpson A, Hébert B, Sullivan G, Parrish C, Zádori Z, Tijssen P, Rossmann M, 2002. "The structure of Porcine Parvovirus: Comparison with related viruses". *Journal of Molecular Biology* 315:1189-1198.
- Smith-Carr S, Macintire D, Swango L, 1997. "Canine Parvovirus, Part I Pathogenesis and Vaccination". *Compendium of Continued Education for the Practicing Veterinary* 19(2):125-133.
- Spitzer A, Parrish C, Maxwell I, 1997. "Tropic determinant for canine parvovirus and feline panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2". *Journal of General Virology* 70:925-928.
- Steinel A, Venter E, Van Vuuren M, Parrish C, Truyen U, 1998. "Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in Southern Africa". *Journal of Veterinary Research* 65(4):239-42.
- Steinel A, Munson L, Vuuren M, Truyen U, 2000. "Genetic characterization of feline parvovirus sequence from various carnivores". *Journal of General Virology* 81:345-350.
- Steinel A, Parrish C, Bloom M e Truyen U, 2001. "Parvovirus Infections in Wild Carnivores". *Journal of Wildlife Diseases* 37(3):594-607.
- Strasser A, Thomsen M, 1990. "Effects of different proinflammatory mediators on canine neutrophil chemotaxis and aggregation". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 25:209-217.
- Strasser A, May B, Teltscher A, Wistrela E, Nierdemuller H, 2003. "Immune modulation following immunization with multivalent vaccines in dogs". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94:113-121.
- Streck A, Souza C, Gonçalves K, Zang L, Pinto L, Canal C, 2009. "First detection of

- canine parvovirus type 2c in Brazil". *Brazilian Journal of Microbiology* 40:465-469.
- Streck A, 2009. "Detecção e caracterização de amostras de parvovírus suíno" Dissertação com vista à obtenção do grau de Mestre – Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Faculdade de Medicina Veterinária. Brasil.
- Strottmann D, Scortegagna G, Kreutz L, Barcellos L, Frandoloso R, Anziliero D, 2008. "Diagnóstico e estudo serológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil". *Ciência Rural* 38(2):400-405.
- Swango L, 1983. "Frequently asked questions about CPV disease". *Norden News* 58:4-10.
- Timoney J, Gillespie J, Scott F, Barlough J, 1992. "The parvoviridae" in: Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*, Cornell University press, 8ª Edição, USA. Cap. 41:501-521.
- Touihri L, Bouzid I, Daound R, Desario C, Goulli A, Decaro N, Ghorbel A, Buonavoglia C, Bahloul C, 2009. "Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia". *Virus Genes* 38:249-258.
- Truyen U, Parrish C, 1992. "Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo". *Journal of Virology* 66(9):5399-5408.
- Truyen U, Gruenberg A, Chang S, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish C, 1995. "Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo". *Journal of Virology* 69(5):4702-4710.
- Truyen U, Platzer G, Parrish C, 1996. "Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany". *Veterinary Record* 138(15):365-366.
- Truyen U, Geissler K, Parrish C, Hermanns W e Siegl G, 1998a. "No evidence for a role of modified live virus vaccine in the emergence of canine parvovirus". *Journal of General Virology* 79:1153-1158.

- Truyen U, Mueller T, Heidrich R, Tackmann K, Carmichael L, 1998b. "Survey in viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus". *Epidemiology and Infection* 121:433-440.
- Truyen U, 2006. "Evolution of canine parvovirus: a need for new vaccines?". *Veterinary Microbiology* 117:9-13.
- Tsao J, Chapman M, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith T, Rossmann M, Compans R, Parrish C, 1991. "The three dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications". *Science* 251:1456-164.
- Turiso J, Córtes E, Martínez C, Ybáñez R, Simarro I, Vela C, Casal I, 1992. "Recombinant vaccine or canine parvovirus in dogs". *Journal of Virology* 66(5):2748-2753.
- Twark L, Dodds J, 2000. "Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs". *Journal of American Veterinary Medical Association* 217(7):1021-1024.
- Url A, Truyen U, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Schmidt P, 2003. "Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats". *Journal of Clinical Microbiology* 41(8):3801-3805.
- Valasek M, Repa J, 2005. "The power of real-time PCR". *Journal of Applied Physiology* 29:151-159.
- Vieira M, Silva, E, Desario C, Decaro N, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008a. "Natural co-infection with 2 parvovirus variants in dog". *Emerging Infectious Disease* 14(4):678-679.
- Vieira M, Silva E, Oliveira O, Vieira A, Decaro N, Desario C, Muller A, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008b "Canine parvovirus 2c infection in central Portugal". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:488-491.
- Vieira M, Silva E, Oliveira J, Vieira A, Carvalheira J, Thompson G, 2011. "Parvovirose Canina em Portugal". *Veterinary Medicine (In Press)*
- Vihinen-Ranta M, Suikkanen S, Parrish C, 2004. "Pathways of cell infection by

parvoviruses and adeno-associated virus". *Journal of Virology* 78:6709-6714.

Viral Zone. Data de acesso: 30 de Agosto de 2010. Disponível em :

http://expasy.org/viralzone/all_by_species/199.html.

Waner T, Naveh A, Wudovsky I, Carmichael L, 1996. "Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8:427-432.

Wang D, Yuan W, Davis I, Parrish C, 1998. "Nonstructural protein-2 and replication of Canine Parvovirus". *Virology* 240:273-281.

Weiss J, Evanson A, Sykes J, 1999. "A Retrospective Study of Canine Pancytopenia". *Veterinary Clinical Pathology* 28(3): 83-88.

Willwand K, Hirt B, 1991. "The minute of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: Mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting". *Journal of Virology* 65(9):4629-4635.

Xie Q, Chapman M, 1996. "Canine Parvovirus capsid structure, analyzed at 2,9 Å resolution". *Journal of Molecular Biology* 264(3):497-520.

Yule T, Roth M, Dreier K, Johnson A, Palmer-Densmore M, Simmons K, Fanton R, 1997. "Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease". *Vaccine* 15:720-729.

Zhang Q, Xu X, Zhai G, Wang Z, Hou S, Zhu H, 2010 "Molecular characterization of canine parvovirus strains circulating in China". *African Journal of Biotechnology* 9(29):4556-4560.

CAPÍTULO V – ANEXOS

CAPÍTULO V – ANEXOS

Anexo 1

Dados referentes à Tarefa 2 do Capítulo II.

Protocolo A (foram incluídos neste protocolo 14 animais)

Protocolo A – Vírus CPV2										
Dia	0	8	30	38	60	68	120	425	433	455
Vacina	M		M		M		R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A01	1:1280	1:20480	1:20480	1:10240	1:20480	1:10240	1:20480	5120	1:5120	1:5120
A02	1:640	1:320	1:320	1:320	1:5120	1:10240	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480
A04	1:640	1:2560	1:2560	1:5120	1:10240	1:5120	1:10240			
A05	1:2560	1:2560	1:640	1:640	1:320	1:160	1:1280			
A06	1:1280	1:640	1:640	1:640	1:640	1:10240	1:10240			
A07	1:1280	1:640	1:320	1:1280	1:160	1:10240	1:10240			
A08	1:160	1:10240	1:10240	1:5120	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480
A09	1:640	1:320	1:2560	1:10240	1:5120	1:5120	1:5120			
A10	1:320	1:640	1:2560	1:0240						
A11 ---- CP	1:20480	1:20480	1:2560	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	1:2560
A12	1:640	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480	1:20480
A13	1:160	1:2560	1:10240	1:10240	1:5120	1:20480	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240
A14	1:640	1:640	1:320	1:640	1:10240	1:20480	1:20480			
A15	1:320	1:10240	1:10240							

Tabela 1: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação A, utilizando o vírus CPV2.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo A – Vírus CPV2b										
Dia	0	8	30	38	60	68	120	425	433	455
Vacina	M		M		M		R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A01	1:160	1:640	1:1280	1:1280	1:1280	1:320	1:1280	1:640	1:640	1:640
A02	1:40	1:40	1:40	1:1280	1:2560	1:5120	1:2560	1:5120	1:2560	1:2560
A04	1:320	1:640	1:1280	1:1280	1:5120	1:2560	1:5120			
A05	1:640	1:640	1:160	1:320	1:160	1:1280	1:2560			
A06	1:640	1:320	1:320	1:320	1:160	1:1280	1:2560			
A07	1:1280	1:640	1:80	1:160	1:80	1:2560	1:2560			
A08	1:40	1:320	1:640	1:2560	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
A09	1:40	1:640	1:5120	1:10240	1:5120	1:2560	1:2560			
A10	1:80	1:80	1:5120	1:5120						
A11 ---- CP	1:10240	1:10240	1:5120	1:5120	1:10240	1:5120	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280
A12	1:160	1:640	1:1280	1:640	1:1280	1:1280	1:640	1:320	1:320	1:640
A13	1:1280	1:640	1:1280	1:1280	1:640	1:1280	1:640	1:640	1:2560	1:2560
A14	1:160	1:80	1:320	1:160	1:2560	1:5120	1:5120			
A15	1:160	1:640	1:1280							

Tabela 2: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação A, utilizando o vírus CPV2b.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo A – Vírus CPV2c										
Dia	0	8	30	38	60	68	120	425	433	455
Vacina	M		M		M		R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A01	1:2560	1:640	1:1280	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560
A02	1:1280	1:1280	1:640	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	1:5120
A04	1:320	1:160	1:2560	1:2560	1:1280	1:640	1:1280			
A05	1:2560	1:1280	1:160	1:320	1:320	1:1280	1:2560			
A06	1:320	1:320	1:160	1:160	1:160	1:320	1:1280			
A07	1:640	1:320	1:80	1:160	1:80	1:1280	1:1280			
A08	1:160	1:320	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:1280
A09	1:160	1:320	1:5120	1:10240	1:5120	1:5120	1:2560			
A10	1:160	1:160	1:1280	1:2560						
A11 ---- CP	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:2560
A12	1:1280	1:1280	1:640	1:1280	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
A13	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:1280	1:5120	1:2560	1:5120	1:2560	1:2560
A14	1:320	1:160	1:160	1:320	1:2560	1:5120	1:5120			
A15	1:160	1:640	1:640							

Tabela 3: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2c.
Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo A – Vírus CPV2b/2c										
Dia	0	8	30	38	60	68	120	425	433	455
Vacina	M		M		M		R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A01	1:80	1:320	1:320	1:320	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160
A02	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320	1:1280	1:640	1:640	1:640
A04	1:40	1:80	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320			
A05	1:160	1:320	1:80	1:80	1:80	1:80	1:320			
A06	1:160	1:320	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320			
A07	1:160	1:640	1:320	1:320	1:160	1:320	1:320			
A08	1:640	1:320	320	1:320	1:640	1:640	1:640	1:640	1:320	1:320
A09	1:1280	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:640	1:640			
A10	1:640	1:80	1:640	1:1280						
A11 ----- CP	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:640	1:1280	1:640	1:640	1:640	1:640
A12	1:160	1:160	1:160	1:320	1:160	1:640	1:320	1:320	1:640	1:1280
A13	1:40	1:160	1:640	1:320	1:320	1:640	1:1280	1:320	1:320	1:640
A14	1:320	1:160	1:320	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280			
A15	1:20	1:160	1:640							

Tabela 4: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando co-infecção CPV2b/2c.
Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo B (foram incluídos neste protocolo 17 animais).

Protocolo B – Vírus CPV2									
Dia	0	8	30	38	60	120	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B01	1:160	1:2560	1:2560	1:5120	1:10240	1:5120			
B02	1:640	1:320	1:320	1:640	1:5120	1:5120	1:20480	1:20480	1:20480
B03	1:160	1:320	1:320						
B04	1:320	1:640	1:10240	1:20480	1:10240				
B05	1:160	1:320	1:320	1:160	1:10240				
B06	1:320	1:160	1:320	1:320	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240
B07	1:320	1:320	1:20480	1:20480	1:20480	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480
B08	1:5120	1:20480	1:5120	1:10240	1:10240	1:1280	1:5120	1:5120	1:5120
B09	1:40	1:80	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:10240	1:10240
B10 ----- CP	1:640	1:80	1:160	1:160	1:160	1:640			
B11	1:160	1:160	1:80	1:160	1:10240	1:10240	1:2560	1:5120	1:5120
B12	1:320	1:160	1:160	1:80	1:80	1:2560	1:10240	1:10240	1:10240
B13	1:320	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240			
B14	1:640	1:2560	1:10240	1:5120	1:5120	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120
B15	1:160	1:320	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240
B16	1:320	1:640	1:1280	1:5120	1:2560	1:10240	1:10240	1:5120	1:5120
B17	1:160	1:320	1:10240	1:20480	1:10240	1:10240	1:5120	1:10240	

Tabela 5: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2. Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo B – Vírus CPV2b									
Dia	0	8	30	38	60	120	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B01	1:80	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	5120			
B02	1:640	1:160	1:160	1:160	1:2560	2560	5120	2560	2560
B03	1:80	1:80	1:1280						
B04	1:80	1:320	1:2560	1:5120	1:2560				
B05	1:80	1:160	1:160	1:80	1:2560				
B06	1:40	1:80	1:160	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
B07	1:80	1:320	1:320	1:640	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:2560
B08	1:1280	1:1280	1:1280	1:640	1:640	1:320	1:1280	1:1280	1:5120
B09	1:20	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:40	1:160	1:640
B10 ----- CP	1:80	1:40	1:80	1:80	1:640	1:1280			
B11	1:80	1:160	1:80	1:640	1:640	1:2560	1:640	1:2560	1:1280
B12	1:80	1:40	1:640	1:640	1:640	1:2560	1:640	1:2560	1:2560
B13	1:160	1:320	1:1280	1:2560	1:2560	1:5120			
B14	1:160	1:640	1:640	1:2560					
B15	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320	1:1280	1:1280	1:640	1:1280
B16	1:320	1:160	1:320	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:5120
B17	1:40	1:80	1:320	1:320	1:640	1:640	1:320	1:320	

Tabela 6: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2b. Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo B – Vírus CPV2c									
Dia	0	8	30	38	60	120	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B01	1:1280	1:640	1:1280	1:5120	1:5120	1:2560			
B02	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120
B03	1:1280	1:1280	1:640						
B04	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:2560				
B05	1:320	1:640	1:640	1:1280	1:1280				
B06	1:160	1:80	1:320	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280
B07	1:640	1:640	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	1:2560
B08	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560
B09	1:40	1:40	1:80	1:320	1:1280	1:2560	1:5120	1:2560	1:2560
B10 ----- CP	1:320	1:160	1:320	1:1280	1:640	1:1280			
B11	1:1280	1:640	1:160	1:1280	1:2560	1:1280	1:2560	1:1280	1:2560
B12	1:160	1:80	1:640	1:640	1:640	1:1280	1:640	1:2560	1:2560
B13	1:640	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560			
B14	1:640	1:320	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280
B15	1:640	1:320	1:1280	1:2560	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
B16	1:640	1:320	1:1280	1:1280	1:2560	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560
B17	1:160	1:80	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280	1:5120		

Tabela 7: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando o vírus CPV2c.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo B – Vírus CPV2b/2c									
Dia	0	8	30	38	60	120	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B01	1:160	1:160	1:640	1:1280	1:640	1:640			
B02	1:40	1:320	1:80	1:80	1:640	1:320	1:160	1:2560	1:640
B03	1:160	1:160	1:160						
B04	1:160	1:40	1:1280	1:320	1:1280				
B05	1:160	1:160	1:80	1:320	1:640				
B06	1:640	1:80	1:320	1:640	1:320	1:640	1:1280	1:1280	1:1280
B07	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:640	1:320	1:640	1:320
B08	1:320	1:320	1:160	1:320	1:80	1:160	1:640	1:160	1:320
B09	1:20	1:40	1:40	1:640	1:640	1:640	1:1280	1:1280	1:640
B10 ----- CP	1:80	1:20	1:80	1:80	1:160	1:160			
B11	1:40	1:160	1:80	1:80	1:320	1:1280	1:1280	1:1280	1:320
B12	1:10	1:40	1:160	1:160	1:80	1:320	1:80	1:160	1:640
B13	1:40	1:160	1:640	1:640	1:1280	1:640			
B14	1:160	1:320	1:320	1:160	1:160	1:640	1:160	1:640	1:320
B15	1:80	1:40	1:320	1:320	1:640	1:1280	1:80	1:80	
B16	1:320	1:160	1:160	1:320	1:320	1:320	1:640	1:320	1:640
B17	1:40	1:160	1:320	1:320	1:640	1:640	1:1280	1:1280	

Tabela 8: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação B, utilizando co-infecção de CPV2b/2c. Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo C (foram incluídos neste protocolo 13 animais)

Protocolo C – Vírus CPV2									
Dia	0	8	30	38	60	90	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C02	1:160	1:80	1:640	1:5120	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240
C03	1:2560	1:10240	1:2560	1:20480	1:20480	1:5120	1:10240	1:20480	1:10240
C04	1:320	1:320	1:320	1:10240	1:10240	1:5120	1:5120		
C05	1:320	1:5120	1:5120						
C06	1:160	1:80	1:5120	1:20480	1:10240	1:10240	1:10240	1:20480	1:10240
C07	1:160	1:320	1:1280	1:1280	1:5120	1:5120	1:2560	1:5120	1:2560
C08 ---- CP	1:640	1:5120	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560	1:10240	1:10240	
C09	1:80	1:5120	1:10240	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:10240	1:2560
C10	1:160	1:160	1:1280	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240
C11	1:160	1:640	1:5120	1:10240	1:5120	1:5120	1:5120	1:2560	1:5120
C12	1:160	1:5120							
C13	1:160	1:320	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280		
C14	1:160	1:5120							

Tabela 9: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando o vírus CPV2.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo C – Vírus CPV2b									
Dia	0	8	30	38	60	90	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C02	1:40	1:80	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
C03	1:20	1:80	1:160	1:320	1:1280	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
C04	1:320	1:320	1:160	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:1280
C05	1:160	1:320	1:320						
C06	1:40	1:80	1:5120	1:5120	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560	1:5120
C07	1:320	1:160	1:320	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:2560	1:5120
C08 ---- CP	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:1280	1:1280	1:1280	
C09	1:40	1:320	1:640	1:1280	1:1280	1:640	1:640	1:1280	1:1280
C10	1:80	1:40	1:320	1:320	1:640	1:2560	1:5120	1:5120	1:5120
C11	1:80	1:640	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280	1:640	1:1280
C12	1:160	1:1280							
C13	1:40	1:80	1:1280	1:1280	1:1280	1:2560	1:640		
C14	1:160	1:320							

Tabela 10: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando o vírus CPV2b.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo C – Vírus CPV2c									
Dia	0	8	30	38	60	90	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C02	1:80	1:40	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120
C03	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	1:5120	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120
C04	1:640	1:320	1:640	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:2560
C05	1:640	1:2560	1:2560						
C06	1:320	1:160	1:1280	1:1280	1:1280	1:5120	1:5120	1:2560	1:5120
C07	1:2560	1:640	1:1280	1:640	1:2560	1:2560	1:1280	1:2560	1:1280
C08 ---- CP	1:2560	1:5120	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120	
C09	1:160	1:320	1:1280	1:2560	1:1280	1:640	1:1280	1:2560	1:1280
C10	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
C11	1:80	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560
C12	1:40	1:1280							
C13	1:40	1:80	1:1280	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280		
C14	1:80	1:640							

Tabela 11: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando o vírus CPV2c.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo.

Protocolo C – Vírus CPV2b/2c									
Dia	0	8	30	38	60	90	395	403	425
Vacina	M		M			R	M		
Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C02	1:20	1:40	1:20	1:80	1:320	1:320	1:1280	1:1280	1:1280
C03	1:160	1:160	1:80	1:320	1:80	1:640	1:640	1:1280	1:1280
C04	1:160	1:160	1:80	1:320	1:320	1:640	1:5120	1:1280	1:1280
C05	1:160	1:160	1:320						
C06	1:80	1:80	1:640	1:160	1:1280	1:1280	1:1280	1:2560	1:12560
C07	1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:320	1:640	1:640	1:640
C08 ---- CP	1:640	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	
C09	1:20	1:160	1:40	1:160	1:320	1:80	1:320	1:1280	1:320
C10	1:80	1:160	1:320	1:160	1:320	1:640	1:2560	1:5120	1:5120
C11	1:80	1:160	1:640	1:80	1:160	1:80	1:640	1:640	1:640
C12	1:160	1:640							
C13	1:80	1:80	1:320	1:320	1:80	1:640	1:320		
C14	1:10	1:320							

Tabela 12: Resultados do teste de IHA do protocolo de vacinação C, utilizando co-infecção 2b/2c.

Legenda: M – Vacina Multivalente; R – Vacina da Raiva; CP - Controlo Positivo

Anexo 2

Resultado do Teste de IHA											
ID	Prog	Vírus	Dia 1			Dia 3			Dia 5		
			CPV2	CPV2b	CPV2c	CPV2	CPV2b	CPV2c	CPV2	CPV2b	CPV2c
1	M	2b	1:2560	1:2560	1:5120						
3	M	2c	1:80	1:40	1:160	1:20480	1:10240	1:10240			
4	S	2c	1:1280	1:40	1:640	1:160	1:80	1:320			
5	S	2b	1:320	1:320	1:160	1:1240	1:10240	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480
6	S	2b	1:10240	1:2560	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240			
7	S	2b	1:5120	1:5120	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240	1:20480	1:10240	1:20480
8	S	2c	1:320	1:640	1:640	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:10240	1:20480
9	S	2b	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:5120	1:5120			
10	M	2b	1:5120	1:2560	1:5120	1:20480	1:10240	1:20480			
11	S	2b	1:320	1:1280	1:80	1:2560	1:2560	1:5120			
12	S	2b	1:1280	1:5120	1:1280	1:10240	1:5120	1:10240	1:1280	1:10240	1:10240
13	M	2c	1:640	1:2560	1:320	1:5120	1:2560	1:10240	1:20480	1:5120	1:20480
14	M	2c	1:5120	1:2560	1:5120	1:10240	1:5120	1:10240			
15	M	2b	1:640	1:5120	1:160	1:2560	1:10240	1:1280	1:20480	1:10240	1:20480
16	S	2b	1:160	1:1280	1:1280	1:320	1:160	1:2560	1:20480	1:5120	1:10240
17	S	Coinf	1:160	1:640	1:1280	1:2560	1:10240	1:10240	1:20480	1:10240	1:10240
18	S	2b	1:640	1:160	1:320	1:20480	1:2560	1:10240	1:20480	1:5120	1:10240
19	S	2c	1:80	1:80	1:160	1:1280	1:1280	1:2560	1:10240	1:2560	1:10240
20	S	2c	1:1280	1:1280	1:5120	1:5120	1:5120	1:20480	1:5120	1:5120	1:20480
21	S	2b	1:640	1:320	1:1280	1:20480	1:5120	1:20480	1:20480	1:10240	1:10240
22	S	2c	1:1280	1:640	1:1280	1:5120	1:2560	1:10240	1:5120	1:5120	1:10240
23	S	2c	1:80	1:80	1:160	1:20480	1:2560	1:1280	1:20480	1:5120	1:10240
24	M	2b	1:2560	1:40	1:640	1:2560	1:5120	1:10240			
25	M	Coinf	1:1280	1:80	1:640	1:640	1:2560	1:2560			
26	M	2c	1:5120	1:640	1:160	1:640	1:2560	1:2560			
27	S	2c	1:320	1:320	1:320	1:320	1:2560	1:5120			
28	S	2c	1:640	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240			
29	S	2b	1:640	1:5120	1:640	1:5120	1:5120	1:5120			
32	S	2c	1:5120	1:10240	1:160						

Quadro 1: Resultado da titulação de anticorpos por técnicas de IHA, usando como antígenos os vírus CPV2, CPV2b e CPV2c, nos animais com parvovirose canina. As amostras foram recolhidas nos dias 1, no dia 3 e no dia 5 de internamento. Legenda: ID – identificação do animal; Prog – prognóstico; S – sobrevivência; M – morte; 2b – CPV2b; 2c – CPV2c; Coinf – Co-infecção CPV2b/CPV2c.