



ANA CAROLINA CARPIO ESPINOSA

**DISTRIBUIÇÃO DO PARVOVÍRUS CANINO NOS TECIDOS E
CARACTERIZAÇÃO DO SUBTIPO CIRCULANTE EM MINAS
GERAIS**

**LAVRAS - MG
2021**

ANA CAROLINA CARPIO ESPINOSA

**DISTRIBUIÇÃO DO PARVOVÍRUS CANINO NOS TECIDOS E
CARACTERIZAÇÃO DO SUBTIPO CIRCULANTE EM MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária para obtenção de título de Mestre.

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Dra. Angélica T. B. Wouters
Coorientadora

Dr. Djeison Lutier Raymundo
Coorientador

**LAVRAS-MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Espinosa, Ana Carolina Carpio.

Distribuição do Parvovírus canino nos tecidos e caracterização
do subtipo circulante em Minas Gerais / Ana Carolina Carpio
Espinosa. - 2021.

46 p. : il.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Caninos. 2. CPV-2. 3. Parvovirose. I. Varaschin, Mary
Suzan. II. Título.

ANA CAROLINA CARPIO ESPINOSA

**DISTRIBUIÇÃO DO PARVOVÍRUS CANINO NOS TECIDOS E
CARACTERIZAÇÃO DO SUBTIPO CIRCULANTE NO SUL MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária para obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 20 de outubro de 2021

Dra. Débora Ribeiro Orlando - UFVJM

Dr. Djeison Lutier Raymundo - UFLA

Dra. Elaine Maria Seles Dorneles - UFLA

Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

*Aos meus pais Laurentina e Diego por sempre me apoiarem e a minha irmã e melhor
amiga Maria José*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Laurentina e Diego, por sempre serem luz no meu caminho e por seu amor incondicional, à minha irmã Maria José, por ser meu exemplo de superação, ao meu namorado e companheiro de vida André, por tanto amor.

À Mary Suzan Varaschin, minha orientadora, por me brindar com tanto conhecimento nesse tempo e por ter me orientado da melhor forma. Agradeço também a todos os professores do Setor de Patologia Veterinária da UFLA Angélica T. B. Wouters, Djeison L. Raymundo e Flademir Wouters. Foi um privilégio ter sido parte do Setor com professores de tão alto nível.

A todos os pós-graduandos e estagiários do Setor de Patologia Veterinária, em especial ao Ivam Moreira e à Adriana Albuquerque, pela boa vontade em me ajudar.

À equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular, à professora Elaine, por abrir as portas para que eu pudesse realizar parte do meu experimento, à Dirceia e à Carine, pela imensa ajuda prestada.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado e pela ajuda financeira (Processo CVZ PPM 00763-16).

RESUMO

O Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é responsável por quadros de gastroenterite hemorrágica em cães e, mais raramente, de miocardite não supurativa em filhotes caninos. O diagnóstico em animais necropsiados é realizado principalmente pelas lesões intestinais, porém, quando há alterações pós-mortais ou lesões intestinais inespecíficas, a imuno-histoquímica (IHQ) tem sido utilizada para detectar o vírus em outros tecidos. Três variantes antigênicas do CPV-2; CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c foram identificadas em vários países por meio de testes moleculares, podendo estar associadas a diferentes quadros epidemiológicos e gravidade de lesões. Desta forma, o objetivo deste estudo é descrever a distribuição do Parvovírus canino nos tecidos por meio da marcação IHQ e caracterizar o(s) subtipo(s) circulante(s) em Minas Gerais por análises moleculares e sequenciamento. Dez cães com lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose canina e cinco cães controles negativos foram necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras no período de 2020-2021. Tecidos destes cães foram submetidos à análise histológica, imuno-histoquímica e molecular. Na necropsia as lesões mais frequentes foram serosa do intestino delgado hiperêmica e granular, mucosa avermelhada e enrugada, placas de Peyer evidentes, linfonodos mesentéricos e retrofaríngeos aumentados de tamanho e avermelhados. Microscopicamente as principais lesões foram necrose de criptas (9/10) e descamação das células epiteliais para a luz (8/10), atrofia e fusão das vilosidades intestinais (7/10), necrose e rarefação de células linfoides, sendo mais acentuadas em tonsilas palatinas (6/10) e linfonodos retrofaríngeos (6/10). Os tecidos com maior positividade na IHQ para o CPV-2 foram língua (88,89%); tonsila, linfonodos retrofaríngeos (77,78), íleo (70%) e medula óssea (57,14%). Todos os dez cães foram positivos para CPV-2, na reação em cadeia pela polimerase (PCR). O sequenciamento revelou uma alta identidade de nucleotídeos na VP2 e uma mutação no aminoácido 426 (ácido aspártico), caracterizando a ocorrência do subtipo CPV-2b. Os controles negativos não tiveram marcação IHQ e foram negativos na PCR para CPV-2. Este estudo contribui para o melhor conhecimento da distribuição do Parvovírus canino nos tecidos, sendo língua, tonsila, linfonodo retrofaríngeo, íleo e medula óssea os tecidos que tiveram o maior número de imunomarcações, sendo, desta forma, indicados para o diagnóstico IHQ da parvovirose canina. Os resultados também demonstram que o subtipo CPV-2b circula na população canina de Minas Gerais.

Palavras-chave: CPV-2, enterite hemorrágica, Imuno-histoquímica, PCR, Parvovirose.

ABSTRACT

The canine Parvovirus type 2 (CPV-2) is responsible for hemorrhagic gastroenteritis in dogs and, more rarely, non-suppurative myocarditis in puppies. The diagnosis in necropsied dogs is mainly made by intestinal lesions, but when there are intestinal post-mortem alterations or nonspecific lesions, immunohistochemistry (IHC) has been used to detect the virus in other tissues. Three antigenic variants of CPV-2; CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c, have been identified in many countries by molecular testing and may be associated with different epidemiological pictures and severity of lesions. Thus, the aim of this study is to describe the distribution of canine parvovirus in tissues by IHC and to characterize the circulating strain(s) in Minas Gerais by molecular analysis and sequencing. Ten dogs with gross lesions suggestive of canine parvovirus and five negative controls were necropsied at the Veterinary Pathology Sector of the Federal University of Lavras in the 2020-2021 period. Tissues from these dogs were submitted to histological, immunohistochemical, and molecular analysis. The most frequent gross lesions were hyperemic small intestinal serosa, reddish and rough mucosa, with evident Peyer's patches, increased and reddish retropharyngeal and mesenteric lymph nodes. Microscopically, atrophy and fusion of the intestinal villi (7/10), dilated crypts (5/10), necrosis (9/10), and desquamation of epithelial cells into the lumen (8/10) were visualized. Lymphoid necrosis and cellular rarefaction were more pronounced in tonsils (6/10) and retropharyngeal lymph nodes (6/10). The tissues more often positive on IHC for CPV-2 were tongue (88,89%); tonsil, retropharyngeal lymph nodes (77,78%); ileum (70%) and bone marrow (57,14%). All ten dogs were positive for CPV-2 in the polymerase chain reaction (PCR). Nucleotide sequencing revealed a high nucleotide identity to VP2 and a consistent mutation at amino acid 426 (aspartic acid), characterizing the occurrence of the CPV-2b subtype. Negative controls were negative by IHC and PCR tests for CPV-2. This study contributed to a better knowledge of canine Parvovirus distribution in tissues, being tongue, tonsil, retropharyngeal lymph node, ileum and bone marrow the tissues with the highest frequency of immunolabeling, therefore for IHC diagnosis of canine parvovirus infection. The results also demonstrate that the CPV-2b subtype circulates in the canine population of Minas Gerais.

Keywords: CPV-2, hemorrhagic enteritis, Immunohistochemistry, PCR, Parvovirus

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 – Distribuição mundial dos subtipos virais CPV-2a (vermelho), CPV-2b (rosa) e CPV-2c (verde) em cães domésticos..... 16

ARTIGO

- Figura 1 – Lesões macroscópicas no intestino delgado de cães infectados por Parvovírus canino. (A) Canino 5. Hiperemia segmentar em jejuno e íleo. (B) Canino 10, mucosa enrugada e placas de Peyer evidentes. 36
- Figura 2 – Parvovirose canina. Canino 3. Duodeno com necrose e descamação acentuada das células epiteliais das criptas e fusão das vilosidades. H.E, Obj. 10x. 36
- Figura 3 – Parvovirose canina. Canino 8. Duodeno com metaplasia escamosa do epitélio das criptas. H.E. Obj. 40x. 37
- Figura 4 – Parvovirose canina. Canino 4. Íleo com necrose e dilatação de criptas. H.E. Obj. 20x. 37
- Figura 5 – Parvovirose canina. Rarefação linfoide. (A) Canino 4, válvula ileocecal. H.E., obj. 20x. (B) Canino 1, linfonodo retrofaríngeo. H.E., obj. 10x. 38
- Figura 6 – Parvovirose canina. Canino 4. Marcação anti-Parvovírus canino nas células basais do epitélio pavimentoso estratificado da superfície dorsal da língua. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x. 38
- Figura 7 – Parvovirose canina. Canino 2. Marcação anti-Parvovírus canino nas células do epitélio pavimentoso estratificado da tonsila e rara no tecido linfoide. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x. 39
- Figura 8 – Parvovirose canina. Canino 1, Marcação anti-Parvovírus canino nas células linfoides do linfonodo retrofaríngeo. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 40X. 39
- Figura 9 – Parvovirose canina. Canino 2. Íleo. Marcação anti-Parvovírus canino em células descamadas e intactas do epitélio das criptas. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj.10X. 40
- Figura 10 – Parvovirose canina. Canino 2. Duodeno. Marcação anti-Parvovírus canino nas células descamadas e intactas do epitélio das criptas. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x. 40
- Figura 11 – Parvovirose canina. Canino 2. Válvula ileocecal. Marcação anti-Parvovírus canino nas células epiteliais descamadas e intactas da mucosa e em poucas células linfoides da submucosa. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x. 41

Figura 12 –	Parvovirose canina. Canino 9. Ceco. Marcação anti-Parvovírus canino nas células epiteliais descamadas da mucosa. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x.	41
Figura 13 –	Parvovirose canina. Canino 8. Esôfago. Marcação anti-Parvovírus canino em células do epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado. IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x.	42
Figura 14 –	Parvovirose canina. Parvovírus canino detectado por PCR. M: Marcador de peso molecular 100pb..	42
Figura 15 –	Parvovirose canina. Sequências das proteínas VP-2 das amostras AE-1 e AE-2 alinhadas contra as amostras de referência CPV-2a (KM386823), CPV-2b (JF414817), CPV-2c (JF414826), apresentando similaridade com o tipo CPV-2b no aminoácido 426.	43

LISTA DE QUADROS

REFERENCIAL TEÓRICO

Quadro 1 - Diagnóstico cronológico por PCR dos subtipos do CPV-2 circulantes no Brasil	21
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Resenha dos cães positivos na IHQ e na PCR para Parvovírus canino.....	30
Tabela 2 – Frequência e intensidade da marcação IHQ anti-Parvovírus canino em diferentes órgãos de cães com parvovirose.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 PARVOVÍRUS CANINO	14
2.1.1 Estrutura viral e variantes antigênicas.....	14
2.1.2 Epidemiologia	15
2.1.3 Patogenia e Sinais clínicos.....	17
2.1.4 Diagnóstico	18
2.1.4.1 Achados de necropsia e histopatologia	18
2.1.4.2 Diagnóstico Imuno-histoquímico.....	20
2.1.4.3 Diagnóstico por reação em cadeia da polimerase (PCR)	20
2.2 Profilaxia	21
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	27
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

O Parvovírus canino possui tropismo por células com alta taxa mitótica (CASTRO et al., 2014), sendo responsável por quadros de gastroenterite hemorrágica em cães (KILIAN et al., 2018) e, mais raramente, de miocardite não supurativa em filhotes (SOUTO et al., 2018). A forma de gastroenterite é mais severa em filhotes de seis semanas a seis meses de idade (HOUSTEN et al., 1996) ocorrendo, microscopicamente, necrose do epitélio das criptas intestinais, com dilatação e debris celulares ao centro e atrofia das vilosidades (GODDARD; LEISEWITZ, 2010). A forma de miocardite ocorre em filhotes infectados na vida intrauterina e até duas semanas de idade, levando a insuficiência cardíaca aguda e morte súbita nas primeiras oito semanas (LENGHAUS; STUDDERT, 1984). Microscopicamente as lesões são de miocardite linfo-histiocítica, necrosante, associada à fibrose intersticial e corpúsculos de inclusão viral basofílicos em cardiomiócitos (SOUTO et al., 2018).

O diagnóstico da infecção por Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é baseado principalmente nas lesões intestinais, porém em casos com lesões inespecíficas ou com alterações pós-mortais no intestino pode se utilizar como auxílio diagnóstico a técnica de imuno-histoquímica para detecção do CPV em outros tecidos (OLIVEIRA et al., 2009). Já as técnicas moleculares apresentam alta especificidade e sensibilidade, além de permitirem o reconhecimento dos subtipos do Parvovírus canino circulantes numa determinada região e sua relação com dados epidemiológicos, patogenicidade e eficiência vacinal (HAMAMURA, 2017).

Desta forma, este trabalho tem por objetivo pesquisar, por meio da IHQ, a distribuição do Parvovírus canino nos tecidos de cães com lesões compatíveis com parvovirose e identificar o(s) subtipo(s) circulante(s) em Minas Gerais por meio de testes moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PARVOVÍRUS CANINO

2.1.1 Estrutura viral e variantes antigênicas

O Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é um importante agente causador de enterite em cães, podendo levar a altas taxas de mortalidade em filhotes não vacinados. Ele emergiu como um novo vírus em cães domésticos e rapidamente se espalhou pelo mundo em 1978 (MIRANDA; THOMPSON, 2016). No Brasil foi reconhecido pela primeira vez em 1980, tornando-se um vírus endêmico no país (RODRIGUES et al., 2017). O CPV-2 foi assim denominado para diferenciá-lo do vírus minuto canino, também conhecido como Parvovírus canino tipo 1 (CPV-1), um vírus não patogênico que pode ser encontrado em fezes de caninos saudáveis (MIRANDA; THOMPSON, 2016).

O CPV-2 é um vírus DNA, pequeno (20-25nm), não envelopado, formado por uma única cadeia de DNA, capsídeo icosaédrico e muito resistente a substâncias químicas e fatores ambientais (PARRISH et al., 1985). O capsídeo do vírus contém 60 subunidades protéicas de VP1 (5 a 6 cópias) e VP2 (54 a 55 cópias). A proteína VP2 pode ser clivada por proteases do hospedeiro e produzir outra proteína estrutural, a VP3 (TSAO et al., 1991). Além disso, a VP2 tem funções fundamentais na estabilidade vírica e encapsidação (processo de envolver o DNA viral em uma capa protetora); por ser o sítio de ligação ao receptor do hospedeiro atua como antígeno e epítopo, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes e confere ao vírus suas propriedades aglutinantes (BUONAVOGLIA et al., 2001). No sítio antigênico da VP2 encontra-se o resíduo 426, em que ocorrem as mutações que determinam os subtipos circulantes de CPV-2 (BUONAVOGLIA et al., 2001).

O CPV-2 pertence à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Protoparvovirus*, espécie *Carnivore Protoparvovirus 1* (Protoparvovírus dos carnívoros) (HAMAMURA, 2017), juntamente com o Vírus da panleucopenia felina, Vírus da enterite das martas e Parvovírus do *raccoon*, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral [International Committee on Taxonomy of Viruses] (TIJSEN et al., 2011). Estudos filogenéticos do CPV-2 isolado de cães e comparado com os demais Parvovírus demonstraram que eles são derivados de um ancestral em comum (ALISSON et al., 2012). O

Parvovírus canino (CPV) e o Parvovírus felino (FPV) apresentam acima de 98% da sequência de DNA idêntica, mas apresentam hospedeiros (o CPV-2 original não se replica em gatos), propriedades antigênicas e hemoaglutinantes específicas, controladas pelo gene das proteínas do capsídeo (CHANG et al., 1992). Existem aproximadamente seis ou sete mudanças de aminoácidos entre o CPV-2 e o FPV, principalmente na interação do VP2 com o receptor transferrina da célula do hospedeiro (TfR) (FONTANA, 2012).

Desde que o CPV-2 emergiu de forma pandêmica em 1978, três variantes antigênicas, denominadas CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c (PARRISH et al., 1988, MIRANDA; THOMPSON, 2016) encontram-se disseminadas por vários países, sendo as três variantes encontradas no Brasil (CASTRO et al., 2010; PINTO et al., 2012; MIRANDA; THOMPSON, 2016). No período de 1979 a 1982 o CPV-2 foi substituído em vários países pela variante CPV-2a, a qual readquiriu a capacidade de infectar gatos (causando doença indistinguível da causada por Parvovírus felino) e outros carnívoros (TRUYEN et al., 1996a). A CPV-2a difere do CPV-2 original em 5 a 6 aminoácidos, com alterações nos resíduos 87 (Metiona para Leucina), 300 (Alanina para Glicina), 305 (Ácido Aspártico para Tirosina), 101 (Isoleucina para Treonina), 297 (Serina para Alanina) e 555 (Valina para Isoleucina) (TRUYEN et al., 1996a). A variante CPV-2b foi detectada em 1984 nos Estados Unidos e difere da original em dois aminoácidos na proteína VP2, resíduo 426 (Asparagina para Ácido Aspártico) e 555 (Isoleucina para Valina) (PARRISH et al., 1991). A variante CPV-2c foi identificada em 2000 na Itália (BUONAYOGLIA et al., 2001) e apresenta uma mutação no resíduo 426 (Ácido Aspártico para Ácido Glutâmico) do CPV-2b (DECARO et al., 2007).

Além do cão, essas cepas também são descritas afetando vários carnívoros silvestres (MIRANDA; THOMPSON, 2016) e uma pequena porcentagem de gatos (5%), principalmente com a variante CPV-2a e 2b (TRUYEN et al., 1996b).

2.1.2 Epidemiologia

A infecção pelo Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) ocorre mais frequentemente em cães com seis semanas a seis meses de idade, sem predisposição de sexo ou raça (PAVAN, 2018), porém as variantes CPV-2a e CPV-2b também causam doença clínica em cães com mais de seis meses de idade (DUQUE-GARCÍA et al., 2017). Filhotes infectados na vida intrauterina e até duas semanas de idade podem desenvolver a forma cardíaca da doença (LENGHAUS; STUDDERT, 1984; KILIAN et al., 2018). Algumas raças são consideradas

mais suscetíveis à infecção pelo CPV-2, como Rottweiler (HAMAMURA, 2017; PAVAN, 2018; OLIVERIA et al., 2009; SOUTO et al., 2018), Dobermann Pinscher, Labrador, American Staffordshire Terrier, Pastor Alemão, Pit Bull (HAMAMURA, 2017; PAVAN, 2018) e cães sem raça definida (SRD), nestes últimos, principalmente em cães em situação de abandono, sem vacinação adequada e com risco de contágio devido ao livre acesso a rua (PAVAN, 2018). As variantes CPV-2a e CPV-2b são associadas à maior suscetibilidade e maior virulência em cães das raças Rottweiler e Pastor Alemão (DUQUE-GARCÍA et al., 2017).

A ocorrência de variantes do CPV-2 foi demonstrada em vários países (Figura 1). A ocorrência de anticorpos monoclonais (MAbs) para os subtipos CPV-2a e CPV-2b foi demonstrada em cães na Itália (DESARIO et al., 2005).

No Brasil, desde 1980 os subtipos CPV-2a e CPV-2b têm sido reportados como as principais variantes circulantes, especialmente na Região Sudeste, sendo CPV-2b o mais frequentemente isolado e utilizado na produção de vacinas (FONTANA, 2012). A partir de 2011 a ocorrência do CPV-2c (Tabela 1) foi descrita em varias regiões do Brasil, sendo considerada como uma das principais cepas virais em cães na região metropolitana de Cuiabá, Mato Grosso (FONTANA et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2018). Em Santa Maria e Porto Alegre, Rio Grande do Sul, variantes pertencentes ao genotipo CPV-2c foram identificadas pela presença do ácido glutâmico no resíduo 426, considerada a assinatura desta variante (OLIVEIRA et al., 2018). Na região oeste do Paraná, o CPV-2c predominou até 2015, já em 2016 a maioria dos casos de parvovirose canina foi relacionada ao subtipo CPV-2b (HAMAMURA, 2017). Acredita-se que os subtipos virais CPV-2c e 2b sejam predominantes no Brasil (SANTANA et al., 2019). Porém, outros estudos comparando as sequências genéticas depositadas no GenBank, descrevem que a distribuição global do CPV-2a tem maior predomínio na Ásia e na África e as variantes CPV-2b e CPV-2c nas Américas e Europa (SANTANA et al., 2019).

Figura 1 – Distribuição mundial dos subtipos virais CPV-2a (vermelho), CPV-2b (rosa) e CPV-2c (verde) em cães domésticos.



Fonte: Adaptado de Miranda; Thompson (2016).

2.1.3. Patogenia e Sinais clínicos

Infecções por CPV-2 ocorrem em animais com sistema imune imaturo ou suscetível (YULE et al., 1997), em que as variantes 2a, 2b e 2c são mais eficientes na ligação ao receptor do hospedeiro que o vírus original (HUEFFER; PARRISH, 2003).

O período de incubação varia de 2 a 14 dias, com média de 4 a 7 dias (HAMAMURA, 2017). Os cães são infectados por via oronasal, ocorrendo replicação viral e necrose nos tecidos linfoides próximos à orofaringe (tonsilas palatinas e linfonodos retrofaríngeos), timo e linfonodos mesentéricos. O vírus se dissemina por via hematogênica em células com rápida taxa de divisão mitótica, como medula óssea, órgãos linfopoéticos e criptas de jejuno e íleo (VIEIRA, 2011). A linfopenia ocorre como sinal mais precoce, no primeiro e segundo dia pós-infecção e a neutropenia, nos casos mais graves, seis dias pós-infecção associada a necrose de células da linhagem mieloide da medula óssea. A distribuição e a replicação do CPV-2 nos tecidos gera viremia secundária, com carga viral elevada entre o terceiro e quarto dia pós-infecção (HAMAMURA, 2017).

A replicação do CPV-2 nas células do epitélio germinativo das criptas do jejuno e do íleo levam a necrose das células epiteliais das criptas, atrofia das vilosidades, aumento da permeabilidade, diminuição de absorção da mucosa intestinal (resulta em diarreia osmótica), diarreia hemorrágica e entrada de bactérias na circulação sanguínea. Essa quebra da barreira intestinal, associada a neutropenia periférica, predispõe à sepse, pela translocação de bactérias para a corrente sanguínea (KILIAN et al., 2018). Podem também ocorrer apatia, anorexia, febre e vômito (OLIVEIRA et al., 2009).

Em filhotes o CPV-2 pode afetar as células do miocárdio desde o desenvolvimento intrauterino até duas semanas de idade (KILIAN et al., 2018). Filhotes acometidos pela forma cardíaca do CPV podem morrer de forma repentina ou apresentar dispnéia, vocalização, cansaço, inquietação, inapetência, vômitos, contrações abdominais e taquicardia (SOUTO et al., 2018). A placenta dos cães é endoteliocorial, em que só 5 a 10% dos anticorpos são transferidos aos descendentes pela placenta. A maioria dos anticorpos maternos anti-CPV é transferida para os neonatos pela ingestão do colostro, permitindo a proteção do miocárdio no período mais suscetível à infecção. A infecção do miocárdio acontece em filhotes de cadelas que não foram imunizadas contra o CPV (VIEIRA, 2011) ou com falha na revacinação anual, por infecção intrauterina ou durante os primeiros 45 dias após o nascimento, período em que

ainda ocorre replicação dos miócitos (SOUTO et al., 2018), portanto, a forma intestinal da parvovirose é mais frequente que a cardíaca (VIEIRA, 2011).

Estudos de patogenicidade do CPV-2b atribuem a este subtipo viral os casos atípicos da doença em animais adultos, vacinados e de maior gravidade clínica (HAMAMURA, 2017), assim como a apresentação de eritema multiforme em uma ninhada de Setter Inglês, que apresentou clinicamente pele espessada, dolorosa ao toque, com pústulas e crostas (WOLDEMESKEL et al., 2011).

A variante CPV-2c é semelhante às variantes CPV-2a e CPV-2b quanto aos sinais clínicos apresentados, como anorexia, febre, diarreia, vômitos, apatia e leucopenia (DE LA TORRE et al., 2018), porém alguns estudos descrevem maior taxa de mortalidade em filhotes e a ocorrência de diarreia hemorrágica (KAPIL et al., 2007, DUQUE-GARCÍA et al., 2017) ou mucoide amarelada mais grave, associada a leucopenia e linfopenia (KAPIL et al., 2007). O CPV-2c também é relatado infectando cães adultos e vacinados (CAVALLI et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2018), com mais de dois anos, podendo ocorrer pela falta de imunidade protetora por exposição natural a outros tipos de CPV-2, ou por vacinação não protetora (que contém apenas antígenos CPV-2a ou 2b) (OLIVEIRA et al., 2018). Os subtipos CPV-2a, CPV-2b (CLEGG et al., 2012) e CPV-2c (MIRANDA et al., 2014) também são relatados acometendo felinos.

2.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico da parvovirose canina para CPV-2 pode ser feito pelos achados de necropsia e histopatologia, pela marcação imuno-histoquímica de antígenos virais nos tecidos (IHQ), PCR, ELISA, inibição da hemoaglutinação, imunofluorescência direta, isolamento viral e microscopia eletrônica.

2.1.4.1. Achados de necropsia e histopatologia

Na necropsia a serosa do intestino delgado frequentemente apresenta-se avermelhada e com aspecto granular, devidos a efusão fibrinosa superficial (UZAL et al., 2016), as placas de Peyer estão avermelhadas e evidentes, o conteúdo intestinal pode ser mucoide, fluido ou hemorrágico. A mucosa intestinal apresenta-se avermelhada, com fibrina aderida à mucosa (OLIVEIRA et al., 2009; UZAL et al., 2016), rugosa e com aspecto coureáceo (UZAL et al.,

2016). Aumento de volume de linfonodos mesentéricos, esplenomegalia e atrofia do timo (OLIVEIRA et al., 2009) também podem ocorrer.

Na forma cardíaca da infecção por PVC pode se observar efusão pericárdica, coração globoso, palidez difusa nas superfícies epicárdica e endocárdica e dilatação do ventrículo esquerdo, pulmões avermelhados ao corte, fluído líquido espumoso avermelhado, fígado aumentado de tamanho e com evidenciação do padrão lobular, além de áreas mais pálidas entremeadas por áreas escuras que aprofundam no parênquima (SOUTO et al., 2018).

Microscopicamente observam-se enterite com necrose nas criptas intestinais (OLIVEIRA et al., 2009; UZAL et al., 2016) e exfoliação das células epiteliais para o lúmen, formando sincícios celulares, atrofia focal ou difusa das vilosidades intestinais e pode ocorrer infiltrado de neutrófilos na lâmina própria (UZAL et al., 2016), além de rarefação linfóide em tonsilas palatinas, timo, baço, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e medula óssea (OLIVEIRA et al., 2009).

Miocardite necrosante linfo-histiocítica, associada à fibrose intersticial e corpúsculos de inclusão viral basofílicos intranucleares em cardiomiócitos são descritas (OLIVEIRA, 2007; SOUTO et al., 2018), além de pneumonia intersticial e edema; degeneração e necrose hepáticas centrolobulares e mediozonais, associadas a congestão e hemorragia (SOUTO et al., 2018).

Lesões de eritema multiforme causadas pela variante CPV-2 foram descritas em um canino de dois meses de idade e confirmadas pela marcação IHQ (FAVROT et al., 2000), e numa ninhada da mesma idade associada ao CPV-2b, confirmadas por microscopia eletrônica, IHQ e PCR (WOLDEMESKEL et al., 2011). Em ambos os casos os animais apresentaram ulcerações em coxins, pele e mucosa oral. Placas eritematosas estavam presentes em várias partes do corpo. Microscopicamente havia hiperqueratose paraqueratótica associada à necrose multifocal da epiderme e junção mucocutânea, apoptose multifocal dos queratinócitos, com satelitose de linfócitos e micropústulas multifocais. Foram observadas inclusões basofílicas a anofílicas no citoplasma dos queratinócitos basais e suprabasais e inclusões intranucleares em queratinócitos e células apoptóticas. Nos dois casos o vírus também foi confirmado em outros tecidos, inclusive no intestino (FAVROT et al., 2000; WOLDEMESKEL et al., 2011).

2.1.4.2 Diagnóstico imuno-histoquímico (IHQ)

No Brasil, raros estudos descrevem a marcação IHQ nos tecidos de cães com parvovirose (OLIVEIRA et al., 2009) e gatos com panleucopenia felina (CASTRO et al., 2014). O CPV-2 foi detectado pela IHQ em diferentes tecidos, sendo descrita, em ordem decrescente, 77% dos casos com marcação em segmentos intestinais, principalmente na base das vilosidades e em células descamadas do epitélio intestinal; 70% de marcação no epitélio pavimentoso estratificado das tonsilas palatinas, embora seja descrita marcação fraca no tecido linfoide; 68,9% em células basais do epitélio pavimentoso estratificado da língua; 62,5% em linfonodos mesentéricos, com baixo a moderado número de células marcadas e predomínio de marcação na região folicular, sobre a região parafolicular e medular; 51,6% em medula óssea, com pequeno número de células marcadas; 45,2% de marcação em placas de Peyer; 44,7% em timo; e 43,7% no baço (OLIVEIRA et al., 2009). Na forma cardíaca da infecção por CPV-2, corpúsculos de inclusão viral no núcleo dos cardiomiócitos foram fortemente marcados na IHQ (SOUTO et al., 2018).

2.1.4.3 Diagnóstico por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é utilizada como ferramenta diagnóstica para detectar o material genético do CPV-2, possibilitando o sequenciamento e identificação genotípico dos seus subtipos (BUONAVOGLIA, 2012; HAMAMURA, 2017). As variantes do CPV-2, quando infectam os caninos, permitem o aparecimento de novas características fenotípicas, que facilitam a adaptação nos hospedeiros, sejam canídeos selvagens ou domésticos (DE LA TORRE et al., 2018).

A PCR possui alta sensibilidade e especificidade para a detecção do Parvovírus canino (VIEIRA, 2011), é eficaz na amplificação e sequenciamento do gene VP2 e na identificação das variantes (VIEIRA, 2011), sendo a ocorrência do CPV-2b e CPV-2c demonstrada em 54 amostras, entre elas, amostras fecais, de alças intestinais e língua em cães nos Estados Unidos (KAPIL et al., 2007). No Brasil, para o diagnóstico molecular e caracterização da cepa do CPV-2 (sequenciamento de 583 pb do gene VP2) tem se utilizado os primers forward 5'-CAGGAAGATATCCAGAAGGA-3' e reverse 5'-GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA-3' (STRECK et al., 2009; CASTRO et al., 2010, FONTANA, 2012; HAMAMURA, 2017; OLIVEIRA et al., 2018; PEREIRA et al., 2000; SILVA et al., 2017), conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Diagnóstico cronológico por PCR dos subtipos do CPV-2 circulantes em cães no Brasil

Coleta	Local	Amostra	Variante(s) CPV-2	Referência
1980-1995	São Paulo	Fezes	1980-1986: 2a 1990-1995: 2b	PEREIRA et al., 2000
1995-2002	Rio de Janeiro	Fezes	2a e 2b	COSTA et al., 2005
1995-2009	Rio de Janeiro	Fezes	1995-2003: 2a 2004-2006: 2b 2006-2009: 2a e 2b	CASTRO et al., 2010
2008	Porto Alegre, RS	Fezes	2a, 2b e 2c	STRECK et al., 2009
2008-2010	RS,SC,PR,SP,RJ,RO	Fezes	2a,2b,2c	PINTO et al., 2012*
2009-2011	Cuiabá, MT	Fezes	2c	FONTANA et al., 2013
2012-2016	Palotina, PR	Fezes	2b e 2c	HAMAMURA, 2017
2012	Porto Alegre, RS	Fezes	2c	ROLIM et al., 2014
2014-2016	Santa Maria e Porto Alegre, RS	Fezes e intestino	2c	OLIVEIRA et al., 2018
2017	Belém, Pará	Fezes	2b	SILVA et al., 2017

*o autor não especifica o estado de origem das amostras positivas e o (s) seus subtipos (s), porém a maioria das coletas foi realizada em cidades do RS.

2.2 Profilaxia

A vacinação contra a parvovirose canina é a forma mais efetiva de proteção. O protocolo remendado é que a vacinação inicie entre 6 e 8 semanas de idade e finalize com aproximadamente 16 semanas, totalizando 3 doses da vacina, seguido de um reforço anual ou a cada 3 anos (DAY et al., 2016). Porém animais vacinados e que apresentam títulos de anticorpos abaixo de 80 unidades inibidoras da hemaglutinação (UHI) não apresentam proteção suficiente contra o CPV-2 (PAVAN, 2018). Esse quadro poderia estar associado aos relatos de cães adultos (mais de um ano de idade) e vacinados infectados pelo CPV-2 (DECARO et al., 2008). As vacinas disponíveis no Brasil são vacinas vivas atenuadas e inativadas (RODRIGUES, 2005), constituídas pelo CPV-2 original e o subtipo CPV-2b (HAMAMURA, 2017), as quais conferem imunidade cruzada para a infecção pelas cepas CPV-2a, mas existem dúvidas quanto a proteção para a cepa CPV-2c (RODRIGUES et al., 2018). As vacinas inativadas são indicadas para fêmeas gestantes e animais imunocomprometidos e as vacinas atenuadas promovem uma imunidade mais eficaz com uma menor interferência dos anticorpos de origem materna (RODRIGUES, 2005).

A desinfecção do ambiente com produtos que inativam o vírus, como o hipoclorito de sódio e a formalina, e a exposição aos raios solares podem auxiliar na prevenção da disseminação do CPV-2 (RODRIGUES et al., 2018).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da infecção por CPV-2 ser controlada em muitos países, no Brasil este vírus ainda é um importante agente etiológico de gastroenterite em cães jovens. A utilização de técnicas como a IHQ se faz necessária para o diagnóstico da parvovirose em caninos com algum grau de alterações pós-mortais, uma vez que o intestino delgado é um dos tecidos mais acometidos por essas alterações, ou em caninos com lesões menos evidentes.

A identificação das variantes antigênicas do CPV-2 é importante para a implementação de protocolos preventivos, terapêuticos e para a formulação de vacinas. Também contribui para estudos epidemiológicos e de patogenia da parvovirose em caninos no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, A. B. et al. Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. **Journal of Virology**, v. 86, p. 865–872, 2012.
- BUONAVOGLIA, C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 3021–3025, 2001.
- CASTRO, T. X. et al. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1093–1098, 2010.
- CASTRO, N. B. et al. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em felinos domésticos com panleucopenia felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 770–775, 2014.
- CAVALLI, A. et al. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 534–539, 2008.
- CHANG, F. et al. 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**, v. 66, p. 6858–6867, 1992.
- CLEGG, S. R. et al. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 78-85. 2012.
- COSTA, A.P. et al. Genomic typing of canine Parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 Using polymerase chain reaction assay. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 8, p. 735-43, 2005.
- DAY, M. J. et al. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, 2016.
- DE LA TORRE, D. et al. Molecular characterization of canine Parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. **Veterinary World**, v. 11, p. 480-483, 2018.
- DECARO, N. et al. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine Parvovirus type 2 Glu-426 mutant. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 17, p. 133–138, 2005.
- DECARO, N. et al. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiologica**, v. 31, n. 1, p. 125–130, 2008.
- DESARIO, C. et al. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**, v. 126, n. 1-2, p. 179-185, 2005.
- DUQUE-GARCÍA, Y. et al. Prevalence and molecular epidemiology of canine Parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 56–61, 2017.

- FAVROT, C. et al. Parvovirus infection of keratinocytes as a cause of canine erythema multiforme. **Veterinary Pathology**, v. 37, p.647-649, 2000.
- FONTANA, D. S. Detecção e caracterização do Parvovírus canino na região metropolitana de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. [**Dissertação**]. Universidade Federal de Mato Grosso. 2012.
- FONTANA, D. S. et al. A phylogenetic study of canine Parvovirus type 2c in midwestern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v 33, n. 2, p. 214-218. 2013.
- GODDARD A.; LEIREWITZ A. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v. 40, n. 6, p. 1041-1053, 2010.
- HAMAMURA, M. Diagnóstico e caracterização molecular do parvovírus canino em cães com gastroenterite da região Oeste do Paraná. [**Dissertação**]. Universidade Federal do Paraná, Palotina-BR. 2017.
- HUEFFER, K, PARRISH,R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 392-398. 2003.
- HOUSTEN, D.M. et al. Risk factors associated with Parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 208, p. 542-546. 1996.
- KAPIL, S. et al. Canine Parvovirus types 2c and 2b circulating in north American dogs in 2006 and 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 4044–4047, 2007.
- KILIAN, E. et al. Long-term effects of canine Parvovirus infection in dogs. **Plos One**, v. 29, n. 2, p. 11, 2018.
- LENGHAUS C.; STUDDENT M., Acute and chronic viral myocarditis. Acute difuse nonsuppurative myocarditis and residual myocardial scarring following infection with canine Parvovirus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 115, n. 2, p. 316-319, 1984.
- MIRANDA, C., et al. Canine Parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 3, p. 462–464, 2014.
- MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 9, p. 2043–2057, 2016.
- OLIVEIRA E. C. Achados patológicos e avaliação imunoistoquímica em cães com Parvovirose canina. [**Dissertação**]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
- OLIVEIRA, E. C. et al. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo Parvovírus canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 131-136. 2009.
- OLIVEIRA, P. S. B. et al. Epidemiological, clinical and pathological features of canine Parvovirus 2c infection in dogs from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 113–118, 2018.

- PARRISH, C. R. et al. Natural variation of canine Parvovirus. **Science**, v. 230, n. 4729, p. 1046–1048, 1985.
- PARRISH, C. R. et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. **Journal of Virology**, v. 65, p.6544–6552. 1991.
- PAVAN, T. R. Parvovirose canina – revisão de literatura. [**Dissertação**]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.
- PEREIRA, C.A.D. et, al. Molecular characterization of canine Parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 127-133, 2000.
- PINTO L. D. et al. Typing of canine Parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, v. 165, n. 1, p. 29-33, 2012.
- RODRIGUES A. F. Estudo retrospectivo da parvovirose canina diagnosticada no LPA do HV da UFCG do município de Patos-PB. [**Monografia**]. Universidade de Campina Grande. 2005.
- RODRIGUES, B., MOLINARI, B.L.D. Diagnóstico e tratamento da Parvovirose canina: Revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 21, n. 2, p. 127-134, 2018.
- ROLIM V.M. et al. Enteritis caused by Type 2c Canine Parvovirus in a 5-year-old dog. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 42, Suppl 1, p.1-4, 2014.
- SANTANA, W. O. et al. Parvovírus canino: uma abordagem evolutiva e clínica. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 13, n. 4, p. 526-533, 2019.
- SILVA, S. P. et al. Full-length genomic and molecular characterization of canine Parvovirus in dogs from North of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-8, 2017.
- SOUTO, E. et al. Outbreak of parvoviral myocarditis in puppies in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 94-98, 2018.
- STRECK, A.F. et al. First detection of canine Parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 465-469, 2009.
- TIJSSEN, P. et al. Family Parvoviridae in virus taxonomy. **Science Direct**, p. 405-425, 2012.
- TRUYEN, U. et al. Evolution of canine Parvovirus involved loss and gain of feline host range. **Science Direct**, v. 215, n. 2, p. 186–189, 1996a.
- TRUYEN, U. et al. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. **Veterinary Record**, v. 138, p. 365-366, 1996b.
- TSAO, J. et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, v. 251, p. 1456-1464, 1991.

UZAL, F. et al. Alimentary System. In: MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2016. v. 2, p. 1-257.

VIEIRA, M. Parvovirose Canina. [Tese]. Universidade do Porto. 2011.

WOLDEMESKEL, M. et al. Canine Parvovirus-2b-associated erythema multiforme in a litter of english setter dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 576-580, 2011.

YULE, T. D. et al. Canine Parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. **Vaccine**, v. 15, n. 6-7, p. 720-729, 1997.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**Análise imuno-histoquímica da distribuição do Parvovírus canino nos tecidos e
identificação do subtipo CPV-2b em cães de Minas Gerais**

Formatado conforme as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Qualis A2

Análise imuno-histoquímica da distribuição do Parvovírus canino nos tecidos e identificação do subtipo CPV-2b em cães de Minas Gerais

ABSTRACT.- Immunohistochemical analysis of canine Parvovirus distribution in tissues and identification of CPV-2b subtype in dogs of Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):000-000. Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário. Cx Postal 3037, Lavras. MG 37200-900, Brazil. E-mail: msvaraschin@ufla.br

This study aimed to investigate, by IHQ immunolabeling, the distribution of canine Parvovirus in the tissues of dogs with lesions compatible with parvovirus using the anti-parvovirus monoclonal antibody and to characterize by molecular analysis the circulating virus subtype in Minas Gerais. For this purpose, tissues from 15 dogs necropsied in the 2020-2021 period were used, ten dogs with macroscopic lesions suggestive of Parvovirus infection and five as negative controls. The most frequent gross lesions were hyperemic and granular serosa, reddish and wrinkled mucosa and evident Peyer's patches in the small intestine, as well as enlarged and reddish mesenteric and retropharyngeal lymph nodes. Microscopically, crypt necrosis (9/10) and epithelial desquamation forming cellular syncytia (8/10), dilated crypts (5/10), atrophy and fusion of intestinal villi (7/10) were visualized. Necrosis and lymphoid rarefaction were more pronounced in tonsils (6/10) and retropharyngeal lymph nodes (6/10). Immunolabeling for CPV-2 were more frequent in tongue (88,89%); tonsil, retropharyngeal lymph nodes (77,78%); ileum (70%) and bone marrow (57,14%). All ten canines were positive for CPV-2 in the polymerase chain reaction (PCR). The sequencing and molecular characterization of the samples revealed CPV-2b subtype (with a mutation at aminoacid 426 – asparagine to aspartic acid) in dogs from Minas Gerais. Negative controls had no IHC labeling and were PCR negative for CVP-2. This study contributes to a better understanding of the distribution of canine Parvovirus in tissues being the tongue, tonsil, retropharyngeal lymph node, ileum and bone marrow among the tissues of choice for the IHC diagnosis of canine Parvovirus infection, and demonstrates that the CPV-2b subtype circulates in dog population of Minas Gerais.

INDEX TERMS: CPV-2, hemorrhagic enteritis, viral gastroenteritis, parvovirus

RESUMO.- Análise imuno-histoquímica da distribuição do parvovírus canino nos tecidos e identificação do subtipo CPV-2b em cães de Minas Gerais. Este trabalho teve por objetivo pesquisar, por meio da IHQ, a distribuição do Parvovírus canino nos tecidos de cães com lesões compatíveis com Parvovirose utilizando o anticorpo monoclonal anti-Parvovírus e caracterizar o subtipo circulante por PCR e sequenciamento. Para isso foram utilizados tecidos de 15 cães necropsiados no período de 2020 e 2021, sendo 10 cães com lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose e cinco controles negativos. As lesões mais frequentes na necropsia foram serosa do intestino delgado hiperêmica e granular, mucosa avermelhada e rugosa, com placas de Peyer evidentes; linfonodos retrofaríngeos e mesentéricos aumentados de tamanho e avermelhados. Microscopicamente foi visualizada necrose de criptas (9/10) e descamação celular para a luz, formando sincícios celulares (8/10), criptas dilatadas (5/10), atrofia e fusão de vilosidades intestinais (7/10), necrose e rarefação linfoide, mais acentuadas nas tonsilas palatinas (6/10) e linfonodos retrofaríngeos (6/10). Os tecidos mais frequentemente marcados na imuno-histoquímica (IHQ) para o CPV-2 foram língua (88,89%); tonsilas, linfonodos retrofaríngeos (77,78%); íleo (70%) e medula óssea (57,14%). Todos os dez cães foram positivos para CPV-2 na reação em cadeia pela polimerase (PCR). O sequenciamento e a caracterização molecular das amostras revelou o subtipo CPV-2b (com mutação no aminoácido 426 - asparagina para ácido aspártico). Os controles negativos não tiveram marcação IHQ e foram negativos na PCR para CPV-2. Este estudo contribui para o melhor conhecimento da distribuição do Parvovírus canino nos tecidos, com indicação de língua, tonsila, linfonodo retrofaríngeo, íleo e medula óssea como tecidos de eleição para o diagnóstico por IHQ da parvovirose canina, e demonstrou a circulação do subtipo CPV-2b na população canina da região do estudo em Minas Gerais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: CPV-2, enterite hemorrágica, gastroenterite viral, parvovirose

INTRODUÇÃO

O Parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é responsável por quadros de gastroenterite hemorrágica em cães (Kilian et al. 2018) e, mais raramente, de miocardite não supurativa em filhotes (Souto et al. 2018). A forma de gastroenterite é mais severa em filhotes de seis semanas a seis meses de idade (Housten et al. 1996). As lesões mais frequentemente encontradas em animais com parvovirose são avermelhamento e aspecto granular da serosa do intestino delgado (ID), devidos a efusão fibrinosa superficial, mucosa avermelhada, rugosa e com aspecto coureáceo, placas de Peyer evidentes, conteúdo intestinal mucoide, fluido ou hemorrágico (Oliveira et al. 2018, Uzal et al., 2016). Aumento de volume de linfonodos mesentéricos, esplenomegalia e atrofia do timo também podem ocorrer (Oliveira et al. 2009, Uzal et al. 2016). Microscopicamente podem ser observados necrose do epitélio das criptas intestinais, com dilatação e debris celulares ao centro e atrofia das vilosidades no intestino delgado (Oliveira et al. 2009, Goddard & Leisewitz, 2010, Uzal et al. 2016).

O diagnóstico em animais necropsiados é realizado principalmente pelas lesões intestinais, porém, quando há alterações pós-mortais no intestino ou lesões inespecíficas, a IHQ tem sido utilizada para detectar o vírus em outros tecidos (Oliveira et al. 2009). Raros estudos no Brasil realizaram a marcação IHQ em cães com parvovirose (Oliveira et al. 2009) e em gatos com panleucopenia felina (Castro et al. 2014) e em número menor de tecidos do que proposto neste estudo. Três variantes antigênicas do CPV-2; CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c foram identificadas mundialmente por meio de testes moleculares, podendo estar associadas a diferentes quadros epidemiológicos e gravidade de lesões (Hamamura 2017), sendo as três variantes encontradas no Brasil (Pereira et al. 2000, Costa et al. 2005, Streck et al., 2009, Castro et al. 2010; Pinto et al. 2012, Fontana et al. 2013, Hamamura 2017, Silva et al. 2017, Oliveira et al. 2018). Não foram encontradas informações sobre o(s) subtipo(s) do CPV-2 que ocorre(m) em Minas Gerais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição do Parvovírus canino nos tecidos por meio de IHQ e caracterizar o(s) subtipo(s) circulante(s) em Minas Gerais por meio de testes moleculares e sequenciamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e processamento de material para histopatologia

Nos anos de 2020 e 2021 foram coletadas amostras de tecidos de 15 caninos encaminhados para necropsia no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras, sendo 10 com lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose canina, como hiperemia e espessamento da mucosa intestinal, placas de peyer evidentes e linfocitose; e cinco caninos com idade inferior a um ano e sem lesões sugestivas de parvovirose utilizados como controles negativos. Fragmentos de coração (átrios, ventrículos e septo interventricular), língua, tonsila, ID (duodeno, jejuno e íleo), válvula ileocecal, intestino grosso (ceco, cólon e reto), traqueia, esôfago, baço, timo, linfonodos retrofaríngeos, linfonodos mesentéricos, medula óssea, pele, músculo esquelético, sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal), fígado, rim, pulmão e ovário ou testículo foram coletados em formalina tamponada a 10%. As amostras foram processadas rotineiramente para histopatologia e incluídas em parafina, cortadas em seções de 4µm e coradas com Hematoxilina e Eosina.

Imuno-histoquímica (IHQ)

Cortes adicionais de todos os tecidos foram dispostos em lâminas silanizadas e submetidos à marcação IHQ. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com protease XIV (Sigma Aldrich, EUA) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Foi empregado o anticorpo primário monoclonal anti-Parvovírus (MCA 2064-Serotec, EUA), na diluição de 1:1000, durante 16 horas (*overnight*) na temperatura de 4°C. Como anticorpo secundário foi utilizado o presente no kit Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP por uma hora na temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB (3,3-diaminobenzidina, DAKO) e a contracoloração foi feita com Hematoxilina (Oliveira 2009). Como controle negativo foram usados tecidos de cães sabidamente negativos para parvovirose e como controle positivo foram utilizadas amostras de cães previamente diagnosticados com parvovirose. A média de células marcadas foi considerada em três campos de maior aumento (Obj. 40x) e a marcação considerada como discreta (+, uma a cinco células marcadas por campo), moderada (++, seis a dez células por campo) e acentuada (+++, acima de 10 células por campo).

Análise molecular

As amostras de tecido dos cães ficaram armazenadas a -20°C até a análise molecular. O DNA genômico foi extraído do tecido com o maior número de células marcadas na IHQ de cada animal, sendo estes

duodeno, íleo, linfonodo mesentérico e baço. Amostras de cães negativos para parvovirose na IHQ foram utilizadas como controle negativo. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit Wizard SV Genomic Purification System (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados como primers os oligonucleotídeos (5'-CAGGAAGATATCCAGAAGGA-3' e 5'-GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA-3') para amplificação de parte do gene VP2 de CPV-2 (Desario et al. 2005). As reações foram realizadas em um termociclador (Thermal Cycler T960. Touch) de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de PCR (94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos), seguida por uma extensão final à 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel agarose a 1,5% e depois analisado em aparelho transluminador sob luz ultravioleta, com posterior captura das imagens (L.PIX Molecular Imaging-Loccus Biotecnologia, Brasil). O peso molecular esperado do produto amplificado é de 583 pb. Como controle positivo, a amostra viral vacinal (Novovac®Puppy DP-MSD, EUA) foi utilizada após extração do DNA. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura Milli-Q® (Decaro et al. 2007).

Purificação e sequenciamento das amostras

Para avaliar a heterogeneidade da população analisada, dez amostras representativas (uma de cada animal), positivas na PCR, foram selecionadas para o sequenciamento do fragmento de 583pb do gene VP2, as quais foram purificadas com Kit Invisorb® Fragment CleanUp 50 (Invitek, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA purificadas foram encaminhadas para o sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) sediado na UNESP – Câmpus de Jaboticabal. A reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos primers usados para amplificação, em um sequenciador de DNA automático de primeira geração (Método de Sanger) com 96 capilares, ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA). As corridas foram feitas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7, o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e controle interno com DNA de pGEM™-3Zf (+) fornecidos pela Applied Biosystems. As sequências de cada amostra *forward* e *reverse* foram submetidas ao processo de trimagem e montagem no programa DNASTar (Lasergene, EUA). Posteriormente esses produtos da montagem foram alinhados com as amostras de referência CPV-2a: número de acesso KM386823, CPV-2b: JF414817, CPV-2c: JF414826, baixadas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Oliveira et al. 2018) utilizando o algoritmo MUSCLE no software MEGA (Kumar et al. 2018). A posição 426 da sequência de aminoácidos foi comparada para cada isolado em relação às três amostras de referências utilizadas.

RESULTADOS

Nos dez cães com infecção por Parvovírus canino tipo-2, os principais sinais clínicos relatados foram, em ordem decrescente, diarreia (8/10), sangue nas fezes (5/10), vômito (7/10), mucosas pálidas (5/10), prostração (4/10), anorexia (1/10), tosse (1/10), dispneia (1/10) e choque circulatório (1/10). Os dados sobre sexo, idade, raça e protocolo vacinal dos caninos acometidos estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Resenha dos cães positivos para Parvovirus canino na IHQ e PCR

Canino	Sexo	Idade (meses)	Raça	Protocolo vacinal (doses)
1	Fêmea	4	Shih Tzu	3
2	Macho	5	Rhodesian	2
3	Macho	1m e15d	Bulldog Francês	1
4	Fêmea	2	SRD	1
5	Macho	3	SRD	1
6	Macho	11	SRD	3
7	Fêmea	5	SRD	Não informado
8	Macho	2	Rottweiler	Não vacinado
9	Fêmea	4	Rhodesian	2
10	Fêmea	5	SRD	Não informado

SRD: sem raça definida

Lesões macroscópicas

As lesões de necropsia foram mucosas pálidas (50% dos casos), intestino delgado (ID) com serosa de aspecto granular (70%), hiperemia (60%) (Fig. 1a) e hemorragia multifocal (50%); mucosa hiperêmica (60%) e rugosa/espessada (70%) (Fig.1b), placas de Peyer evidentes e com centro depressivo (90%) (Fig. 1a-b), conteúdo intestinal liquefeito e avermelhado (50%); linfonodos vermelho-escuros (50%), com aumento de volume dos linfonodos retrofaríngeos (30%) e mesentéricos (60%); baço exangue (50%) e coração discretamente globoso (10%).

Lesões histopatológicas

Os principais achados foram ID com atrofia (60%) e fusão das vilosidades (60%), colônias bacterianas na mucosa (30%), necrose de criptas (90%), caracterizada por picnose nuclear (40%), eosinofilia de citoplasma (50%), descamação de células para a luz (90%) e dilatação de criptas (50%) (Fig. 2-4). Algumas células encontravam-se aumentadas de volume (50% dos casos), com núcleos tumefeitos e citoplasma eosinofílico (40%) (metaplasia escamosa) (Fig. 2-3). As lesões envolviam duodeno (80%), jejuno (70%) e íleo (90%); a celularidade estava diminuída nos acúmulos linfoides da submucosa (40%) e havia hemorragia multifocal em mucosa e submucosa (60%); em válvula ileocecal havia necrose linfóide (20%), diminuição da celularidade (60%) (Fig.5a) e trombose (10%), sendo que em um animal esta se encontrava reativa (10%). No intestino grosso havia necrose e descamação de células para luz (30%), colônias bacterianas no topo da mucosa (20%) e depleção de células em acúmulos linfoides (30%). As tonsilas palatinas estavam congestionadas (30%), com hemorragias focais (10%), necrose (30%) e colônias bacterianas na superfície mucosa (10%), havia necrose de células linfóides (60%), diminuição da celularidade, sendo mais evidente nos centros germinativos (40%). Em um canino havia hiperplasia linfóide (10%). Em linfonodo retrofaríngeo foram observadas diminuição da celularidade, mais evidente nos centros germinativos (60%) (Fig.5b) e necrose com cariorrexe de linfócitos (30%). Em linfonodos mesentéricos havia diminuição da celularidade nos centros germinativos (50%), eritrofagocitose (70%) e hemossiderose (30%). No baço havia focos de necrose de células linfóides (30%), diminuição da celularidade em polpa branca (60%), diminuição da celularidade foi observada também em timo (20%) e medula óssea (40%). No coração foi observada eosinofilia discreta do sarcoplasma e picnose nuclear em cardiomiócitos (60%), calcificação focal discreta (10%). Em dois cães havia alterações pós-mortais afetando partes da mucosa intestinal.

Imuno-histoquímica (IHQ)

Dos tecidos de 15 cães submetidos à IHQ, 10 foram positivos para CPV, sendo a frequência e número de células marcadas demonstradas na Tabela 2. A língua foi o tecido com maior marcação nas células basais do epitélio pavimentoso estratificado, incluindo região das papilas. Esta marcação ocorreu no citoplasma ou abrangendo toda a célula (Fig.6). Na tonsila (Fig. 7) a marcação ocorreu em células do epitélio pavimentoso estratificado (citoplasma e célula como um todo) e de forma discreta nos acúmulos linfóides em região perifolicular e centro germinativo. Linfonodo retrofaríngeo (Fig. 8) com marcação moderada no manto folicular, nos linfonodos mesentéricos discreta no centro germinativo e manto folicular. Nos linfonodos a marcação foi comparada com os cortes de H.E. para fazer o diferencial com hemossiderose. Todo o ID foi positivo com marcação do epitélio das criptas, tanto em células intactas como descamadas para a luz (Fig.9-11), sendo somente em um animal acentuada. Esta marcação foi discreta nas células do ceco (Fig. 12), cólon e reto. Poucas células linfóides foram marcadas na medula óssea, válvula ileocecal (Fig. 11), baço e timo. Somente em um canino o epitélio esofágico foi marcado (Fig. 13).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

Amostras dos 10 cães submetidas a PCR foram positivas para Parvovírus (. O DNA extraído foi usado na diluição 1:50 (Fig. 14) e a análise do sequenciamento demonstrou que as amostras dos caninos-1 e 2 apresentaram similaridade com a referência CPV-2b no aminoácido 426 (ácido aspártico - [D]) (Figura 15). As demais sequências não puderam ser classificadas quanto ao tipo de CPV-2.

Tabela 2. Frequência e intensidade da marcação IHQ anti-Parvovírus canino em diferentes órgãos de cães com lesões de compatíveis com parvovirose

Órgão testado	Cães avaliados	Cães Positivos	%	Intensidade imunomarcção
Língua	9	8	88,89	++
Tonsila palatina	9	7	77,78	++
Linfonodo retrofaríngeo	9	7	77,78	++
Íleo	10	7	70,00	++
Linfonodo mesentérico	10	5	50,00	+
Cólon	10	5	50,00	+
Reto	10	5	50,00	+
Ceco	9	4	44,44	+
Duodeno	9	4	44,44	+++
Jejuno	10	4	40,00	++
Medula óssea	7	4	57,14	+
Válvula ileocecal	8	3	37,50	+
Baço	10	3	30,00	+
Timo	10	1	10,00	+
Esôfago	10	1	10,00	+
Coração	10	0	0,00	Negativo
Pele axila	10	0	0,00	Negativo
Músculo Esquelético	10	0	0,00	Negativo
Fígado	10	0	0,00	Negativo
Rim	10	0	0,00	Negativo
Adrenal	10	0	0,00	Negativo
Pâncreas	10	0	0,00	Negativo
Pulmão	10	0	0,00	Negativo
Traqueia	10	0	0,00	Negativo
Ovário	5	0	0,00	Negativo
Testículo	5	0	0,00	Negativo
SNC	10	0	0,00	Negativo
Estômago	10	0	0,00	Negativo
Bexiga urinária	10	0	0,00	Negativo

Média de células marcadas na IHQ em três campos de 400x: + (discreta, uma a cinco células por campo), ++, seis a dez células por campo), +++ (acentuada, acima de 10 células por campo).

DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve os achados macroscópicos, histopatológicos, imuno-histoquímicos de cães naturalmente infectados pelo Parvovírus canino e a ocorrência do subtipo CPV-2b em cães de Minas Gerais. Apesar do pequeno número de animais avaliados, 90% deles tinham menos de cinco meses de idade, ou seja, inclusos na faixa etária de seis semanas a seis meses de idade, considerada a mais frequentemente acometida (Houston et al. 1996). Dos cães do estudo, 50% não tinham raça definida, todos eram animais de proprietários e três haviam sido imunizados com, no mínimo, uma dose de vacina. Estes dados diferem de alguns autores, que os consideram mais suscetíveis por serem os mais frequentemente associados a situações de abandono e sem protocolos vacinais (Hamamura 2017, Pavan 2018, Oliveira et al. 2009).

As lesões intestinais observadas neste estudo, de serosa hiperêmica, granular e com hemorragias multifocais, mucosa rugosa e de aspecto coureáceo, placas de Peyer evidentes, associadas aos achados microscópicos de necrose de criptas com descamação das células epiteliais para o lúmen, atrofia e fusão de

vilosidades, são descritas em vários estudos sobre a infecção pelo CPV-2 (Oliveira et al. 2009, Uzal 2016, Oliveira et al. 2018). No entanto, como o intestino é um dos órgãos que mais rapidamente sofre alterações pós-mortais e devido ao tropismo do Parvovírus por células com elevada taxa de mitose (Uzal 2016), outros tecidos podem ser submetidos a análise IHQ para o diagnóstico da parvovirose (Oliveira et al. 2009). Neste estudo, nos casos de alterações pós-mortais (caninos 9 e 10) de parte do segmento intestinal, os linfonodos retrofaríngeos (caninos 9 e 10), língua e tonsila palatina (canino 9) foram importantes para a confirmação diagnóstica, sendo importante salientar que ambos foram positivos para CPV-2 na PCR. Rarefação/necrose linfóide, observada neste estudo, resulta da replicação do CPV-2 nos tecidos linfóides (Oliveira et al. 2009, Uzal 2016).

A língua foi o órgão com maior frequência de imunomarcagem (88,89%), achado semelhante ao descrito por McKnight et al. (2007) no qual a língua teve frequência de marcação semelhante ao intestino delgado; e difere dos achados de Oliveira et al. (2009), no qual a língua foi o terceiro tecido com mais marcação, depois de intestino delgado e revestimento epitelial da tonsila palatina. Apesar do baixo número de casos testados (2/3), em felinos com panleucopenia (Castro et al. 2014) a língua demonstrou ser um órgão promissor para o diagnóstico de infecção por Parvovírus, devido à melhor conservação e pela elevada taxa de mitose das células basais do epitélio pavimentoso estratificado, que favorece a multiplicação do vírus (McKnight et al. 2007, Oliveira et al. 2009).

As tonsilas palatinas, os linfonodos retrofaríngeos e o íleo foram os tecidos com maior frequência de marcação depois da língua, sendo que no ID ocorreu marcação em maior número de células. Apesar de trabalhos experimentais sobre Parvovírus canino descreverem que este é detectado no primeiro e segundo dia após inoculação em tonsilas palatinas, linfonodos retrofaríngeos e mesentéricos e somente após o quarto e quinto dia de inoculação no ID (Meunier et al. 1985), neste estudo, apesar do número de células marcadas ser maior no ID, a marcação em outros tecidos, como língua e acúmulos linfóides, ocorreu simultaneamente, sugerindo que o vírus ainda se encontra em replicação nesses tecidos. Neste estudo ocorreu marcação no intestino grosso e no esôfago, apesar de menor frequência e número de células marcadas, não há descrição em outros trabalhos para comparação, mas esses tecidos se encontram no trajeto do vírus, são tecidos em que pode ocorrer divisão celular, de forma que podem apresentar menor carga viral. Estas informações devem ser confirmadas em novos estudos e com maior número de animais.

O subtipo CPV-2b foi o agente causador da parvovirose nos caninos 1 e 2, ambos menores de um ano de idade e com histórico de mais de uma dose de vacina. O subtipo foi confirmado por uma mutação no aminoácido 426 (ácido aspártico) (Parrish et al. 1991). As demais sequências não puderam ser classificadas quanto ao subtipo de CPV-2. No Brasil, parece ter predominado os subtipos 2a e 2b até 2010, com base na data de coleta das amostras em São Paulo (Pereira et al. 2000), Rio de Janeiro (Costa et al. 2005, Castro et al. 2010) e Rio Grande do Sul (Streck et al. 2009, Pinto et al. 2012). A partir de 2010, o subtipo 2c foi identificado em Cuiabá/MT (Fontana et al. 2013), Palotina/PR (Hamamura 2017), Santa Maria e Porto Alegre/RS (Oliveira et al. 2018). Já em 2017, o subtipo 2b foi identificado em Belém/PA (Silva et al. 2017). Esses achados sugerem que os três subtipos estão presentes em vários Estados brasileiros, porém sem testagem, na maioria deles.

Este estudo demonstrou que língua, tonsila palatina, linfonodo retrofaríngeo, íleo e medula óssea são tecidos de eleição para o diagnóstico IHQ da parvovirose canina e demonstra que o subtipo CPV-2b infecta cães de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- Carman P.S. & Povey R.C. 1985. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs - histopathology and antigen identification in tissues. *Research in Veterinary Science*. 38(2):141-150. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31817-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31817-4)>
- Castro T.X. et al. 2010. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:1093-1098. <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400031>>
- Castro N.B., Rolim V.M, Hesse K.L., Oliveira E.C., Almeida, P. Wouters A.T., Driemeier D. & Sonne L. 2014. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em felinos domésticos com panleucopenia felina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34 (8):770-775. <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000800011>>

- Castro M., Wilson T., Silva S. & Medeiros A. 2016. Miocardite com corpúsculo de inclusão de parvovirus em um filhote de cão maltês - Relato de caso. *Enciclopédia Biosfera*. 13(24):724-730 <http://dx.doi.org/10.18677/EnciBio_2016B_068>
- Costa A.P. et al. 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. <<https://doi.org/10.1007/s11259-005-3865-9>>
- 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?. *Journal of Virological Methods* 126(1-2): 179-185. <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006>>
- Duque G.Y., Echeverri Z.M., Trejos S. J. & Ruiz S. J. 2017. Prevalence and molecular epidemiology of canine Parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Veterinary Microbiology*. 201:56-61. <[10.1016/j.vetmic.2016.12.039](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.039)> <PMID: 28284623>
- Fontana D. 2012. Detecção e caracterização do parvovírus canino na região metropolitana de Cuiabá , Mato Grosso, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso. 47p.
- Fontana D. S. et al. 2013. A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in midwestern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(2): 214-218. <<https://doi.org/10.1007/s11259-005-3865-9>>
- Goddard A. & Leisewitz A.L. 2010. Canine Parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* . 40(6):1041-53. <[10.1016/j.cvsm.2010.07.007](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007)>
- Hamamura M. 2017. Diagnóstico e caracterização molecular do parvovírus canino em cães com gastroenterite da região Oeste do Paraná. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Palotina-BR. 71p.
- Kumar S. et al. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6):1547. <<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>>
- Melo T. F. 2020. Prognóstico de cães infectados com Parvovírus canino 2 (CPV-2). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. 66 p.
- Meunier P. C. et al. 1985. Pathogenesis of canine Parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Veterinary Pathology*, 22:680-686. <<https://doi.org/10.1177/030098588502200617>>
- Miranda C. & Thompson G. 2016. Canine Parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J Gen Virol*. 97(9):2043-2057. <[10.1099/jgv.0.000540](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540)> <PMID: 27389721>
- Oliveira E.C. 2007. Achados patológicos e avaliação imunoistoquímica em cães com parvovirose canina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 47 p.
- Oliveira E.C. et al. 2009. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(2):131-136. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000200008>>
- Oliveira P.S. et al. 2018. Epidemiological, clinical and pathological features of canine parvovirus 2c infection in dogs from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38:113-118. <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5122>>
- Parrish C.R. et al. 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 65:6544-6552. <<https://doi.org/10.1128/jvi.65.12.6544-6552.1991>>
- Pavan T.R. 2018. Parvovirose canina – Revisão de literatura. Monografia para obtenção do grau de Especialista em Análises Clínicas Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 29 p.

Pereira C.A.D. et al. 2000. Molecular characterization of canine Parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology*, 75:127-133. < [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00214-5)>

Pinto L., Streck A., Gonçalves K., Souza C., Corbellini A., Corbellini L. & Canal C. 2012. Typing of canine Parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Research*, 165(1):29-33. < <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.001>>

Rodrigues A. F. 2005. Estudo retrospectivo da parvovirose canina diagnosticada no LPA do HV da UFCG do município de Patos-PB. Monografia para obtenção do grau de Especialista em Análises Clínicas Veterinárias. 40p.

Silva S.P. et al. 2017. Full-length genomic and molecular characterization of canine Parvovirus in dogs from North of Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 16(3):1-8. < <https://doi.org/10.4238/gmr16039719>>

Souto E. et al. 2018. Outbreak of parvoviral myocarditis in puppies in Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(1):94-98. < <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4787>>

Streck A.F. et al. 2009. First detection of canine Parvovirus type 2c in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:465-469. < <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300008>>

FIGURAS

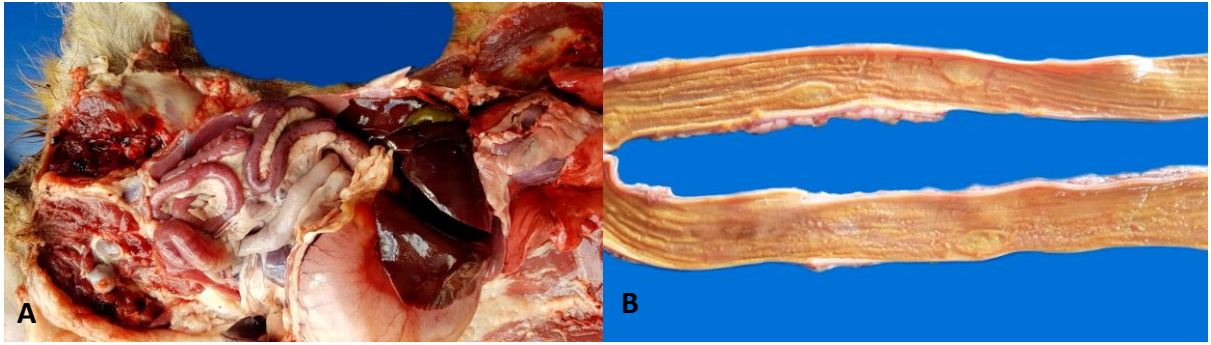


Figura 1. Lesões macroscópicas no intestino delgado de cães infectados por Parvovírus canino. (A) Canino 5, hiperemia segmentar da serosa do jejunum e íleo. (B) Canino 10, mucosa de aspecto granular e placas de Peyer evidentes e com centro depressivo.

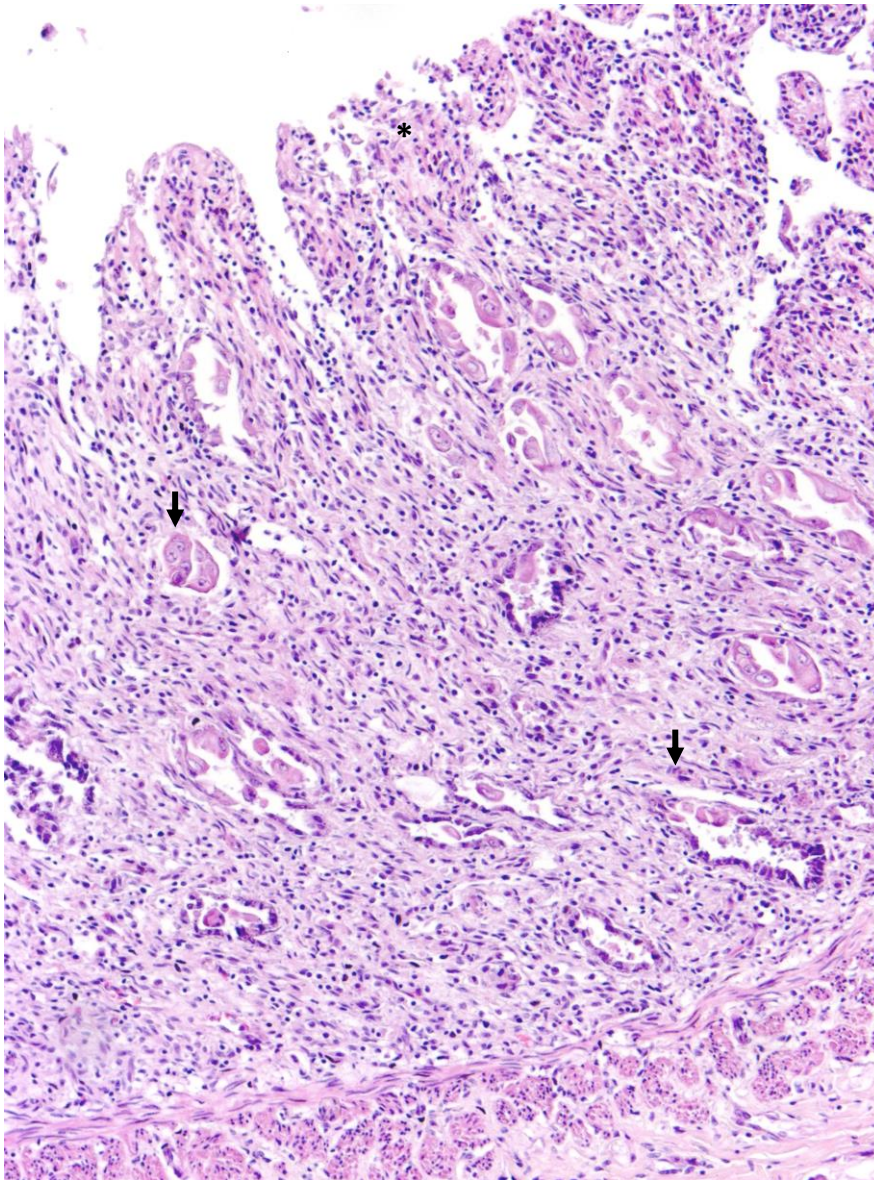


Figura 2. Parvovirose canina. Canino 3. Duodeno com necrose e descamação acentuada das células epiteliais das criptas (seta) e fusão das vilosidades (*). H.E, Obj. 10X.

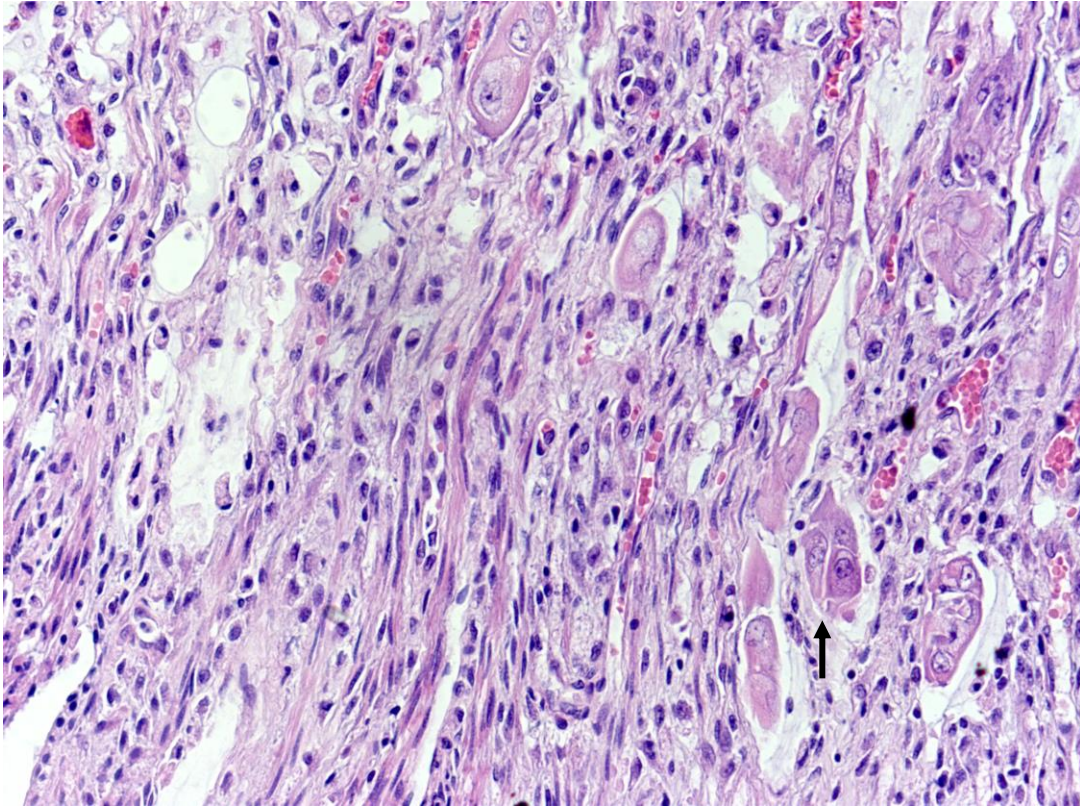


Figura 3. Parvovirose canina. Canino 8. Duodeno com metaplasia escamosa do epitélio das criptas (seta). H.E. Obj. 40x.

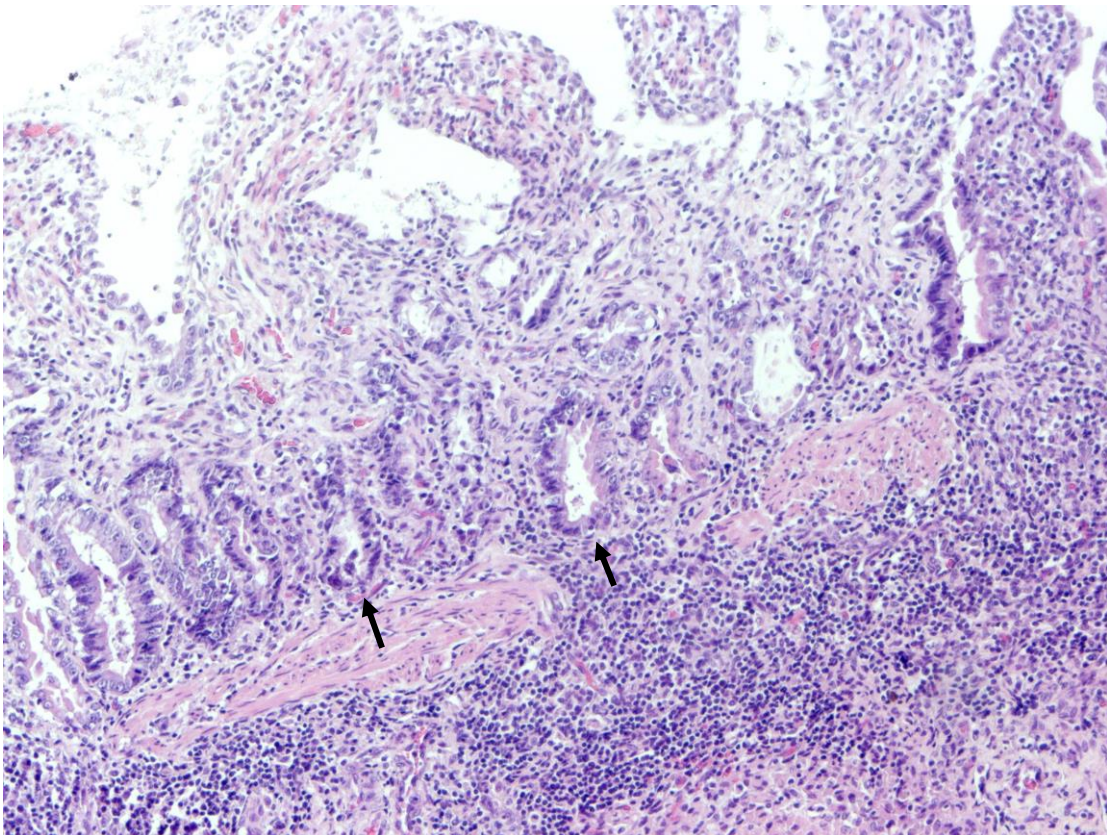


Figura 4. Parvovirose canina. Canino 4. Íleo com necrose e dilatação de criptas (seta). H.E. Obj. 20x.

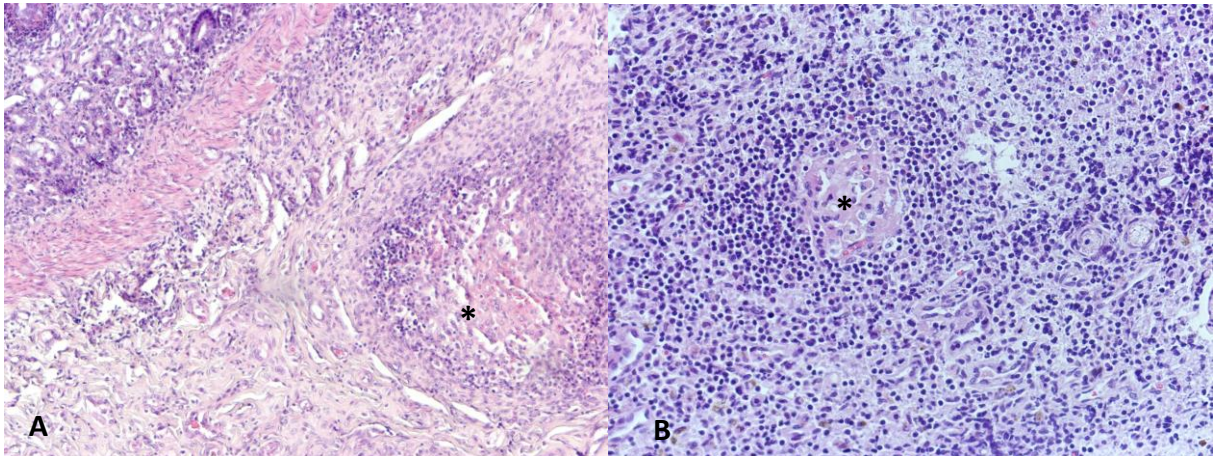


Figura 5. Parvovirose canina. Rarefação linfóide em região central de folículo linfóide. (A) Canino 4, válvula ileocecal (*). H.E., Obj. 20x. (B) Canino 1, linfonodo retrofaríngeo (*). H.E., obj. 10x.

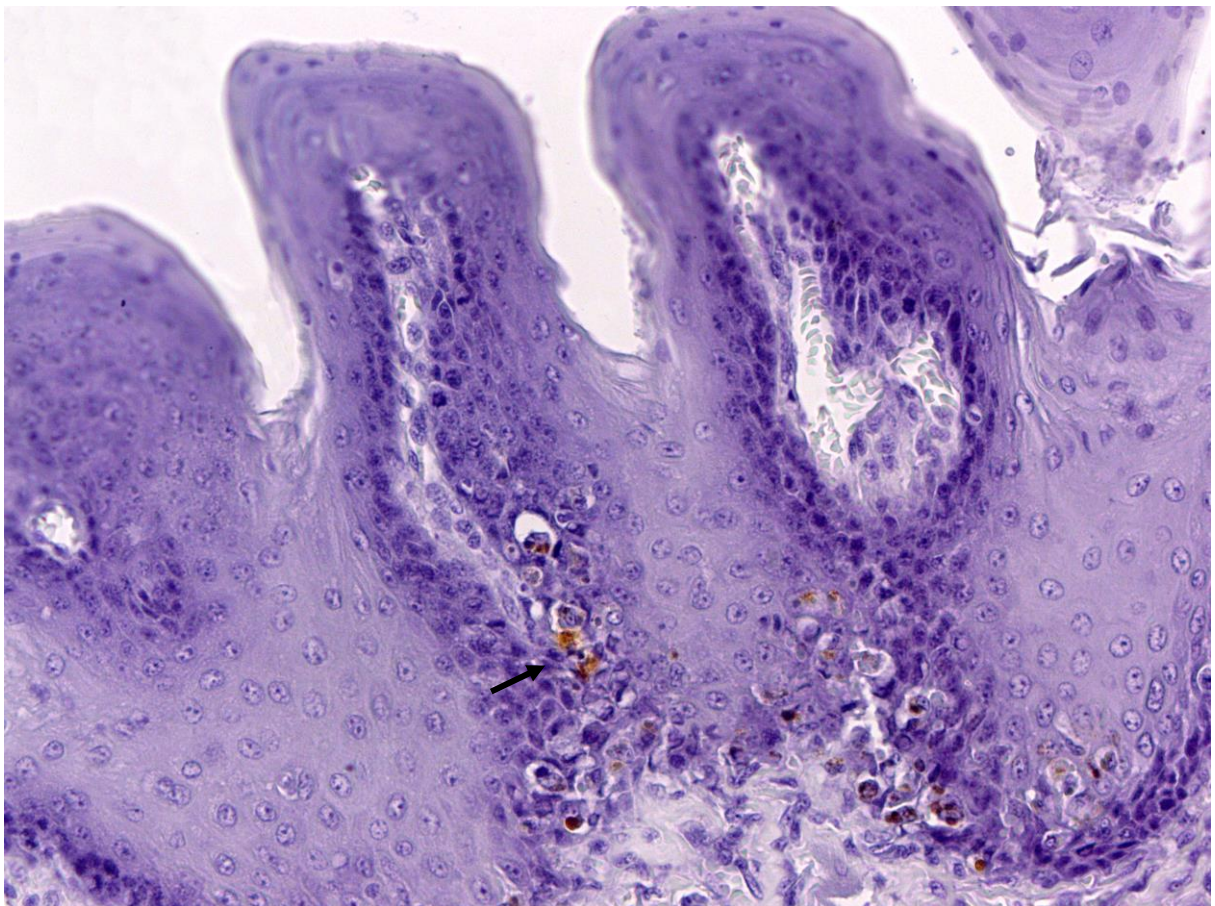


Figura 6. Canino 4. Marcação anti-Parvovírus canino nas células basais do epitélio pavimentoso estratificado da superfície dorsal da língua (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20X

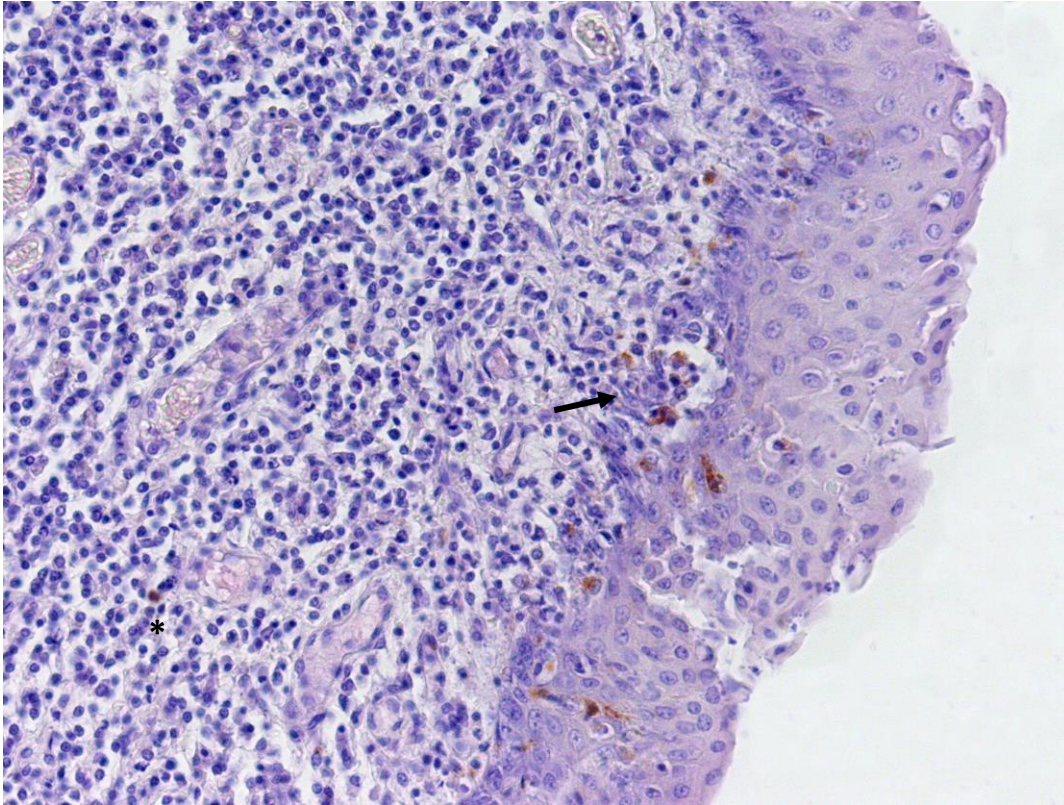


Figura 7. Canino 2. Marcação anti-Parvovírus canino nas células do epitélio pavimentoso estratificado da tonsila (seta) e raras no tecido linfóide (*). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20X.

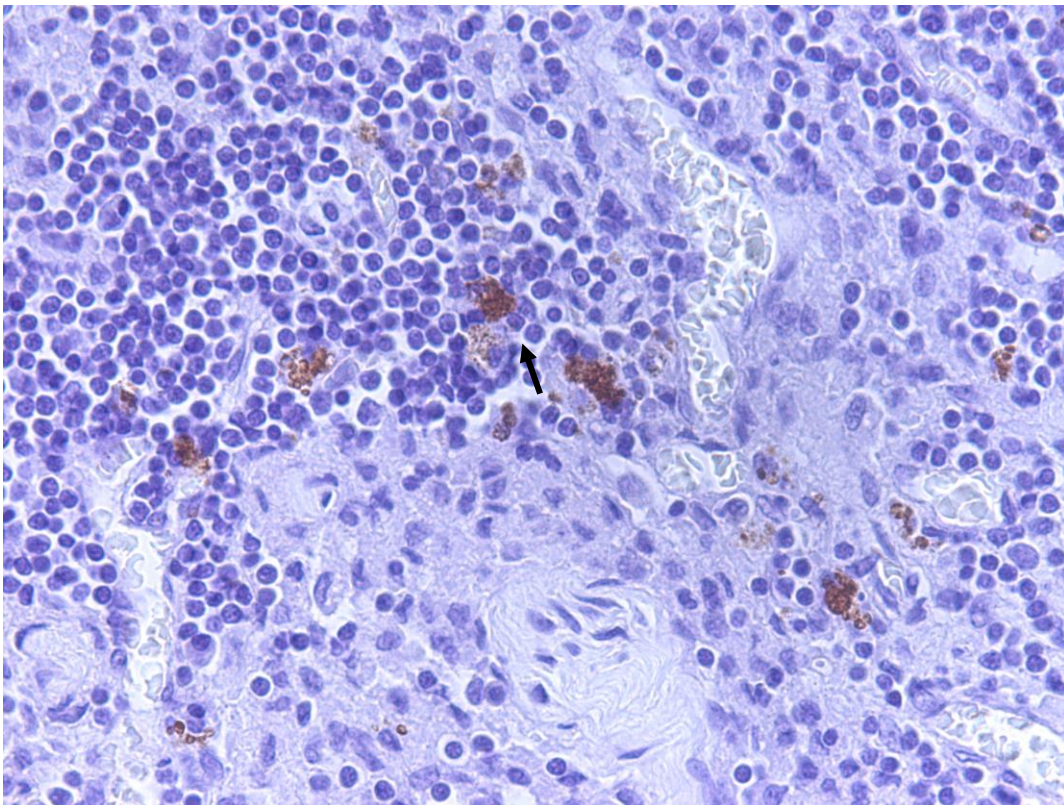


Figura 8. Canino 1. Marcação anti-Parvovírus canino em células linfóides do linfonodo retrofaríngeo (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 40X.

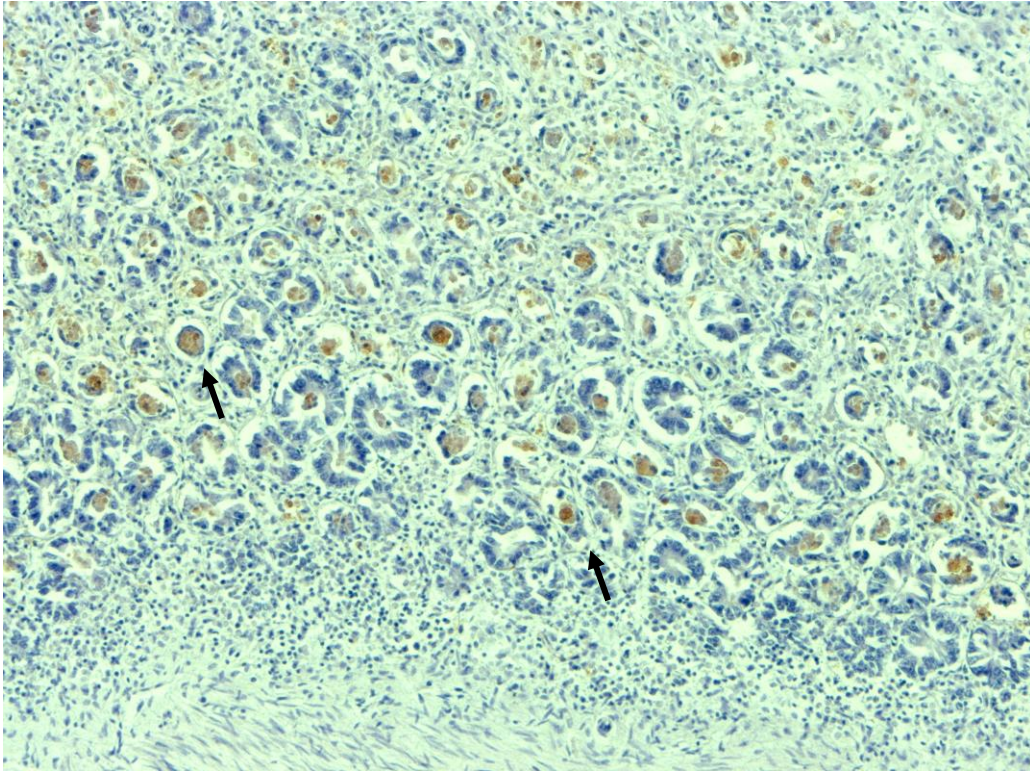


Figura 9. Canino 2. Íleo. Marcação anti-Parvovírus canino nas células descamadas e intactas do epitélio das criptas (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj.10X.

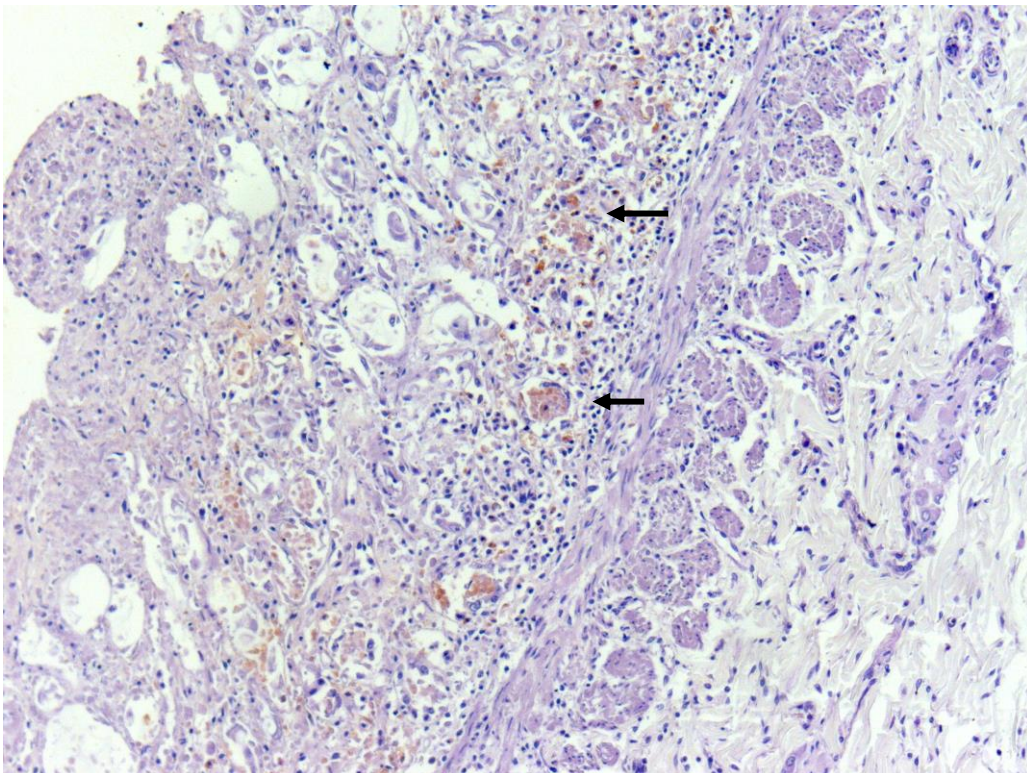


Figura 10. Canino 2. Duodeno. Marcação anti-Parvovírus canino em células descamadas e intactas do epitélio das criptas (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20X.

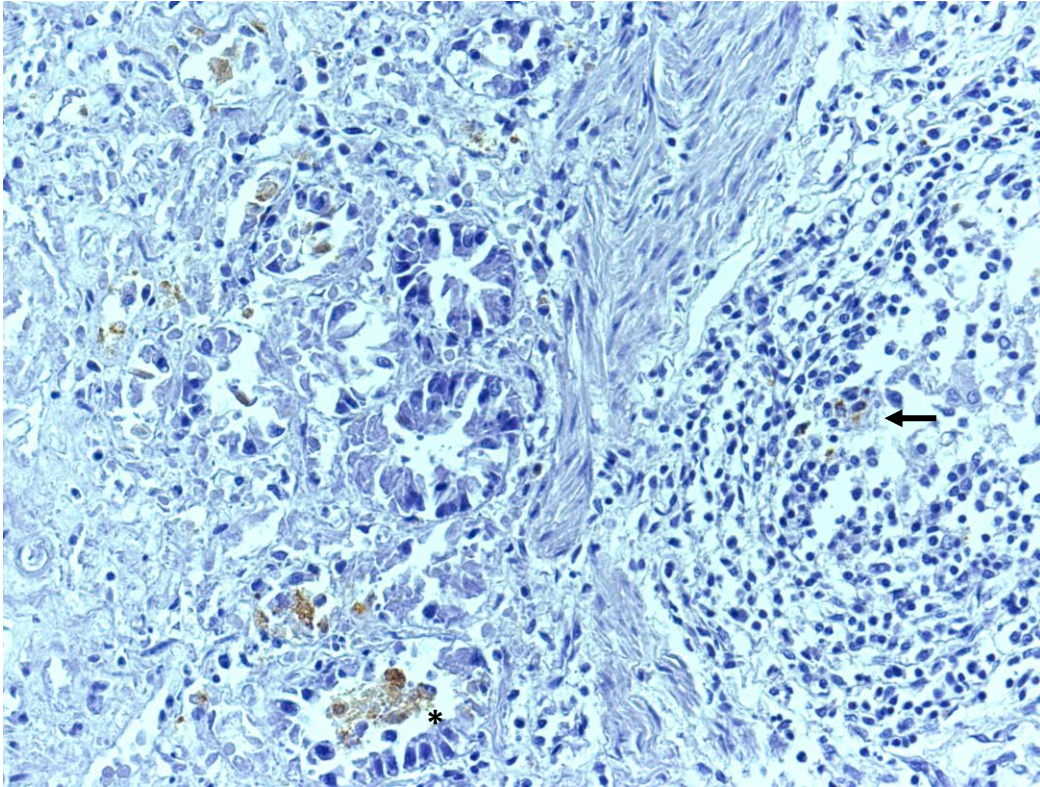


Figura 11. Canino 2. Válvula ileocecal. Marcação anti-Parvovírus canino em células epiteliais descamadas e intactas da mucosa (*) e em poucas células linfoides da submucosa (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20X.

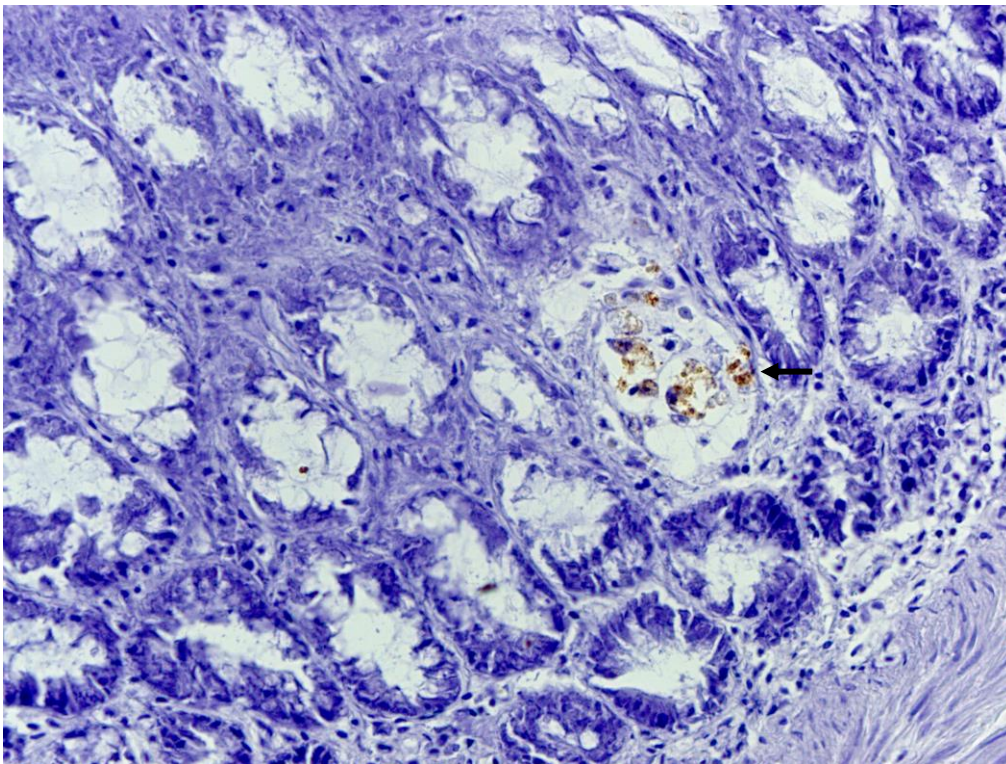


Figura 12. Canino 9. Ceco. Marcação anti-Parvovírus canino em células epiteliais descamadas da mucosa (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x.

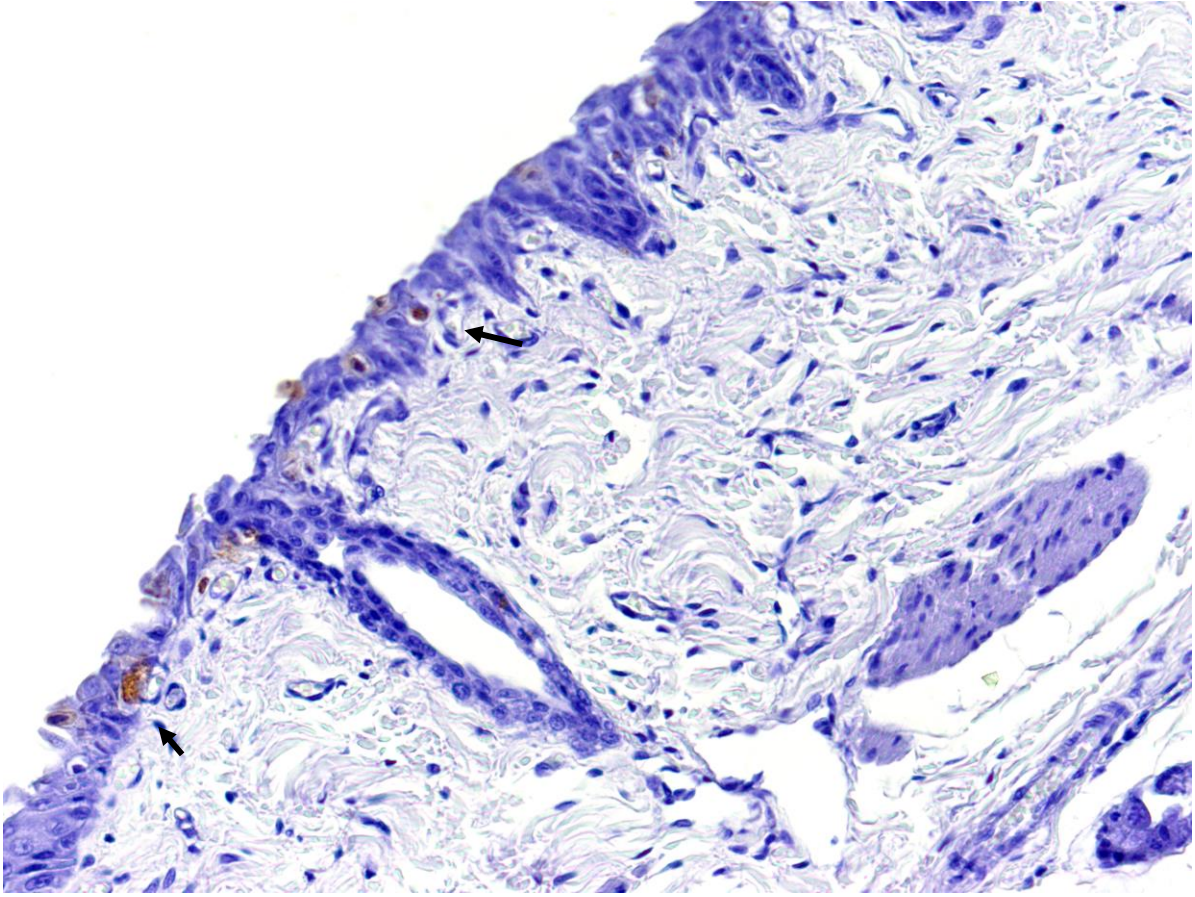


Figura 13. Canino 8. Esôfago. Marcação anti-Parvovírus canino em células do epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado (seta). IHQ pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Obj. 20x.

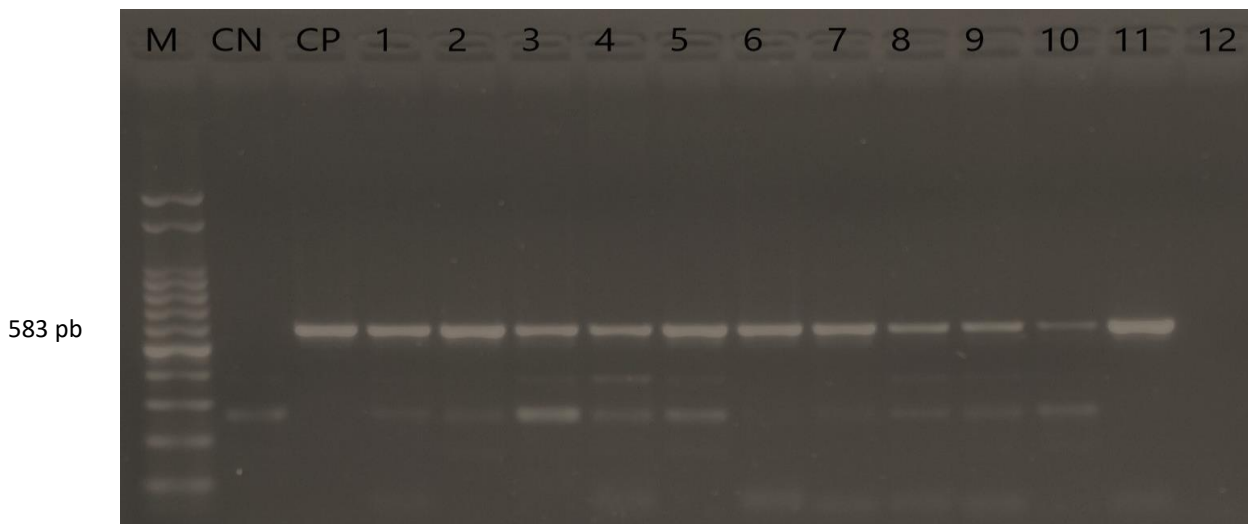


Figura 14. Parvovírus canino detectado por PCR. M: Marcador de peso molecular (100pb). CN: Controle negativo. CP: Controle positivo. 1-10: DNA (diluição 1:50) das amostras positivas de caninos. 11: amostra vacinal diluída. 12: Água Milli Q.

ANEXO 1**IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS**

Canino 1 – N373-2020

Canino 2 – N379-2020

Canino 3 – N361-2020

Canino 4 – N350-2020

Canino 5 – N359-2020

Canino 6 – N395-2020

Canino 7 – N450-2020

Canino 8 – N416-2020

Canino 9 – N417-2020

Canino 10 – N396-2020

Canino 11 – N358-2020

Canino 12 – N451-2020

Canino 13 – N391-2020

Canino 14 – N43-2021

Canino 15 – N84-2021

ANEXO 2 – Resultado da marcação imuno-histoquímica nos caninos positivos para PCV-2

Órgão/cão	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Língua	++	++	+	+++	+	+	-	+	++	NA
Tonsila palatina	++	++	+	NA	-	+	+	++	++	-
Duodeno	+++	+++	-	+++	-	+	-	-	NA	A
Jejuno	+++	+++	-	+++	+	+	-	-	-	-
Íleo	++	+++	+	+	++	+	-	+	A	-A
Válvula ileocecal	+	+++	-	-	NA	NA	-	+++	-	-
Ceco	+	+	-	+	NA	-	-	++	-	-
Cólon	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Reto	+	++	-	+	-	+	-	++	-	-A
Átrios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ventrículos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Septo IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ln.retrofaríngeo	+++	NA	-	-	+++	++	+	++	+	++
Ln. mesentérico	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Pele axila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Timo	-	-	-	+	-	AU	AU	-	-	-
Medula óssea	NA	+	NA	NA	++	+	+	-	-	-
M. esquelético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adrenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pâncreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
Pulmão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esôfago	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Traqueia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
Testículo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estômago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bexiga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NA = Não avaliado, A = Autólise, Contagem de células com marcação por campo 40X: 0 = -, 1-5 = +, 6-10 = ++, + de 10 = +++; IV= interventricular

Anexo 3. Ordem dos isolados no Gel PCR Parvovirus, 583 bp

Poço	Amostra	Identificação Tecido	Gel 1 Diluição 1:5	Gel 2 Diluição 1:10	Gel 3 Diluição 1:50
1	Marcador	Marcador	Marcador	Marcador	Marcador
2	11 (CN)	N358-20/Duodeno	Negativo	Negativo	Negativo
3	CP	Vacina	Positivo	Positivo	Positivo
4	1	N359-20/Íleo	Positivo	Positivo	Positivo
5	2	N373-20/Duodeno	Positivo	Positivo	Positivo
6	3	N417-20/Duodeno	Negativo	Negativo	Positivo
7	4	N450-20/Ln. mesentérico	Positivo	Positivo	Positivo
8	5	N416-20/Íleo	Negativo	Positivo	Positivo
9	6	N361-20/Íleo	Positivo	Positivo	Positivo
10	7	N350-20/Duodeno	Negativo	Positivo	Positivo
11	8	N396-20/Baço	Negativo	Negativo	Positivo
12	9	N395-20/Duodeno	Negativo	Negativo	Positivo
13	10	N397-20/Íleo	Positivo	Positivo	Positivo
14	11 (CP)	Vacina diluída	Positivo	Negativo	Positivo
15	12 (CN)	Água	Negativo	Negativo	Negativo

CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo