



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE GIUSEPPA SPERA

**IDENTIFICAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO EM ANIMAIS  
SILVESTRES BRASILEIROS DE VIDA LIVRE**

---

Londrina  
2016

CAROLINE GIUSEPPA SPERA

**IDENTIFICAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO EM ANIMAIS  
SILVESTRES BRASILEIROS DE VIDA LIVRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-25 graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade 27 Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri.

Londrina  
2016

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S749i Spera, Caroline Giuseppa.  
Identificação de parvovírus canino em animais silvestres brasileiros de vida livre /  
Caroline Giuseppa Spera. - Londrina, 2016.  
74 f.: il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Animais silvestres - Doenças - Brasil. - Teses. 2. Parvovirose. - Teses. 3.  
Parvovírus. - Teses. 4. Virologia veterinária. - Teses. I. Alfieri, Alice Fernandes. II.  
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636(81)

CAROLINE GIUSEPPA SPERA

**IDENTIFICAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO EM ANIMAIS  
SILVESTRES BRASILEIROS DE VIDA LIVRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-25  
graduação em Ciência Animal (área de  
concentração: Sanidade Animal) da Universidade 27  
Estadual de Londrina, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Carlos Roberto Teixeira  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho - UNESP

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Lucas Alécio Gomes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de setembro de 2016.

1 O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento  
2 de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de  
3 Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa  
4 de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob  
5 orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri.

6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às  
25 agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

26  
27 - **CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC.**

28 - **CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT.**

29 - **FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico**  
30 **do Paraná / SETI-PR.**

31 - **FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT.**

32  
33  
34

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

Agradeço à Deus, pela vida e por guiar meus caminhos.

À minha família por me apoiar e permitir fazer o que amo.

À minha universidade, por me proporcionar além de conhecimento, anos felizes e amigos leais.

Aos meus orientadores Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Fernandes Alfieri e Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Amauri Alcindo Alfieri, da Universidade Estadual de Londrina, por toda ajuda e por acreditarem no meu trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elis, por ser incrivelmente solícita e gentil.

À família LabViral, por cada prosa e cafezinho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Carlos Teixeira, por me acolher de braços abertos e me incentivar na realização desse estudo.

À equipe do CEMPAS, por todo auxílio e por me ensinar a amar e trabalhar com animais silvestres.

Aos meus animais, aos pacientes com tutores e os de vida livre, que me inspiram e modificam diariamente o meu ser, toda minha gratidão!

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32



*"There is a pleasure in the pathless woods,  
There is a rapture on the lonely shore,  
There is society, where none intrudes,  
By the deep Sea, and music in its roar:  
I love not man the less, but Nature more."*

*(Lord Byron)*

---

SPERA, Caroline Giuseppa. **Identificação de parvovírus canino em animais silvestres brasileiros de vida livre**. 2016. 73 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

### RESUMO

O parvovírus canino (CPV) é o agente causal da parvovirose canina que ocasiona enterite e miocardite grave em cães jovens. O CPV tipo 2 (CPV-2) emergiu como uma variante do vírus da panleucopenia felina (FPV) o qual foi adaptado ao hospedeiro canino por carnívoros selvagens. Atualmente o CPV-2 é classificado em três subtipos: CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. Estes subtipos cocirculam em frequência variável dependendo da localidade geográfica. O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) está presente em todos os biomas brasileiros e em alguns países da América do Sul. O quati (*Nasua nasua*) pertence à fauna silvestre da América do Sul e está amplamente distribuído no território brasileiro. O presente estudo teve como objetivo verificar o envolvimento de agentes infecciosos virais como causa da morte de um filhote de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e verificar a presença de vírus entéricos em uma população de quatis de vida livre. Amostras de fezes de 21 quatis (*Nasua nasua*) (ambos os sexos, diferentes faixas etárias e aspectos das fezes) foram coletadas de uma população de quatis que habita uma reserva ambiental em Palmital, São Paulo, para pesquisa de CPV-2 e Rotavírus (RV) por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), respectivamente. A PCR foi realizada com intuito de amplificar um fragmento de 583pb do gene VP2 do CPV-2. Para a pesquisa de agentes infecciosos virais, tais como o vírus da cinomose canina (CDV), o adenovírus canino A tipo 1 e tipo 2 (CAvV-1 e CAvV-2), o herpesvírus canino 1 (CaHV-1) e o CPV-2 como causa da morte de um filhote do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre, fragmentos de órgãos foram coletados e submetidos a técnicas moleculares (PCR e RT-PCR). Os produtos de PCR do CPV-2 foram sequenciados e as sequências de nucleotídeo (nt) e aminoácido (aa) obtidas foram analisadas. Das 21 amostras de fezes de quatis analisadas, oito (38%) foram positivas para CPV-2 na técnica de PCR e nenhuma foi positiva para RV na EGPA. As amostras de quati positivas para CPV-2 exibiram 100% de identidade de nt com a cepa protótipo de CPV-2b (CPV-39) e na árvore filogenética agruparam com as cepas pertencentes ao CPV-2b. Dos oito fragmentos de órgãos do cachorro-do-mato avaliados apenas o fragmento do coração foi positivo para o CPV-2 na PCR e as amostras foram negativas para os outros vírus avaliados. A amostra de cachorro-do-mato positiva para CPV-2

1 apresentou 99,6% de identidade de nt com o protótipo CPV-2b (CPV-39) e na árvore  
2 filogenética agrupou com cepas CPV-2b. O presente estudo relata a detecção de CPV-2b em  
3 um filhote de cachorro-do-mato de vida livre no Brasil e também relata a presença de CPV-2b  
4 em quatis assintomáticos que podem eliminar o vírus nas fezes sendo importantes elos na  
5 transmissão e na permanência do CPV em populações de animais domésticos e silvestres.

6  
7 **Palavras-chave:** CPV-2b; *Cerdocyon thous*; *Nasua nasua*; animais silvestres brasileiros de  
8 vida livre.

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

SPERA, Caroline Giuseppa. **Identification of canine parvovirus in the wild animals Brazilian wildlife**. 2016. 73 f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

### ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV) is the causal agent of canine parvovirus that causes enteritis and myocarditis in young dogs. The CPV type 2 (CPV-2) emerged as a variant of feline panleukopenia virus (FPV) which is adapted to the canine host by wild carnivores. Currently the CPV-2 is classified into three subtypes: CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. These subtypes co-circulate in a variable frequency depending of the geographic location. The Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) is present in all Brazilian biomes and in some countries of South America. The coati (*Nasua nasua*) belongs to the wildlife of South America and is widely distributed in Brazil. This study aimed to verify the involvement of viral infectious agents as the cause of death of a young Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and to verify the presence of enteric viruses in a population of free-living coatis. Fecal samples of 21 coatis (*Nasua nasua*) (both sexes, different ages and aspects of faeces) were collected from a population of coatis that inhabits an environmental reserve in Palmital city, São Paulo, to search the CPV-2 and Rotavirus (RV) using the polymerase chain reaction (PCR) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), respectively. The PCR was performed to amplify a fragment of 583bp of the VP2 gene from CPV-2. For researching the viral infectious agents, such as canine adenovirus type 1 and type 2 (CADV-1 and CADV-2), canine herpesvirus type 1 (CaHV-1) and CPV-2 as cause of death of a puppy Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) free life, tissue fragments were collected and submitted to molecular techniques (PCR and RT-PCR). The CPV-2 PCR products were sequenced and the nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences obtained were analyzed. Of the 21 fecal samples from coatis analyzed, 8 (38%) were positive for CPV-2 in PCR and none was positive to RVA in PAGE. The coati samples positive for CPV-2 exhibited 100% of nt identity with the CPV-2b prototype strain (CPV-39) and in the phylogenetic tree grouped with strains that belong to CPV-2b. Of the eight organ fragments of the Crab-eating fox evaluated only the heart fragment was positive for CPV-2 in PCR and the samples were negative for the other evaluated virus. The Crab-eating fox positive sample for CPV-2 showed 99.6% of nt identity with the CPV-2b prototype strain (CPV-39) and in the phylogenetic tree grouped with CPV-2b strains. This study reports the CPV-2b detection in a puppy Crab-eating fox free life in Brazil and also describes the

1 presence of CPV-2b in asymptomatic coatis that can eliminate the virus in the feces and are  
2 important in the transmission and permanence of CPV in domestic and wild animal  
3 populations.

4  
5 **Keywords:** CPV-2b; *Cerdocyon thous*; *Nasua nasua*; wild animals Brazilian wildlife.

6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

1

2 **Revisão de Literatura**

3 **Figura 1** - Imagem de representantes da espécie *Nasua nasua* pertencentes ao Horto Florestal  
4 de Palmital SP .....4

5 **Fig. 2** - Imagem de representantes da espécie *Cerdocyon thous* pertencentes ao CEMPAS,  
6 Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens, da UNESP Campus de Botucatu  
7 SP.....6

8 **Fig. 3** - Partículas de CPV-2 em amostras fecais de cães com gastroenterite observadas por  
9 microscopia eletrônica.....7

10 **Fig. 4** - Sequência nucleotídica do genoma do Parvovírus Humano B19. Estrutura em gancho  
11 e sequências palindrômicas.....9

12 **Fig. 5** - Relações filogenéticas entre os parvovírus dos carnívoros, baseadas no gene da  
13 proteína VP2 do capsídeo.....10

14 **Fig. 6** - Relações filogenéticas entre os parvovírus dos carnívoros, baseadas no gene que  
15 codifica a proteína VP2 do capsídeo.....12

16 **Artigo A**

17 **“Identificação de parvovírus canino 2b em um cachorro-do-mato *Cerdocyon thous***  
18 **(Linnaeus, 1766) de vida livre”.**

19 **Figura 1** - Filhote de Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*) durante a necropsia.....55

20 **Fig. 2** - Palidez de mucosa oral de filhote de Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*).....55

21 **Fig. 3** - Efusão abdominal serosa em filhote de Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*)  
22 .....55

23 **Fig. 4** - Área de hemorragia em miocárdio (seta).....56

1	<b>Fig. 5</b> - Corte histológico de pulmão demonstrando pneumonia intersticial com infiltrado de	
2	células inflamatórias mononucleares.....	56
3	<b>Fig. 6</b> - Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeo do gene VP2 da cepa	
4	descrita neste estudo e de cepas representativas dos três subtipos do	
5	CPV.....	57
6	<b>Artigo B</b>	
7	<b>“Identificação de parvovírus canino 2b em uma população de quatis <i>Nasua nasua</i></b>	
8	<b>(Linnaeus, 1766) de vida livre”.</b>	
9	<b>Figura 1</b> - Representantes da espécie <i>Nasua nasua</i> pertencentes ao Horto Florestal de	
10	Palmital – SP. ....	70
11	<b>Fig. 2</b> - Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeo (500 nt) do gene VP2 das	
12	cepas descritas neste estudo e de cepas representativas dos três subtipos de CPV-2. As cepas	
13	de CPV-2b do presente estudo estão destacadas com um círculo preto.....	72
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

---

**Artigo A**

**“Identificação de parvovírus canino 2b em um cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) de vida livre”.**

**Quadro 1** - Índices hematológicos do filhote de *Cerdocyon thous*, Botucatu, novembro de 2014.....58

**Quadro 2** - Alinhamento das sequências de aminoácido de um fragmento de 583 pb do gene VP2 amplificado por PCR (407-456 aa). As sequências alinhadas correspondem a uma cepa vacinal CPV-2 (CPV-b, M38245), uma cepa que representa o CPV-2a (CPV-15, M24003), uma cepa que representa o CPV-2b (CPV-39, M74849) e uma cepa que representa o CPV-2c (56/00, FJ222821). A posição 426 está destacada em negrito .....58

**Artigo B**

**“Identificação de parvovírus canino 2b em uma população de quatis *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) de vida livre”.**

**Quadro 1** - Informações sobre os animais avaliados e resultados para CPV-2 na PCR. (\*) amostras positivas.....73

**Quadro 2** - Alinhamento das sequências de aminoácido de um fragmento do gene VP2 amplificado por PCR (407-440 aa). As sequências alinhadas correspondem a uma cepa vacinal CPV2 (CPV-b, M38245), uma cepa representante do CPV-2a (CPV-15, M24003), uma cepa representante do CPV-2b (CPV-39, M74849) e uma cepa representante do CPV-2c (56/00, FJ222821). A posição 426 está destacada em negrito.....73

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

- 1
- 2
- 3 aa: Aminoácidos
- 4 Ala: Alanina
- 5 ARDS: Síndrome do *Stress* Respiratório Agudo
- 6 Arg: Arginina
- 7 Asn: Asparagina
- 8 Asp: Aspartato
- 9 CEMPAS: Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens
- 10 cm: Centímetros
- 11 CPV: Parvovírus canino
- 12 CPV-2: Parvovírus canino tipo 2
- 13 CPV-2a: Parvovírus canino tipo 2a
- 14 CPV-2b: Parvovírus canino tipo 2b
- 15 CPV-2c: Parvovírus canino tipo 2c
- 16 DNA: Ácido desoxirribonucleico
- 17 ELISA: Teste de Ensaio Imunoenzimático
- 18 FPV: Parvovírus felino
- 19 Gly: Glicina
- 20 IgA: Imunoglobulina A
- 21 IF: Imunofluorescência
- 22 HA: Hemaglutinação
- 23 IUCN: *International Union for Conservation of Nature*
- 24 IM: Intramuscular
- 25 Kb: Kilobases
- 26 KDa: Kilodalton
- 27 Kg: Kilogramas
- 28 Lys: Lisina
- 29 Nm: Nanômetro
- 30 PCR: Reação em cadeia da polimerase
- 31 pH: Potencial Hidrogeniônico
- 32 PI: Pós-infecção
- 33 SIRS: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
- 34 ssDNA: DNA de cadeia simples

- 1 SP: São Paulo
- 2 TfR: Receptor da transferrina
- 3 TNF: Fator de necrose tumoral
- 4 VP: Proteína viral
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

---

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 QUATI ( <i>NASUA NASUA</i> ).....	2
1.3 CACHORRO-DO-MATO ( <i>CERDOCYON THOUS</i> ).....	4
1.4 PARVOVÍRUS.....	6
1.4.1 Estrutura do Parvovírus.....	7
1.4.1.1 Capsídeo.....	7
1.4.1.2 Genoma.....	8
1.4.2 Infecção e Replicação.....	10
1.4.3 Origem do Parvovírus Canino.....	11
1.4.4 Evolução do Parvovírus Canino.....	13
1.4.5 Epidemiologia.....	13
1.4.6 Patogenia e Formas de Apresentação Clínica.....	14
1.4.7 Alterações Patológicas e Resposta Imune.....	16
1.4.8 Transmissão.....	17
1.4.9 Diagnóstico.....	17
1.4.9.1 Diagnóstico clínico.....	17
1.4.9.2 Diagnóstico laboratorial.....	18
1.4.9.2.1 <i>Reação em cadeia pela polimerase (PCR)</i> .....	18
1.4.9.2.2 <i>PCR em tempo real</i> .....	19
1.4.9.2.3 <i>Isolamento viral</i> .....	19
1.4.9.2.4 <i>Microscopia eletrônica</i> .....	19
1.4.9.2.5 <i>Testes de hemaglutinação (HA)</i> .....	20
1.4.9.2.3 <i>Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA)</i> .....	20
1.4.10 Profilaxia.....	20
1.4.11 Referências.....	21

## 2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL .....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34

1	<b>3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b>	
2		
3	3.1 IDENTIFICAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO 2B EM UM CACHORRO-DO-MATO <i>CERDOCYON</i>	
4	<i>THOUS</i> (LINNAEUS, 1766) DE VIDA LIVRE”	
5	Introdução.....	38
6	Material e Métodos.....	40
7	Resultados.....	42
8	Discussão.....	42
9	Referências.....	46
10		
11	3.2. IDENTIFICAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO 2B EM UMA POPULAÇÃO DE QUATIS <i>NASUA NASUA</i>	
12	(LINNAEUS, 1766) DE VIDA LIVRE”	
13	Introdução.....	61
14	Material e Métodos.....	62
15	Resultados.....	65
16	Discussão.....	65
17	Referências.....	68
18		
19	<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 1.1 INTRODUÇÃO

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), pertence à família *Parvoviridae* e possui três variantes antigênicas (CPV-2a/b/c). No final da década de 70, emergiu como agente de uma doença caracterizada por enterite hemorrágica grave e geralmente fatal, associada à imunossupressão e miocardite em cães neonatos (FONTANA et al., 2013). O CPV-2 é um vírus pequeno com 25nm de diâmetro, seu genoma é composto por uma cadeia simples de DNA, envolto por capsídeo icosaédrico com projeções na superfície e é desprovido de envelope lipídico (HOELZER; PARRISH, 2010). O CPV-2 é altamente contagioso e a infecção ocorre geralmente por exposição oronasal a fezes, fômites ou ambientes contaminados (MORAES; COSTA, 2012).

As doenças virais representam 56% dos patógenos que ameaçam as populações de carnívoros selvagens em todo o mundo (PEDERSEN et al., 2007). Na América do Norte três populações de coiotes (*Canis latrans*) (BARKER; POVEY; VOIGT, 1983; THOMAS et al., 1984; GESE et al., 1991) e uma população de lobos cinzentos (*Canis lupus*) foram sorologicamente positivas para o CPV-2 (ZARNKE; BALLARD, 1987). A prevalência sorológica, a infecção e os sinais clínicos da doença ocasionada pelo CPV-2 já foram descritos em chacais (*Canis aureus*, *Canis adustus* e *Canis mesomelas*), raposas-cinzentas (*Urocyon littoralis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (MANN et al., 1980; GARCELON; WAYNE; GONZALES, 1992; ALEXANDER; WAYNE; FULLER, 1994). Na África, Woodroffe et al. (2012) demonstraram por sorologia, a exposição de cães selvagens e domésticos que viviam na mesma região geográfica ao CPV-2, sugerindo a possível transmissão do parvovírus canino entre essas populações.

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) é um mamífero da Família *Canidae*, não consta na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção podendo ser encontrado em várias regiões geográficas do Brasil, sendo aparentemente tolerante a perturbações antrópicas, porém não à urbanização. Esta espécie está presente em todos os biomas brasileiros e em uma ampla variedade de habitats (BEISIEGEL et al., 2013).

O quati (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766) é um mamífero da Família *Procyonidae*, pertencente à fauna silvestre assim como o cachorro-do-mato também é encontrado na América do Sul (GROMPPER; DECKER, 1998). Essa espécie não consta na lista brasileira

1 de espécies ameaçadas de extinção, sendo que em muitos lugares é considerada a espécie  
2 silvestre mais abundante (CHAVES; SANTOS, 2009).

3 A maioria dos estudos sobre o CPV-2 no Brasil em animais silvestres são  
4 levantamentos sorológicos que evidenciaram a exposição de espécies como cachorro-do-mato  
5 (*Cerdocyon thous*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorro-vinagre (*Speothos*  
6 *veneticus*), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e onça-parda  
7 (*Puma concolor*) ao vírus (HUBNER et al., 2010; JORGE, 2008; CURI et al., 2010).

8 No Brasil, ainda são escassos os estudos utilizando biologia molecular como  
9 ferramenta de diagnóstico ou a caracterização da cepa viral por meio da análise das  
10 sequências de nucleotídeo (nt) em animais silvestres.

11

## 12 **1.2 QUATI** (*Nasua nasua*)

13

14 O quati (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766) é um mamífero da Família *Procyonidae*,  
15 pertencente à fauna silvestre da América do Sul e está presente na Colômbia, Venezuela,  
16 Brasil, Uruguai e norte da Argentina (GROMPPER; DECKER, 1998) (Figura 1).

17 O quati é um mamífero de tamanho médio, medindo cerca de 53 cm de comprimento da  
18 cabeça ao corpo com uma longa cauda, esguia e não apreensível (GROMPPER; DECKER,  
19 1998). Vive em grupos de 5 a 10 indivíduos (BEISEGEL, 2001), ocupa áreas arborizadas,  
20 possuem o hábito de caminhar longas distâncias diariamente e já foi descrito em todos os  
21 biomas brasileiros (CHEVILLARD HUGOT; MULLER; KULZER, 1980; BEISEGEL, 2001).

22 São animais onívoros, possuem uma dieta rica em frutos silvestres e são importantes na  
23 dispersão de sementes. Devido à alimentação variada e por percorrerem longas distâncias  
24 diariamente promovem a regeneração dos biomas e mantêm o contato das populações de  
25 quatis isoladas entre os fragmentos de mata, diminuindo as taxas de consanguinidade nessas  
26 populações (GROMPPER, DECKER, 1998; ALVES COSTA; ETEROVICK, 2007). Os  
27 quatis também se alimentam de animais invertebrados e pequenos animais vertebrados, como  
28 lagartos e peixes, além de consumirem carne em putrefação (GROMPPER; DECKER, 1998).

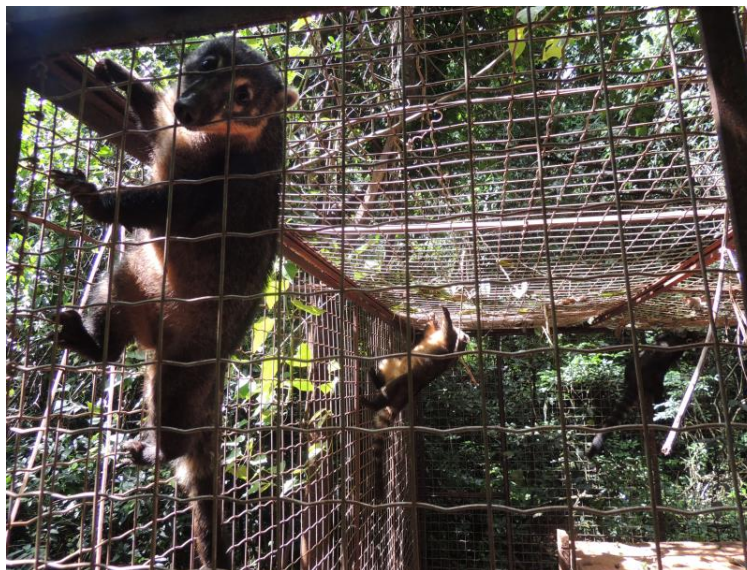
29 O quati está inserido na *Red List of Threatened Species* pela *International Union for*  
30 *Conservation of Nature* (IUCN) como “Menos Preocupante - LC” ao risco de extinção e não  
31 está na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção. A combinação de pouca exigência  
32 energética basal, da alta mobilidade com boa capacidade termorregulatória, hábito alimentar  
33 onívoro e comportamento flexível, permite que a espécie seja adaptável a uma grande

1 variedade de habitats (CHEVILLARD HUGOT; MULLER; KULZER, 1980; BEISEGEL,  
2 2001).

3 As populações de quatis têm aumentado consideravelmente em virtude da tolerância  
4 desses animais aos distúrbios antropogênicos e, quando em regiões urbanas, frequentemente  
5 encontram alimentos em lixeiras ou recebem alimentos de humanos (em parques e em casas  
6 próximas), além da ausência de predadores como jaguatiricas, onças pintadas e onças pardas  
7 (CHEVILLARD HUGOT; MULLER; KULZER, 1980; ALVES COSTA; ETEROVICK,  
8 2007). A superpopulação faz com que esses animais estejam presentes em áreas frequentadas  
9 por humanos e, conseqüentemente, há relatos de ataques a pessoas e animais domésticos, tais  
10 como mordidas e arranhões, além do roubo de alimento (ALVES COSTA; ETEROVICK,  
11 2007).

12 Langoni e colaboradores (2009) sugeriram que os quatis podem ser reservatórios de  
13 *Leptospira* spp sem apresentarem sinais clínicos, e testes sorológicos seriam necessários para  
14 se determinar o risco ao ambiente, aos visitantes e aos trabalhadores de parques e o impacto  
15 na saúde pública. Guimarães e colaboradores (2012) observaram algumas enfermidades que  
16 possuem potencial zoonótico e que acometem procionídeos, tais como raiva, arboviroses,  
17 tripanossomose, leishmaniose, leptospirose e algumas doenças fúngicas.

18 Existem poucas informações e poucos estudos sobre a importância do quati como  
19 reservatório e possível transmissor de doenças infecciosas, parasitárias ou mesmo zoonoses  
20 aos animais de companhia como cães e gatos e mesmo para animais de produção, como  
21 bovinos, suínos e equinos, e vice versa, uma vez que o contato entre animais domésticos e  
22 silvestres é cada vez mais comum. Dessa forma são necessários estudos para esclarecer a real  
23 importância desses animais na cadeia de transmissão ou mesmo na manutenção de agentes  
24 virais no ciclo que envolve o convívio entre animais domésticos e silvestres.



1

2 **FIGURA 1** - Representantes da espécie *Nasua nasua* pertencentes ao Horto Florestal de  
3 Palmital - SP. 2014.

4 **Fonte:** arquivo pessoal.

5

### 6 **1.3 CACHORRO-DO-MATO** (*CERDOCYON THOUS*)

7

8 O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766), também conhecido como  
9 guaraxaim, pertence à Ordem *Carnivora*, Família *Canidae*, sendo uma espécie amplamente  
10 distribuída na América do Sul, com hábitos noturnos e crepusculares, vive solitário ou em  
11 pares, explorando áreas de mata e/ou savana (EMMONS, 1999). Pode ser encontrado em  
12 várias regiões geográficas do Brasil e está presente em todos os biomas brasileiros e em uma  
13 ampla variedade de habitats (BEISIEGEL et al., 2013).

14 O cachorro-do-mato possui porte médio e quando adulto pesa entre 6 a 7 kg e mede  
15 aproximadamente 65 cm de comprimento. Estes animais apresentam pelo relativamente curto  
16 e pelagem cinza com alguns pelos negros, sendo que alguns indivíduos apresentam coloração  
17 mais amarelada e outros são quase negros. Os cachorros-do-mato são animais onívoros,  
18 alimentam-se de lagartos, insetos, pequenos mamíferos além de ovos e frutas (RODRIGUES;  
19 AURICCHIO, 1994), tendo preferência por pequenos roedores (RAMOS et al., 2005).

20 O cachorro-do-mato está inserido na *Red List of Threatened Species* pela *International*  
21 *Union for Conservation of Nature* (IUCN) como “Menos Preocupante” ao risco de extinção  
22 (COURTENAY; MAFFEI, 2010). A não ameaça à extinção se deve principalmente à sua  
23 ampla distribuição em diversos habitats e seu potencial de se adaptar em ambientes  
24 modificados pelo homem. No entanto, considerando o aumento da ocupação humana em

1 torno de áreas naturais, é comum observar estes animais em regiões peridomiciliares, podendo  
2 ser um reservatório natural de várias doenças infecciosas e zoonoses (BERTA, 1982;  
3 MOTTA; LOMBARDI; TALAMONI, 1994; FACURE; MONTEIRO, 1996).

4 A vulnerabilidade desta espécie está relacionada à destruição do seu ambiente natural,  
5 ao desmatamento que ocorre para extensão de fronteiras agrícolas, à disseminação de  
6 comunidades urbanas no ambiente natural e a fragmentação de seu habitat pela construção de  
7 estradas (DEPLAZES et al., 2004; FURTADO et al., 2004; SINKOC; BRUM; MULLER,  
8 2009). Além disso, doenças ocasionadas por patógenos que acometem os cães domésticos e  
9 outras espécies de canídeos selvagens podem levar a redução da população desses animais  
10 (MECH; KURTZ; GOYAL, 1997; STEINEL et al., 2001; CURI; MIRANDA; TALAMONI,  
11 2006).

12 As doenças virais representam 56% dos patógenos que ameaçam as populações de  
13 carnívoros selvagens em todo o mundo (PEDERSEN et al., 2007). Na América do norte três  
14 populações de coiotes (*Canis latrans*) (BARKER; POVEY; VOIGT, 1983; THOMAS et al.,  
15 1984; GESE et al., 1991) e uma população de lobos cinzentos (*Canis lupus*) foram  
16 consideradas soropositivas para o CPV-2 (ZARNKE; BALLARD, 1987). A prevalência  
17 sorológica, a infecção e os sinais clínicos da doença ocasionada pelo CPV já foram descritos  
18 em chacais (*Canis aureus*, *Canis adustus* e *Canis mesomelas*), raposas-cinzentas (*Urocyon*  
19 *littoralis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (MANN et al., 1980; GARCELON;  
20 WAYNE; GONZALES, 1992; ALEXANDER; WAYNE; FULLER, 1994). Na África,  
21 Woodroffe et al. (2012) demonstraram a possível transmissão do CPV-2 entre cães selvagens  
22 e domésticos. No Brasil, Jorge (2008) utilizando técnicas sorológicas evidenciou a exposição  
23 de espécies como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*),  
24 cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), jaguatirica  
25 (*Leopardus pardalis*) e onça-parda (*Puma concolor*) ao parvovírus canino, onde dos 76  
26 animais avaliados 92% ( $n=69$ ) já haviam entrado em contato com o vírus. Entretanto, ainda  
27 são escassos os estudos utilizando técnicas de biologia molecular, tal como a reação em  
28 cadeia pela polimerase (PCR) como técnica de diagnóstico para a detecção do CPV em  
29 amostras biológicas de animais silvestres.



1  
2 **FIGURA 2** - Representantes da espécie *Cerdocyon thous* pertencentes ao CEMPAS, Centro  
3 de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens, da UNESP - Botucatu.

4 **Fonte:** Próprio autor.

5  
6 **1.4 PARVOVÍRUS**

7  
8 O parvovírus é um vírus pequeno com 25nm de diâmetro, seu genoma é composto por  
9 uma cadeia simples de DNA, possui forma icosaédrica, seu capsídeo apresenta numerosas  
10 projeções na superfície e é desprovido de envelope lipídico (HOELZER; PARRISH, 2010).

11 Esses vírus infectam uma ampla variedade de hospedeiros naturais, como humanos,  
12 macacos, suínos, cães, gatos, martas, ratos, entre outros e podem ocasionar doenças graves,  
13 especialmente em indivíduos jovens. A família *Parvoviridae* contempla um dos menores vírus  
14 DNA conhecidos e é composta por duas subfamílias, denominadas de *Parvovirinae* e  
15 *Densovirinae* (GOVINDASAMY et al., 2003; HOELZER; PARRISH, 2010). A subfamília  
16 *Parvovirinae* infecta animais vertebrados e é composta por oito gêneros (*Amdoparvovirus*,  
17 *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*,  
18 *Protoparvovirus* e *Tetraparvovirus*) (ICTV, 2016). Os vírus que compõem o gênero  
19 *Dependoparvovirus* dependem de um adenovírus ou de um herpesvírus para que a replicação  
20 possa ser realizada, pois apesar de conseguirem infectar o hospedeiro de forma eficiente, não  
21 conseguem completar a replicação sem a intervenção de outro vírus (GREENE; SCHULTZ,  
22 2006). Os vírus que compõem o gênero *Erythroparvovirus* necessitam da célula na fase S do  
23 ciclo celular para a replicação do seu DNA, bem como os membros do gênero  
24 *Protoparvovirus*. A subfamília *Densovirinae* infecta hospedeiros artrópodes e é composta por

1 cinco gêneros (*Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*, *Iteradensovirus* e  
2 *Penstylidensovirus*) (ICTV, 2015).

3 O *Canine Parvovirus* (CPV) pertence à Família *Parvoviridae*, subfamília  
4 *Parvovirinae*, gênero *Protoparvovirus*, espécie *Carnivore protoparvovirus 1* (ICTV, 2015).

#### 6 **1.4.1 Estrutura dos Parvovírus**

8 Os parvovírus são vírus DNA que infectam células eucariotas e têm sido isolados em  
9 uma ampla variedade de hospedeiros (PARADISO; RHODE; SINGER, 1982).

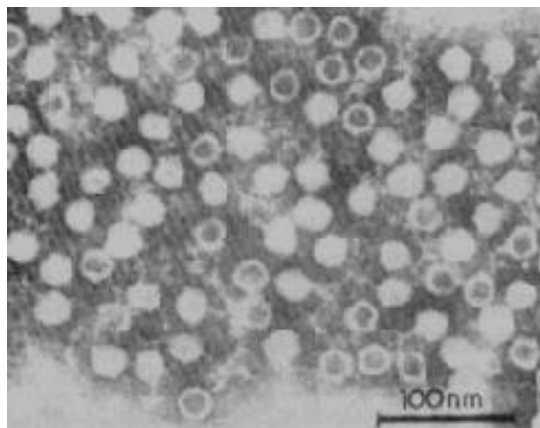
10

##### 11 **1.4.1.1 Capsídeo**

12

13 A estrutura do capsídeo do CPV foi determinada por cristalografia de raio X, o que  
14 permitiu uma abordagem tridimensional à partícula vírica (Figura 3) (TSAO et al., 1991). A  
15 partícula viral é esférica formada por um arranjo de proteínas víricas (VP), que estão repetidas  
16 em cerca de 60 cópias, formando uma estrutura icosaédrica. Estas proteínas estruturais  
17 designadas VP1, VP2 e VP3, englobam o genoma do vírus na sua totalidade e diferem apenas  
18 na sua porção inicial (porção amino-terminal) ou em modificações que ocorrem após a  
19 tradução (SIMPSON et al., 2002).

20



21

22

23 **FIGURA 3** – Partículas de CPV-2 em amostras fecais de cães com gastroenterite observadas  
24 por microscopia eletrônica.

25 **Fonte:** Gastroenterite canina - agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos  
26 (HOMEM, V.S.F.; MENDES, Y.G.; LINHARES, A.C., 1999).

27

1 A proteína com maiores dimensões é a VP1 (83 kDa) e encontra-se em menor  
2 quantidade no capsídeo. Esta proteína possui um domínio adicional N-terminal de 143  
3 aminoácidos (aa) (PARADISO; RHODE; SINGER, 1982).

4 A proteína VP2 (64 kDa) é a constituinte principal do capsídeo (TURISO et al., 1992).  
5 A estrutura secundária da proteína VP2 é composta por oito filamentos com disposição  
6 antiparalela em forma de folha tipo beta, onde cadeias polipeptídicas associam-se formando  
7 uma estrutura achatada e rígida (TSAO et al., 1991; GOVINDASAMY et al., 2003).

8 A proteína VP3 (63 kDa) é produzida pela clivagem enzimática de 18 a 20 aa da porção  
9 N-terminal da VP2 e só se encontra nas partículas infecciosas. Desta forma, algumas proteínas  
10 VP2 são clivadas em VP3 (PARK et al., 2007).

11 O capsídeo completo possui 60 cópias de uma combinação de VP2 e VP3 (54 a 56) e  
12 contém cerca de cinco a seis cópias da proteína VP1 (TURISO et al., 1992; PARK et al.,  
13 2007).

#### 14 15 **1.4.1.2 Genoma**

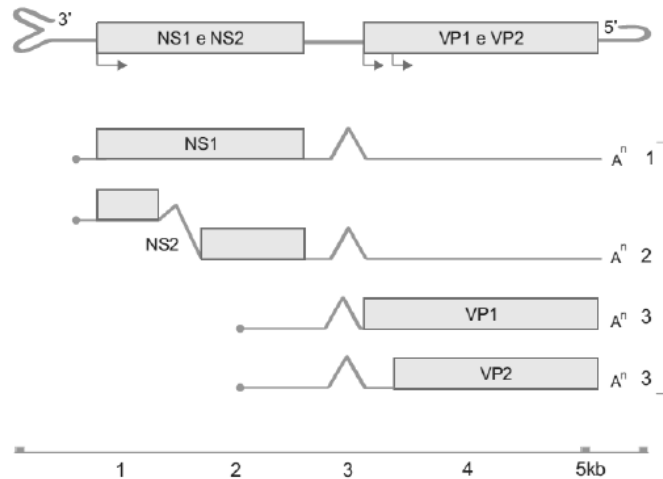
16  
17 O genoma do CPV é constituído por DNA de cadeia simples (*ssDNA*) de polaridade  
18 negativa e apresenta uma extensão de cerca de 5 kilobases (kb) (SHACKELTON et al., 2005).  
19 As suas extremidades (3' e 5') são compostas por um conjunto variável de sequências  
20 palindrômicas que emparelham entre si, induzindo a formação de estruturas secundárias em  
21 forma de gancho. Estas estruturas, principalmente as localizadas na extremidade 3',  
22 participam do processo de replicação viral apresentando a função de “*primers*”  
23 (oligonucleotídeos iniciadores), favorecendo a encapsidação dos novos vírions formados e  
24 também auxiliando na manutenção da integridade da porção terminal do genoma (Figura 4)  
25 (SHACKELTON et al., 2005; STRECK, 2009).

26



1 pelo tropismo celular específico a uma gama de diferentes hospedeiros e pela estabilidade das  
 2 partículas virais no ambiente (HURTADO et al., 1996; SPITZER; PARRISH; MAXWELL,  
 3 1997; UEFFER; PARRISH, 2003; VIHINEN-RANTA et al., 2004).

4



5

6 **Figura 5:** Representação esquemática do genoma do CPV-2.

7 **Fonte:** MORAES; COSTA, 2012.

8

### 9 1.4.2 Infecção e Replicação

10

11 Antes dos parvovírus realizarem a replicação propriamente dita, devem passar por uma  
 12 série de interações desde a adesão à superfície celular até à entrada no núcleo da célula  
 13 hospedeira (COTMORE; TATTERSALL, 2007).

14 A entrada do parvovírus na célula hospedeira após a adsorção a um receptor celular  
 15 específico ocorre por endocitose. O tipo de receptor celular varia entre os parvovírus e  
 16 determina a especificidade do hospedeiro, tropismo por determinados tecidos e pode  
 17 influenciar a via endossomal que será seguida (VIHINEN-RANTA et al., 2004).

18 O receptor primário, tanto no caso do CPV, como do parvovírus felino (FPV), é o  
 19 receptor da transferrina (TfR), mas algumas cepas destes vírus podem se ligar ao ácido siálico  
 20 das células hospedeiras (COTMORE; TATTERSALL, 2007). O TfR é expresso de forma  
 21 acentuada nas células em divisão ativa, isso explica a sua necessidade de tecidos  
 22 mitoticamente ativos, patogênese particular da infecção por CPV (HUEFFER et al., 2003). As  
 23 variantes antigênicas do CPV (2a/2b/2c) foram selecionadas como resultado da sua melhor  
 24 capacidade de ligação ao receptor, pois estas variantes mostraram ser mais eficientes na  
 25 ligação ao receptor que o CPV original (CPV-2) (HUEFFER; PARRISH, 2003).

1 Os parvovírus não possuem os recursos para uma transcrição autônoma, por isso,  
2 aguarda a célula hospedeira entrar na fase S do ciclo celular para usar as suas vias de síntese  
3 celular (COTMORE; TATTERSALL, 2007).

#### 4 5 **1.4.3 Origem do Parvovírus Canino**

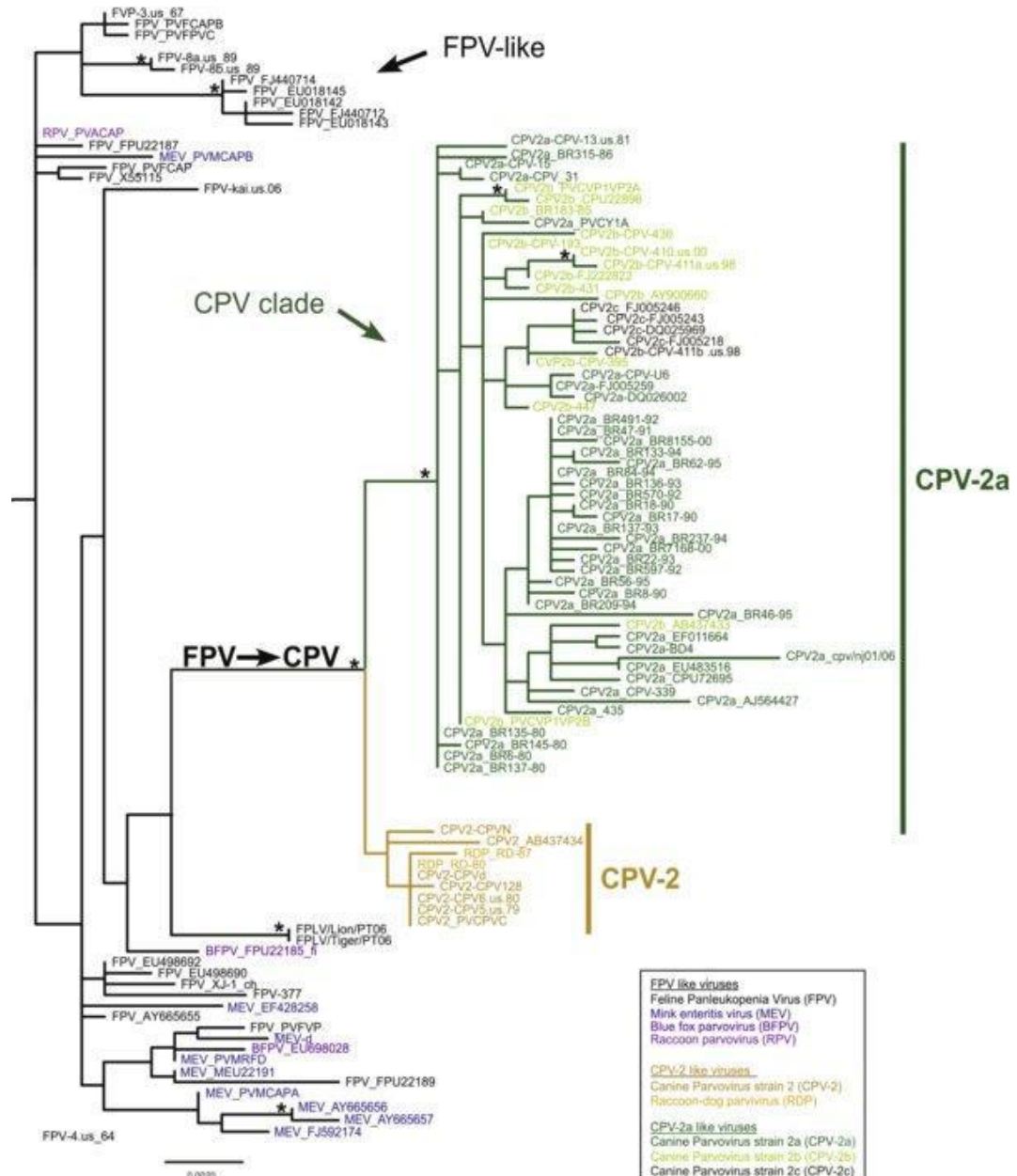
6  
7 O CPV surgiu em 1978 como um novo agente patogênico dos cães e foi nominado de  
8 CPV tipo 2 (CPV-2), para distinguir do Parvovírus canino tipo 1 (CPV-1) ou *Canine Minute*  
9 *Vírus*, e que apesar de serem identificados em cães não são antígenicamente correlacionados  
10 (SCHWARTZ et al., 2002).

11 Cerca de um ano após o surgimento, este novo vírus disseminou-se de forma global e,  
12 desde então, é responsável por uma das principais doenças infecciosas em canídeos  
13 domésticos e silvestres, a parvovirose (PARRISH, 1990).

14 Análises filogenéticas (Figura 6) demonstraram que os isolados de CPV descenderam de  
15 um ancestral comum que surgiu nos anos 70 e que estavam relacionados com um parvovírus  
16 endêmico da panleucopenia felina (Vírus da Panleucopenia Felina - FPV) das martas,  
17 guaxinins, raposas do ártico e outros hospedeiros da ordem *Carnivora* (PARRISH, 1990;  
18 TRUYEN et al., 1998; PARRISH, 1999). Truyen e colaboradores (1998) sugeriram que a  
19 raposa poderia ter sido o hospedeiro intermediário deste vírus, já que hoje em dia o parvovírus  
20 que infecta as raposas tem uma sequência de DNA intermediária entre o FPV (mais antigo) e  
21 o CPV (atual). O FPV é um agente patogênico endêmico dos felinos que surgiu antes do  
22 início do século XX (STEINEL et al., 2000).

23 Apesar de estimativas anteriores considerarem a taxa de mutação dos parvovírus como  
24 baixa, na ordem de  $1 \times 10^{-4}$  a  $4 \times 10^{-4}$  alterações/nt/ano (PARRISH et al., 1991; TRUYEN et al.,  
25 1995), Shackelton et al. (2005), observaram que a taxa de substituição de nt nos parvovírus  
26 dos carnívoros é similar à encontrada nos vírus de RNA. Este acontecimento deve-se a dois  
27 fatores: uma elevada taxa intrínseca de mutação do CPV e uma forte pressão de seleção  
28 positiva e persistente, o que eleva a taxa de fixação das mutações. No caso do CPV, parece  
29 que ambos os fatores corroboram para o aparecimento de novas cepas em pequenos intervalos  
30 de tempo (HOELZER et al., 2008a). O CPV representa um dos raros exemplos em que o salto  
31 evolutivo viral ultrapassa a barreira interespecie. Os isolados de CPV-2 e FPV diferem em  
32 apenas 0,5% na sua sequência de DNA (HOELZER et al., 2008a). As diferenças entre estes  
33 vírus são baseadas em cinco resíduos codificados pela proteína VP2, nomeadamente nos  
34 resíduos de aa 80 (Lys FPV/Arg CPV-2), 93 (Lys FPV/Asn CPV-2), 323 (Asp FPV/Asn

1 CPV-2), 564 (Ser FPV/Asn CPV-2) e 568 (Gly FPV/Ala CPV-2). Considera-se que as  
 2 alterações nos resíduos 93 e 323 são as principais responsáveis pela capacidade de infecção  
 3 do CPV-2 no cão e por um epítipo antigênico específico do CPV-2, enquanto que os resíduos  
 4 80, 564 e 568 encontrados no FPV são críticos para a replicação destes vírus no gato (Figura  
 5 6) (CHANG et al., 1992; STEINEL et al., 2000; HUEFFER et al., 2003).  
 6



7

8

9 **Figura 6:** Relações filogenéticas entre os parvovírus dos carnívoros, baseadas no gene que  
 10 codifica a proteína VP2 do capsídeo.

11 **Fonte:** HOELZER, K.; PARRISH, C. The emergence of parvoviruses of carnivores.  
 12 *Veterinary Research*, v.41, p.39, 2010.

#### 1 **1.4.4 Evolução do Parvovírus Canino**

2  
3 Em 1979, foi identificada uma variante do CPV-2, tipo 2a (CPV-2a), que em um ano  
4 distribuiu-se mundialmente substituindo na totalidade o CPV-2, que atualmente já não está  
5 circulando. Comparado ao CPV-2, o CPV-2a tem três substituições de aa no seu capsídeo,  
6 incluindo alterações nos resíduos 87 (Met/Leu), 300 (Ala/Gly) e 305 (Asp/Tyr) da proteína  
7 VP2 (PARRISH et al., 1991).

8 Em 1984, uma nova variante antigênica do CPV-2a, tipo 2b (CPV-2b), foi reconhecida e  
9 difere da CPV-2 original em apenas dois resíduos de aa do capsídeo. Uma das substituições  
10 ocorreu na principal região antigênica (epítopo A), como resultado da substituição do resíduo  
11 426 da proteína VP2 (Asn/Asp) e a outra substituição ocorreu no resíduo 555 (PARRISH et  
12 al., 1991; BUONAVOGLIA et al., 2001).

13 Em 2000, uma nova alteração no resíduo 426 da proteína VP2 (Asp/Glu) foi identificada  
14 na Itália, sendo proposta uma nova variante, o tipo 2c (CPV-2c) (MARTELLA et al., 2004).

15 As variantes antigênicas CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c (HOELZER et al., 2008a) possuem  
16 a capacidade de infectar felinos domésticos e silvestres e desencadear sinais clínicos  
17 (TRUYEN; PARRISH, 1992; BUONAVOGLIA et al., 2001). Casos de coinfeção com  
18 diferentes tipos de parvovírus já foram observados em cães (URL et al., 2003; BATTILANI et  
19 al., 2007; 2011; VIEIRA et al., 2008; 2011). Em Portugal, no ano de 2008, foi relatada a  
20 coinfeção com as variantes CPV-2b e CPV-2c isoladas nas fezes de um cão com sinais de  
21 gastroenterite (VIEIRA et al., 2008) Em 2013, Battilani et al. descreveram a coinfeção de  
22 CPV-2a e FPV em um filhote de gato doméstico.

#### 23 24 **1.4.5 Epidemiologia**

25  
26 A análise filogenética deste vírus sugere que houve pouca modificação das variantes do  
27 CPV entre as diferentes áreas geográficas, as mutações posteriores surgiram de um fenômeno  
28 de emergência da mesma mutação em zonas geográficas distantes (HOELZER et al., 2008a).  
29 Apesar do CPV-2 ter desaparecido da circulação no início dos anos 90, sendo totalmente  
30 substituído pelo CPV-2a, 2b e 2c, a maioria das vacinas comerciais ainda é baseada na  
31 primeira cepa de CPV-2 descrita (HOELZER et al., 2008b).

32 No Brasil, o CPV-2b foi o subtipo prevalente entre os anos de 1995 a 2001 (COSTA et  
33 al., 2005). Em 2009, foi descrita pela primeira vez a circulação do tipo CPV-2c na população  
34 canina doméstica sendo sugerido por Pinto et al. (2012) que em 2012, teria sido a cepa

1 predominante nas cidades brasileiras (STRECK, 2009). Porém, os subtipos CPV-2a e CPV-  
2 2b, também são frequentemente descritos (DECARO et al., 2007a; CASTRO et al., 2011).

#### 4 **1.4.6 Patogenia e Formas de Apresentação Clínica**

5  
6 A parvovirose canina é uma doença altamente contagiosa que pode ocasionar surtos  
7 graves em populações inteiras quando os animais são suscetíveis (GUILFORD, 1996). As  
8 manifestações clínicas da parvovirose canina são principalmente gastrointestinais e esta  
9 doença é normalmente vista como uma gastroenterite, no entanto, a forma mais correta seria  
10 considerá-la como uma doença sistêmica, pois as lesões e as consequências não se  
11 manifestam apenas no sistema gastrointestinal (MACARTNEY et al., 1984b; MEUNIER et  
12 al., 1985). A ocorrência de vasculite, sepse e miocardite estão descritas como associadas à  
13 parvovirose canina (JOHNSON; CASTRO, 1984; MACARTNEY et al., 1984b; HOSKINS,  
14 2006).

15 A doença frequentemente se caracterizava pela presença de vômito e diarreia em cães  
16 com mais de seis semanas de idade e pela presença de miocardite em filhotes com menos de  
17 21 dias de idade (PARRISH, 1999).

18 A transmissão direta do CPV ocorre pela via oronasal a partir de fezes contendo o vírus  
19 (MEUNIER et al., 1985; CARMICHAEL, 2005). A transmissão indireta pode ocorrer por  
20 meio de objetos, fômites ou pelos contaminados. Acredita-se que a dose mínima infectante do  
21 vírus seja bastante reduzida, já que doses muito baixas de cepas atenuadas, inoculadas por via  
22 intramuscular são suficientes para iniciar uma infecção (CARMICHAEL; JOUBERT;  
23 POLLOCK, 1981).

24 A forma miocárdica da doença acomete cães descendentes de cadelas não imunizadas e  
25 que são infectados *in utero* ou nas primeiras semanas de idade (MEUNIER et al., 1984). A  
26 idade do animal determina se o coração é ou não afetado, já que a taxa de replicação dos  
27 miócitos só é suficiente para suportar a replicação efetiva do CPV aproximadamente até a 2<sup>a</sup>  
28 semana de idade. Cães infectados posteriormente a esta idade podem desenvolver enterite,  
29 mas não miocardite (MCCAWE; HOSKINS, 2006). A miocardite aparece geralmente sob a  
30 forma de insuficiência cardíaca aguda em cães entre a 6<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana de idade, mas é o  
31 resultado de uma infecção que se iniciou algumas semanas antes. A perda de fibras  
32 miocárdicas e a substituição por tecido fibroso podem levar os animais que sobreviveram à  
33 morte por insuficiência cardíaca crônica (LENGHAUS; STUDDENT, 1984; MEUNIER et  
34 al., 1984). As lesões primárias estão relacionadas com extensa necrose multifocal do

1 miocárdio, com reação inflamatória, caracterizada pela presença de infiltrado linfocítico de  
2 intensidade variável e a possível presença de corpúsculos de inclusão no interior dos miócitos  
3 (ROBINSON et al., 1979).

4 A forma neurológica de infecção por CPV é rara e foi caracterizada por  
5 leucoencefalomalácia, com necrose de liquefação da substância branca no sistema nervoso  
6 central, secundária à hipóxia e isquemia por miocardite (PRITTIE, 2004).

7 Na forma gastrointestinal ocorre replicação primária nos tecidos linfoides da orofaringe,  
8 linfonodos mesentéricos e timo (MEUNIER et al., 1985). Com a replicação primária do CPV,  
9 surgem as primeiras lesões histológicas da doença, que se caracterizam por necrose nos  
10 centros germinativos das tonsilas palatinas, gânglios retrofaríngeos e gânglios mesentéricos  
11 no 2º dia pós-infecção (PI). Ao 3º dia PI a necrose linfoide é mais generalizada, sendo  
12 evidente a perda celular no timo (MACARTNEY et al., 1984a; MCCAWE; HOSKINS, 2006).  
13 Após, o vírus se dissemina por via hematogênica provocando a viremia primária (MCCAWE;  
14 HOSKINS, 2006). A viremia secundária distribui o vírus para tecidos em rápida divisão,  
15 como a medula óssea, o tecido linfopoiético e o epitélio intestinal do jejuno e íleo  
16 (GUILFORD, 1996; MCCAWE; HOSKINS, 2006).

17 Na medula óssea, a infecção provoca necrose tanto das linhas mieloides como eritroides  
18 (MCCAWE; HOSKINS, 2006). As alterações na contagem de leucócitos começam entre o 3º e  
19 5º dia PI. A linfopenia é resultante da lise precoce dos linfócitos que começa no 1º ou 2º dia  
20 PI. Em casos graves, a linfopenia está associada à neutropenia, com desvio à esquerda e  
21 neutrófilos com granulações tóxicas aproximadamente no 6º dia PI (MACARTNEY et al.,  
22 1984a). Em animais convalescentes, é frequente a ocorrência de leucocitose e hiperplasia da  
23 medula óssea (MCCAWE; HOSKINS, 2006).

24 O vírus replica nas células intestinais em rápida divisão levando a degeneração das  
25 células das criptas intestinais (área das vilosidades intestinais que são mitoticamente ativas).  
26 Com a lesão das criptas, as células diferenciadas da extremidade das vilosidades não são  
27 substituídas, provocando um colapso na mucosa, com diminuição da capacidade de absorção  
28 e aumento da permeabilidade, podendo apresentar-se primeiro revestidas por epitélio cuboide  
29 imaturo até o desnudamento total da mucosa em casos mais graves (MCCAWE; HOSKINS,  
30 2006).

31 A viremia secundária termina devido à ação dos anticorpos neutralizantes séricos que  
32 aparecem no 5º ou 6º dia PI (GUILFORD, 1996). A viremia pode persistir por várias semanas  
33 mesmo após o vírus ter desaparecido do intestino (DECARO et al., 2007b). A excreção do  
34 vírus nas fezes pode começar no 3º dia PI, ainda antes do começo dos sinais clínicos. Durante

1 a fase aguda da doença o vírus é excretado em grande quantidade nas fezes, atingindo o seu  
2 pico entre o 5º e o 6º dia PI (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1981; MEUNIER et  
3 al., 1985).

4 A morte do animal pode ocorrer por desidratação, desequilíbrio eletrolítico, choque  
5 endotóxico ou sepse relacionada com a destruição da mucosa intestinal e com a leucopenia.  
6 Em casos de infecção grave por CPV, um quadro de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ou  
7 síndrome do *stress* respiratório agudo (ARDS) secundários a infecção bacteriana intestinal por  
8 *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. e *Campylobacter* spp. pode ocorrer  
9 (PRITTIE, 2004). As endotoxinas bacterianas, por meio do estímulo para a produção de  
10 citocinas são potentes mediadores da resposta inflamatória e promovem vasodilatação  
11 periférica, aumento da permeabilidade capilar, diminuição da função cardíaca e ativação da  
12 cascata de coagulação (PRITTIE, 2004).

13

#### 14 **1.4.7 Alterações Patológicas e Resposta Imune**

15

16 A replicação viral dentro das células das vilosidades intestinais leva ao colapso do  
17 epitélio e atrofia das vilosidades, sendo mais grave em íleo e jejuno. As lesões clássicas  
18 incluem a necrose do epitélio acompanhada por colapso da lâmina própria, resultando em  
19 criptas cheias de tecido necrótico e debris celulares (MACINTIRE; SMITH-CARR, 1997). A  
20 variação na gravidade das alterações hematológicas parece ser o reflexo da extensão da  
21 necrose do tecido linfoide mais do que o reflexo do efeito do CPV na medula óssea. A  
22 linfopenia é a alteração mais consistente e é mais pronunciada em animais com infecção  
23 sintomática (MEUNIER et al., 1985; MACINTIRE; SMITH-CARR, 1997). A leucopenia é  
24 devido à neutropenia e à linfopenia, onde a neutropenia está relacionada à destruição das  
25 células mitoticamente ativas e à ação direta do vírus na medula óssea (GODDARD et al.,  
26 2008). A produção ineficiente de neutrófilos é evidenciada pela fagocitose dos mesmos a  
27 nível medular, além da perda massiva de leucócitos pela parede intestinal (GODDARD et al.,  
28 2008). A linfopenia é o achado mais consistente e ocorre devido à destruição e depleção de  
29 linfócitos e à atrofia do tecido linfoide provocadas pelo CPV (MEUNIER et al., 1985;  
30 MCCAWE; HOSKINS, 2006; GODDARD et al., 2008).

31 Os títulos de anticorpos séricos podem ser detectados tão precocemente como no dia 3º  
32 a 4º dia PI, alcançando o seu valor máximo entre o 7º e 10º dia, mantendo-se de forma  
33 elevada e constante por pelo menos um ano (MCCAWE; HOSKINS, 2006). A ação destes  
34 anticorpos neutralizantes é responsável pelo término da viremia secundária (GUILFORD,

1 1996). Alguns cães podem desenvolver altos títulos de anticorpos séricos contra o CPV, mas  
2 baixos títulos de IgA no lúmen intestinal, o que os torna mais suscetíveis a forma mais grave  
3 da doença (LOBETTI, 2003).

4 Alguns fatores que predispõem a infecção por CPV são a falta de imunidade humoral  
5 protetora, a presença de parasitismo gastrointestinal, e as condições ambientais inadequadas e  
6 indutoras de *stress* (SMITH-CARR; MACINTIRE; SWANGO, 1997).

#### 8 **1.4.8 Transmissão**

9  
10 A transmissão pode ser de forma direta, pela via oronasal a partir de fezes contendo o  
11 vírus, ou de forma indireta por meio de objetos, fômites ou pelos contaminados (MEUNIER  
12 et al., 1985; CARMICHAEL, 2005). O CPV-2 é altamente contagioso e a infecção ocorre  
13 geralmente por exposição oronasal as fezes, fômites ou ambientes contaminados pelo vírus  
14 (MORAES; COSTA 2012). Objetos contaminados com fezes contendo vírus são importantes  
15 fontes de disseminação da infecção (TIMONEY et al., 1992; GUILFORD, 1996; PARRISH,  
16 1999), pois o vírus pode permanecer por até seis meses no ambiente e nos pelos dos animais  
17 que tiveram contato com fezes contaminadas (MORAES; COSTA 2012). A existência de  
18 animais com infecção subclínica assume grande importância na disseminação desta doença,  
19 pois mesmo sem sinais clínicos excretam grandes quantidades de vírus no meio ambiente,  
20 tornando-se importantes fontes de transmissão (MCCAW; HOSKINS, 2006). Outros  
21 reservatórios importantes para a transmissão da parvovirose são os cães de rua, os canídeos  
22 silvestres e os gatos, já que estes últimos também são suscetíveis à infecção subclínica ou  
23 podem apresentar sinais clínicos leves (TRUYEN et al., 1995; TRUYEN; PLATZER;  
24 PARRISH, 1996).

#### 26 **1.4.9 Diagnóstico**

##### 28 **1.4.9.1 Diagnóstico clínico**

29  
30 O diagnóstico rápido da infecção pelo CPV-2 é importante porque permite não somente  
31 isolar os animais infectados e realizar medidas preventivas, mas também porque quanto mais  
32 cedo uma terapia for iniciada, melhor será o prognóstico (DESARIO et al., 2005).

33 O diagnóstico clínico é constituído pela história clínica do animal (anamnese), os sinais  
34 clínicos manifestados e as alterações encontradas nos exames hematológicos

1 (STROTTMANN et al., 2008). A apresentação clínica é mais frequente em cães jovens, que  
2 podem apresentar vômito, diarreia (às vezes hemorrágica), febre, desidratação, dor abdominal  
3 e em casos graves, sinais de choque (STROTTMANN et al., 2008).

4 Os exames hematológicos podem demonstrar linfopenia como resultado direto da  
5 linfocitólise, sendo este o achado mais consistente na fase inicial da doença. Por vezes, é  
6 seguida de neutropenia devido ao consumo periférico e destruição dos precursores dos  
7 leucócitos na medula óssea (HUMM; HUGHES, 2009). A intensidade da leucopenia parece  
8 ser proporcional à gravidade da doença clínica, sendo comum uma leucocitose como sinal de  
9 recuperação eminente e em casos graves pode ocorrer pancitopenia (MCCAWE; HOSKINS,  
10 2006). A anemia ocorre secundariamente à perda gastrointestinal, em casos de diarreia  
11 hemorrágica grave (MACINTIRE; SMITH-CARR, 1997).

12 Os resultados das análises bioquímicas são variáveis e inespecíficos. As alterações  
13 bioquímicas incluem hipoproteinemia (secundária a enteropatia e aumento da permeabilidade  
14 vascular secundária a SIRS), hiperbilirrubinemia, aumento da concentração sérica das  
15 enzimas hepáticas (hipóxia hepática secundária a hipovolemia), hipocalcemia (por vômito e  
16 anorexia), hipoglicemia e azotemia pré-renal (secundária a desidratação) (MACINTIRE;  
17 SMITH-CARR, 1997; HUMM; HUGHES, 2009; KALLI et al., 2010).

#### 18 19 **1.4.9.2 Diagnóstico laboratorial**

20  
21 O diagnóstico laboratorial da infecção por CPV consiste na detecção do mesmo nas  
22 fezes de cães infectados, o seu isolamento em cultura de células e na detecção de anticorpos  
23 (KUMAR; NANDI, 2010).

##### 24 25 **1.4.9.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

26  
27 Ao contrário dos métodos anteriormente descritos, os métodos baseados na detecção do  
28 genoma CPV se mostraram altamente sensíveis e específicos (DESARIO et al., 2005). A  
29 técnica de PCR requer o uso de equipamentos e reagentes específicos, mas permite obter  
30 resultados em um curto espaço de tempo e com grande precisão. Com esta técnica um  
31 fragmento do genoma do CPV pode ser amplificado e posteriormente pode ser sequenciado  
32 para análise das sequências de nt e aa. A classificação do CPV em subtipos baseia-se na  
33 análise das variações dos aa do gene que codifica a proteína VP2 do capsídeo (DESARIO et  
34 al., 2005).

#### 1 2 **1.4.9.2.2 PCR em tempo real**

3  
4 Esta técnica amplifica uma sequência nucleotídica específica na amostra e monitora o  
5 progresso dessa amplificação, utilizando técnicas de detecção de fluorescência. Existem  
6 várias sondas fluorescentes, incluindo *Sybr Green*, sondas de hidrólise (sondas 5'-nuclease ou  
7 *Taqman*), brometo de etídio, sondas de hibridização, entre outras. Cada sonda tem  
8 características diferentes, mas todas emitem fluorescência, quando ocorre o processo de  
9 amplificação (VALASEK; REPA, 2005). Este método demonstrou ser altamente sensível,  
10 específico, reprodutível e mais rápido que a PCR convencional. A grande vantagem deste  
11 método é que além da identificação do DNA do parvovírus, permite a sua quantificação nas  
12 amostras avaliadas (DESARIO et al., 2005).

#### 13 14 **1.4.9.2.3 Isolamento viral**

15  
16 Apesar de ser a técnica ouro para o diagnóstico etiológico do CPV, é uma técnica muito  
17 laboriosa e necessita em média cerca de 5 a 10 dias para ocorrer o efeito citopatogênico viral e  
18 para posterior detecção do antígeno por técnicas de imunofluorescência (IF) ou por testes de  
19 hemaglutinação (HA) ou PCR (DESARIO et al., 2005). Como desvantagem esta técnica  
20 apresenta baixa sensibilidade, possivelmente pela presença de anticorpos no lúmen intestinal  
21 que se ligam às partículas víricas, impedindo que estas se liguem aos receptores presentes na  
22 cultura de células (DESARIO et al., 2005).

#### 23 24 **1.4.9.2.4 Microscopia eletrônica**

25  
26 A microscopia eletrônica é utilizada para a visualização e identificação de partículas  
27 víricas de CPV, mas por ser uma técnica laboriosa e demorada, perdeu a sua utilidade  
28 diagnóstica, pois depende da existência de equipamento sofisticado, sendo apenas utilizada  
29 com fins acadêmicos, pesquisa ou de investigação específica (MATHYS et al., 1983).

#### 30 31 **1.4.9.2.5 Testes de hemaglutinação (HA)**

32  
33 Em condições ideais de potencial hidrogeniônico (pH) (6.5) e temperatura (4°C) o CPV  
34 aglutina eritrócitos de várias espécies animais, esta propriedade pode atenuar-se ou mesmo

1 perder-se após diversas passagens do vírus em culturas de células (MCCAW; HOSKINS,  
2 2006). Contudo, em amostras fecais frescas, é possível aplicar a aglutinação para detecção do  
3 CPV (MCCAW; HOSKINS, 2006), preferencialmente utilizando eritrócitos de suíno ou de  
4 macaco *rhesus* (DESARIO et al., 2005).

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

8

#### 9 **1.4.9.2.6 Teste de ensaio imunoenzimático direto e indireto (ELISA)**

10

11 O ELISA direto e indireto detecta a presença de partículas virais nas fezes, não  
12 distinguindo os subtipos de parvovírus em questão, portanto não diferencia as cepas de campo  
13 das cepas vacinais. Esta técnica, no entanto, é uma ferramenta útil no rastreamento inicial de  
14 animais suspeitos de infecção por CPV (VIEIRA et al., 2011). É necessário que haja uma  
15 quantidade de antígeno na amostra suficiente para formar um complexo visível  
16 (ESFANDIARI; KLINGEBORN, 2000; DESARIO et al., 2005). Apesar deste fato, o ELISA  
17 apresenta maior especificidade e sensibilidade do que a técnica de HA (LACHERETZ et al.,  
18 2003).

19 Nas infecções por CPV, as partículas virais são liberadas nas fezes desde o 3º dia PI até  
20 ao 12º dia PI e podem ser detectadas no pico de excreção viral (4º a 7º dia PI). O momento  
21 ideal para utilizar estes testes, como diagnóstico, é entre o 4º e o 8º dia PI, que corresponde  
22 geralmente aos primeiros 2 a 4 dias após o início dos sinais clínicos. Reações falso-positivas  
23 podem ocorrer quando se utilizam estas técnicas em animais vacinados com vacinas vivas  
24 modificadas, no 3º a 10º dia prévio à execução do teste. As reações falso negativas ocorrem  
25 devido à ligação entre anticorpos neutralizantes e as partículas virais do intestino, na fase  
26 inicial da infecção ou pela ausência/diminuição da excreção viral (PRITTIE, 2004).

27

#### 28 **1.4.10 Profilaxia**

29

30 O CPV é um vírus muito resistente no ambiente e em baixas temperaturas (< 7°C), se  
31 mantém com capacidade infecciosa por meses. A maioria dos desinfetantes comuns não  
32 consegue inativar este vírus (GORDON; ANGRICK, 1988), entretanto, soluções de  
33 hipoclorito de sódio e formalina são efetivas; e a exposição aos raios solares diminui a  
34 infectividade da partícula viral (KENNEDY et al., 1995). A persistência do vírus no meio

1 ambiente é importante para a perpetuação da doença (MCCAWE; HOSKINS, 2006). Uma boa  
2 higiene ambiental é fundamental para a prevenção da infecção por CPV, além da imunidade  
3 individual eficaz feita por meio da adoção de protocolos de imunização efetivos (PRITTIE,  
4 2004). A resposta imune contra o CPV pode ser induzida ativamente com o uso de vacinas ou  
5 passivamente, pela administração direta de anticorpos ou transferência imediata de anticorpos  
6 maternos pelo colostro (GREENE; SCHULTZ, 2006).

#### 7 8 **1.4.11 Referências**

9  
10 ALEXANDER, P.W.K.; WAYNE, R.K.; FULLER, T.K. Serologic survey of selected canine  
11 pathogens among free-ranging jackals in Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, p.486-  
12 491, 1994.

13  
14 ALVES COSTA, C.P.; ETEROVICK, P.C. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua*,  
15 *Procyonidae*) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. **Acta**  
16 **Oecologica**, v.32, p.77-92, 2007.

17  
18 BARKER, I.K.; POVEY, R.C.; VOIGT, D.R. Response of mink, skunk, red fox and raccoon  
19 to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and  
20 prevalence of antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario. **Canadian Journal of**  
21 **Comparative Medicine**, v.47, p.188-197, 1983.

22  
23 BATTILANI, M.; SCAGLIARINI, A.; TISATO, E.; TURILLI, C.; JACOBONI, I.;  
24 CASADIO, R.; PROSPERI, S. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and  
25 dogs isolated in Italy. **Journal of General Virology**, v.82, p.1555–1560, 2001.

26  
27 BATTILANI, M.; GALLINA, L.; VACCARI, F.; MORGANTI, L. Co-infection with  
28 multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV2). **Veterinary Research**  
29 **Communications**, v.-31, p.209-212, 2007.

30  
31 BATTILANI, M.; BALBONI, A.; USTULIN, M.; GIUNTI, M.; SCAGLIARINI, A.;  
32 PROSPERI, S. Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in  
33 naturally infected cats. **Veterinary Research**, v.42, n.1, p.43, 2011.

- 1 BATTILANI, M.; BALBONI, A.; GIUNTI, M.; PROSPERI, S. Co-infection with feline and  
2 canine parvovirus in a cat. **Veterinaria Italiana**, v.49, n.1, p.127-129, 2013.
- 3
- 4 BEISIEGEL, B.M. Notes on the coati *Nasua nasua* (carnivora:Procyonidae) in an Atlantic  
5 forest area. **Brazilian Journal of Biology**, v.61, n.4, p.689-692, 2001.
- 6
- 7 BEISIEGEL, M.B.; LEMOS, G.F.; AZEVEDO, C.F.; QUEIROLO, D.; JORGE, S.R.  
8 Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-Mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no  
9 Brasil. **Revista Biodiversidade Brasileira**. Seção: Avaliação do Estado de Conservação dos  
10 Carnívoros, v.3, p.138-145, 2013.
- 11
- 12 BERTA, A. *Cerdocyon thous*. **Mammalian Species**, v.186, p.1-4, 1982.
- 13
- 14 BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.;  
15 BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence  
16 for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v.82,  
17 p.3021-3025, 2001.
- 18
- 19 CARMICHAEL, L.; JOUBERT, J.; POLLOCK, R. A modified live canine parvovirus strain  
20 with novel plaque characteristics. 1- Viral attenuation and dog response. **The Cornell**  
21 **Veterinarian**, v.71, p.408-427, 1981.
- 22
- 23 CARMICHAEL, L. An annotated historical account of canine parvovirus. **Journal of**  
24 **Veterinary Medicine Series**, v.52, p.303-311, 2005.
- 25
- 26 CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.  
27 Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil.  
28 **Research in Veterinary Science**, v.90, p.336-340, 2011.
- 29
- 30 CHANG, S.; SGRO, J.; PARRISH, C. Multiple amino acids in the capsid structure of canine  
31 parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and  
32 hemagglutination properties. **Journal of Virology**, v.66, p.6858-6867, 1992.
- 33

- 1 CHAVES, B.R.N.; SANTOS, F.R. Diversidade genética e implicações para o manejo de  
2 quatis (*Procyonidae: Nasua nasua*). In: **Seminário de Avaliação de Andamento de**  
3 **Dissertações e Teses**, Belo Horizonte, MG, 2009.
- 4
- 5 CHEVILLARD HUGOT, M.C.; MULLER, E.F.; KULZER, E. Oxygen consumption, body  
6 temperature and heart rate in the coati (*Nasua nasua*). **Comparative Biochemistry and**  
7 **Physiology**, v.65, p.305-309, 1980.
- 8
- 9 COSTA, A.; LEITE, J.; LABARTHE, N.; GARCIA, R. Genomic typing of canine parvovirus  
10 circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain  
11 reaction assay. **Veterinary Research Communications**, v.29, p.735-743, 2005.
- 12
- 13 COTMORE, S.; TATTERSALL, P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms.  
14 **Advances in Virus Research**, v.70, p.183-232, 2007.
- 15
- 16 COURTENAY, O.; MAFFEI, L. *Cerdocyon thous*. IUCN red list of threatened species. In:  
17 IUCN 2010. <http://www.iucnredlist.org/details/4248/0>, Version 2010. Acesso em 26 de junho  
18 de 2016.
- 19
- 20 CURI, N.H.A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of Leishmania  
21 infection in freeranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park.  
22 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.99-101, 2006.
- 23
- 24 CURI, N.H.A.; ARAÚJO, A. S.; CAMPOS, F. S.; LOBATO, Z. I. P.; GENNARI, S. M.;  
25 MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. C. R.; TALAMONI, S. A. Wild canids, domestic dogs and  
26 their pathogens in Southeast Brazil: Disease threats for canid conservation. **Biodiversity and**  
27 **Conservation**, v.19, p.3513–3524, 2010.
- 28
- 29 DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, E.;  
30 COLAIANNI, M.; LORUSSO, A.; BUONAVOGLIA, C. Tissue distribution of the antigenic  
31 variants of canine parvovirus type 2 in dogs. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.39-44,  
32 2007b.
- 33

- 1 DEPLAZES, P.; HEGGLIN, D.; GLOOR, S.; ROMIG, T. Wilderness in the city: the  
2 urbanization of *Echinococcus multilocularis*. **Trends in Parasitology**, v.20, p.77-84, 2004.
- 3
- 4 DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.;  
5 MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus  
6 infection: wich diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**, v.126, p.179-185,  
7 2005.
- 8
- 9 EMMONS, L.H. Neotropical rainforest mammals: a field guide. **The University of Chicago**  
10 **Press**, p.306, 1999.
- 11
- 12 ESFANDIARI, J.; KLINGEBORN, B. A comparative study of a new rapid one-step test for  
13 the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. **Journal of Veterinary**  
14 **Medicine, Series B**, v.47, p.145-153, 2000.
- 15
- 16 FACURE, K.G.; MONTEIRO, E.L.A.F. Feeding habits of the Crab-eating fox, *Cerdocyon*  
17 *thous* (Carnivora, *Canidae*), in a suburban area of southeastern Brazil. **Mammalia**, v.60,  
18 p.147-149, 1996.
- 19
- 20 FONTANA, D.S.; ROCHA, P.R.D.; CRUZ, R.A.S.; LOPES, L.L.; MELO A.L.T.;  
21 SILVEIRA M.M.; AGUIAR D.M.; PESCADOR, C.A. A phylogenetic study of canine  
22 parvovirus type 2c in midwestern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.214-218,  
23 2013.
- 24
- 25 FURTADO, M.M.; KASHIVAKURA, C.K.; FERRO, C.; ASTETE, S.H.; SUERO, D.;  
26 TÔRRES, N.M.; JÁCOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L. Impacto de atropelamento de mamíferos  
27 na região do Parque Nacional das Emas. In: **Resumos do XXV Congresso Brasileiro de**  
28 **Zoologia**, Brasília, DF, 2004.
- 29
- 30 GARCELON, D.K.; WAYNE, R.K.; GONZALES, B.J. A serologic survey of the island fox  
31 (*Urocyon littoralis*) on the Channel Islands, California. **Journal of Wildlife Diseases**, v.28,  
32 p.223-229, 1992.
- 33

- 1 GESE, E.M.; SCHULTZ, R.D.; RONGSTAD, O.J; ANDERSES, D.E. Prevalence of  
2 antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in wild coyotes in  
3 southeastern Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v.27, p.320-323, 1991.  
4
- 5 GODDARD, A.; LEISEWITZ, A.; CHRISTOPHER, M.; DUNCAN, N.; BECKER P.  
6 Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. **Journal of**  
7 **Veterinary Internal Medicine**, v.22, p 3009-3016, 2008.  
8
- 9 GORDON, J.; ANGRICK, E. Canine parvovirus: Environmental effects on infectivity.  
10 **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.1464-1467, 1988.  
11
- 12 GOVINDASAMY, L.; HUEFFER, K.; PARRISH, C.; AGBANDJE-MCKENNA, M.  
13 Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvovirus and  
14 mutants. **Journal of Virology**, v.77, p.12211-12221, 2003.  
15
- 16 GREENE, C.; SCHULTZ, R. Immunoprophylaxis in: **Greene**, Infectious Diseases of the Dog  
17 and Cat, Saunders, 3<sup>a</sup> ed, Missouri, USA, 2006.  
18
- 19 GROMPPER, M.E.; DECKER, D.M. Mammalian species: *Nasua nasua*. **American Society**  
20 **of Mammalogists**, v.58, p.1-9, 1998.  
21
- 22 GUILFORD, W. Gastrointestinal Tract Infections, Parasites and Toxicoses in: Guilford, W.;  
23 Strombeck, D., Williams, D.; Meyer, D. (eds). **Strombeck's Small Animal**  
24 **Gastroenterology**, WB Saunders 3<sup>a</sup> ed., Philadelphia, USA, Cap.21, p.411-432, 1996.  
25
- 26 GUIMARÃES, F.R.; SADDI, T.M.; CARDOSO, J.R.; ARAÚJO, L.B.M.; ARAÚJO, E.G.  
27 Estudo de patógenos de potencial zoonótico em procionídeos. **Revista de Patologia**  
28 **Tropical**, v.41, n.3, p.253-269, 2012.  
29
- 30 HARBINSON, C.; CHIORINI, A.; PARRISH, C. The Parvovirus capsid odyssey: from the  
31 cell surface to the nucleus. **Trends in Microbiology**, v.16, p.208-214, 2008.  
32

- 1 HOELZER, K.; SHACKELTON, L.; PARRISH, C.; HOLMES, E. Phylogenetic analysis  
2 reveals the emergence, evolution and dispersal of canine parvoviruses. **Journal of General**  
3 **Virology**, v.89, p.2280-2289, 2008a.
- 4
- 5 HOELZER, K.; SHACLELTON, L.; HOMES, E.; PARRISH, C. Within host genetic  
6 diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. **Journal of Virology**, v.82,  
7 p.11096-11105, 2008b.
- 8
- 9 HOELZER, K.; PARRISH, C. The emergence of parvoviruses of carnivores **Veterinary**  
10 **Research**, v.41, p.39, 2010.
- 11
- 12 HOMEM, V.S.F.; MENDES, Y.G.; LINHARES, A.C. Gastroenterite canina - agentes virais  
13 nas fezes de cães diarréicos e não diarréicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**  
14 **Zootecnia**, v.51, n.6, p.531-536, 1999.
- 15
- 16 HUBNER, S.O.; PAPPEN, F.G.; RUAS, J.L.; VARGAS, G.D.; FISCHER, G. & VIDOR, T.  
17 Exposure of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*)  
18 from the Southern region of Brazil to Canine distemper virus (CDV), Canine parvovirus  
19 (CPV) and Canine coronavirus (CCoV). **Brazilian Archives of Biology and Technology**,  
20 v.53, p. 593-597, 2010.
- 21
- 22 HUEFFER, K.; PARRISH, R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current**  
23 **Opinion in Microbiology**, v.6, p.392-398, 2003.
- 24
- 25 HUEFFER, K.; PARKER, J.; WEICHERT, W.; GEISEL, R.; SGRO, J.; PARRISH, C. The  
26 natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus  
27 specific binding to the canine transferring receptor. **Journal of Virology**, v.77, p.1718-1726,  
28 2003.
- 29
- 30 HUMAN VIROLOGY AT STANFORD: [www.tulane.edu/ridmsander/](http://www.tulane.edu/ridmsander/)  
31 [www/335/Parvoviruses.html](http://www/335/Parvoviruses.html). Último acesso em 15 de agosto de 2015.
- 32
- 33 HUMM, K.; HUGHES, D. Canine Parvovirus Infection in: Silverstein, D.; Hopper, K. (eds).  
34 **Small Animal Critical Care**, Saunders Missouri, USA, Cap.112, p.482-485, 2009.

- 1  
2 HURTADO, A.; RUEDA, P.; NOWICKY, J.; SARRASECA, J.; CASAL, I. Identification of  
3 domains in canine parvovirus VPE essential for the assembly of virus-like particles. **Journal**  
4 **of Virology**, v.70, p.5422-5429, 1996.  
5  
6 ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).  
7 <http://www.ictvonline.org/organization.asp>. Acesso em 16 de Agosto de 2016.  
8  
9 JORGE, R.S.P. Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC  
10 Pantanal e de animais domésticos da região. **Tese de Doutorado**, FMVZ - Universidade de  
11 São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.  
12  
13 KALLI, I.; LEONTIDES, L.; MYLONAKIS, M.; ADAMAMA, M.; RALLIS, T.;  
14 KOUTINAS, A. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final  
15 outcome in canine parvovirus infection. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.174-178,  
16 2010.  
17  
18 KENNEDY, M.; MELLON, V.; CALDWELL, G.; POTGIETER, L. Virucidal efficacy of the  
19 newer quaternary ammonium compounds. **Journal of the American Animal Hospital**  
20 **Association**, v.31, p.254-258, 1995.  
21  
22 KUMAR, M.; NANDI, S. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for  
23 detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. **Journal of Virological**  
24 **Methods**, v.169, p.198-201, 2010.  
25  
26 LANGONI, H.; KAWAGUCHI, M.F.; OSHIKA, J.C.; DA SILVA, R.C.; TEIXEIRA, C.R.  
27 *Leptospira* spp. antibodies in captive coatis (*Nasua nasua* Storr, 1780) (Carnivora:  
28 Procyonidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**,  
29 v.15, p. 762-767, 2009.  
30  
31 LACHERETZ, A.; LAPERROUSAZ, C.; KODJO, A.; BRAJON, N.; CREVAT, D.;  
32 GUILLOSSOU, S. Diagnosis of canine parvovirus by rapid immunomigration on a  
33 membrane. **The Veterinary Record**, v.152, v.48-50, 2003.  
34

- 1 LENGHAUS, C.; STUDDERT, M. Acute and chronic viral myocarditis. **American Journal**  
2 **of Pathology**, v.115, p.316-319, 1984.
- 3
- 4 LOBETTI, R. Canine Parvovirus and Distemper. Proceedings of the 28th Worlds Congress of  
5 the World Small Animal Association, Disponível em:  
6 [http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6671&O=Gener](http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6671&O=Generic)  
7 [ic](http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6671&O=Generic), Thailand, 2003.
- 8
- 9 MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I.; THOMPSON, CORNWELL H. Canine parvovirus  
10 enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection.  
11 **Veterinary Record**, v.115, p.201-210, 1984a.
- 12
- 13 MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I.; THOMPSON, H.; CORNWELL, H. Canine  
14 parvovirus enteritis 2: pathogenesis. **Veterinary Record**, v.115, p.453-460, 1984b.
- 15
- 16 MACINTIRE, D.; SMITH-CARR, S. Canine parvovirus, Part II Clinical signs, diagnosis and  
17 treatment. **Compendium of Continued Education for the Practicing Veterinary**, v.19,  
18 p.291-299, 1997.
- 19
- 20 MANN, P.C.; BUSH, M.; APPEL, M.J.G.; BEEHLER, B.A.; MONTALI, R.J. Canine  
21 parvovirus infection in South American canids. **Journal of the American Veterinary**  
22 **Medical Association**, v.177, p.779-783, 1980.
- 23
- 24 MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; PRATELLI, A.; BOZZO, G.; CAMERO, M.;  
25 BUONAVOGLIA, D.; NARCISI, D.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A. Canine  
26 parvovirus mutant is spreading in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1333-  
27 1336, 2004.
- 28
- 29 MATHYS, A.; MUELLER, R.; PEDERSEN, N.; THEILEN, H. Comparison of  
30 hemagglutination and competitive enzyme linked immunosorbent assay procedures for  
31 detecting canine parvovirus in feces. **America Journal of Veterinary Research**, v.44, v.152-  
32 154, 1983.
- 33

- 1 MCCAWE, D.; HOSKINS J. Canine Viral Enteritis in: Greene. **Infectious Diseases of the Dog**  
2 **and Cat**, WB Saunders, 3<sup>a</sup> ed., Philadelphia, USA. Cap.8, p.63-71, 2006.
- 3
- 4 MECH, L.D.; KURTZ, H.J.; GOYAL, S. Death of a wild wolf from canine parvoviral  
5 enteritis. **Journal of Wildlife Diseases**, v.33, p.321-322, 1997.
- 6
- 7 MEUNIER, P.; COOPER, B.; APPEL, M.; SLAUSON, D. Experimental viral myocarditis:  
8 parvoviral infection of neonatal pups. **Veterinary Pathology**, v.21, p.509-515, 1984.
- 9
- 10 MORAES, M.P.; COSTA, P.R. Parvoviridae. In: Flores, E.F. (ed). **Virologia Veterinária**,  
11 Santa Maria. 2<sup>a</sup> ed. UFMS, p.1008. 2012.
- 12
- 13 MOTTA, J.J.C.; LOMBARDI, J.A.; TALAMONI, S.A. Notes on Crab-eating fox *Dusicyon*  
14 *thous* seed dispersal and food habits in southeastern Brazil. **Mammalia**, v.58, p.156-159,  
15 1994.
- 16
- 17 PARADISO, P.; RHODE, S.; SINGER, I. Canine Parvovirus: a biochemical and  
18 ultrastructural characterization. **Journal of General Virology**, v.62, p.113-125, 1982.
- 19
- 20 PARK, J.; CHOI, B.; VIJAYACHANDRAN, L.; AYYAPPAN, V.; CHONG, C.; LEE, K.;  
21 KIM, S.; CHOI, C. Immunodetection of Canine Parvovirus (CPV) in clinical samples by  
22 polyclonal antisera against CPV-VP2 protein expressed in *Esherichia coli* as an antigen.  
23 **Journal of Virological Methods**, v.146, p.281-287, 2007.
- 24
- 25 PARRISH, C. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline  
26 parvoviruses. **Advances in Virus Research**, v.38, p.403-450, 1990.
- 27
- 28 PARRISH, C.; AQUANDRO, C.; STRASSHEIM, M.; EVERMANN, J.; SGRO, J.;  
29 MOHAMMED, H. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequences evolution of canine  
30 Parvovirus. **Journal of Virology**, v.65, p.6544-6552, 1991.
- 31
- 32 PARRISH, C. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. **Veterinary**  
33 **Microbiology**, v.69, p.29-40, 1999.
- 34

- 1 PINTO, L.D.; STRECK, A.F.; GONCALVES, K.R.; SOUZA, C.K.; CORBELLINI, A.O.  
2 Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus**  
3 **Research**, v.165, p.29-33, 2012.  
4
- 5 PRITTIE, J. Canine Parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention.  
6 **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.14, p.167-176, 2004.  
7
- 8 ROBINSON, W.; HUXTABLE, C.; PASS, D.; HOWELL, J. Clinical and  
9 electrocardiographic findings in suspected viral myocarditis of pups. **Australian Veterinary**  
10 **Journal**, v.55, p.351-355, 1979.  
11
- 12 RODRIGUES, A.S.M.; AURICCHIO, P. Canídeos do Brasil, Coleção *Terra Brasilis*. Série  
13 Zoologia - Zoo IV. Mamíferos do Brasil. **Terra Brasilis**, p.13, 1994.  
14
- 15 SCHWARTZ, D.; GREEN, B.; CARMICHAEL, L.; PARISH, C. The canine minute virus  
16 (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus.  
17 **Virology**, v.302, p.219-223, 2002.  
18
- 19 SHACKELTON, L.; PARRISH, C.; TRUYEN, U.; HOLMES, E. High rate of viral evolution  
20 associated with the emergence of canine parvovirus. **Proceedings of the National Academy**  
21 **of Sciences**, v.102, p.379-384, 2005.  
22
- 23 SIMPSON, A.; HÉBERT, B.; SULLIVAN, G.; PARRISH, C.; ZÁDORI, Z.; TIJSSEN, P.;  
24 ROSSMANN, M. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses.  
25 **Journal of Molecular Biology**, v.315, p.1189-1198, 2002.  
26
- 27 SINKOC, A.L.; BRUM, J.G.W.; MULLER, G. Gastrintestinal helminths of capybara  
28 (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) in cattle breeding farm in the area of the  
29 Ecological Reserve of Taim, Rio Grande. **Brazilian Archives of Biology and Technology**,  
30 v.52, p.327-333, 2009.  
31
- 32 SMITH-CARR, S.; MACINTIRE, D.; SWANGO, L. Canine Parvovirus, Part I Pathogenesis  
33 and Vaccination. **Compendium of Continued Education for the Practicing Veterinary**,  
34 v.19, p.125-133, 1997.

- 1  
2 SPITZER, A.; PARRISH, C.; MAXWELL, I. Tropic determinant for canine parvovirus and  
3 feline panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2. **Journal of General**  
4 **Virology**, v.70, p.925-928, 1997.  
5  
6 STEINEL, A.; MUNSON, L.; VUURUN, M.; TRUYEN, U. Genetic characterization of  
7 feline parvovirus sequence from various carnivores. **Journal of General Virology**, v.81,  
8 p.345-350, 2000.  
9  
10 STEINEL, A.; PARRISH, C.R.; BLOOM, M.E.; TRUYEN, U. Review: Parvovirus infections  
11 in wild carnivores. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, p.594-607, 2001.  
12  
13 STRECK, A. Detecção e caracterização de amostras de parvovírus suíno. **Dissertação**,  
14 Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande  
15 do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Brasil, 2009.  
16  
17 STROTTMANN, D.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L.; BARCELLOS, L.;  
18 FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D. Diagnóstico e estudo serológico da infecção pelo  
19 parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.38,  
20 p.400-405, 2008.  
21  
22 THOMAS, N.J.; FOREYT, W.J.; EVERMANN, J.F.; WINDBERG, L.A.; KNOWLTON,  
23 F.F. Seroprevalence of canine parvovirus in wild coyotes from Texas, Utah and Idaho (1972-  
24 1983). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, p.1283-1287,  
25 1984.  
26  
27 TIMONEY, J.; GILLESPIE, J.; SCOTT, F.; BARLOUGH, J. The *Parvoviridae* in: **Hagan**  
28 **and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**, Cornell  
29 University Press, 8ª ed., USA. Cap.41, p.501-521, 1992.  
30  
31 TRUYEN, U.; GRUENBERG, A.; CHANG, S.; OBERMAIER, B.; VEIJALAINEN, P.;  
32 PARRISH, C. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host  
33 range in vivo. **Journal of Virology**, v.69, p.4702-4710, 1995.  
34

- 1 TRUYEN, U.; PLATZER, G.; PARRISH, C. Antigenic type distribution among canine  
2 parvoviruses in dogs and cats in Germany. **Veterinary Record**, v.138, p.365-366, 1996.  
3
- 4 TRUYEN, U.; MUELLER, T.; HEIDRICH, R.; TACKMANN, K.; CARMICHAEL, L.  
5 Survey in viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on  
6 parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. **Epidemiology and**  
7 **Infection**, v.121, p.433-440, 1998.  
8
- 9 TSAO, J.; CHAPMAN, M.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LUO, M.;  
10 SMITH, T.; ROSSMANN, M.; COMPANS, R.; PARRISH, C. The three dimensional  
11 structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, v.251, p.1456-164,  
12 1991.  
13
- 14 TURISO, J.; CÓRTEZ, E.; MARTÍNEZ, C.; YBÁNEZ, R.; SIMARRO, I.; VELA, C.;  
15 CASAL, I. Recombinant vaccine or canine parvovirus in dogs. **Journal of Virology**, v.66,  
16 p.2748-2753, 1992.  
17
- 18 URL, A.; TRUYEN, U.; REBEL-BAUDER, B.; WEISSENBÖCK, H.; SCHMIDT, P.  
19 Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. **Journal of Clinical**  
20 **Microbiology**, v.41, p.3801-3805, 2003.  
21
- 22 VALASEK, M.; REPA, J. The power of real-time PCR. **Journal of Applied Physiology**,  
23 v.29, p.151-159, 2005.  
24
- 25 VIEIRA, M.; SILVA, E.; DESARIO, C.; DECARO, N.; CARVALHEIRA, J.;  
26 BUONAVOGLIA, C.; THOMPSON, G. Natural co-infection with 2 parvovirus variants in  
27 dog. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.678-679, 2008.  
28
- 29 VIEIRA, M.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON,  
30 G. Parvovirose Canina em Portugal. **Veterinary Medicine**, v.13, n.78, p.55-62, 2011.  
31
- 32 VIHINEN-RANTA, M.; SUIKKANEN, S.; PARRISH, C. Pathways of cell infection by  
33 parvoviruses and adeno-associated virus". **Journal of Virology**, v.78, p.6709-6714, 2004.  
34

- 1 WANG, D.; YUAN, W.; DAVIS, I.; PARRISH, C. Nonstructural protein-2 and replication of  
2 Canine Parvovirus. **Virology**, v.240, p.273-281, 1998.  
3
- 4 WOODROFFE, R.; PRAGER, K.C.; MUNSON, L.; CONRAD, P.A.; DUBOVI, E.J.;  
5 MAZET, J.A.K. Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered  
6 African wild dogs (*Lycaon pictus*). **PLoS One**, v.7, e.30099, 2012.  
7
- 8 ZARNKE, R.L.; BALLARD, W.B. Serologic survey for selected microbial pathogens of  
9 wolves in Alaska, 1975–82. **Journal of Wildlife Diseases**, v.23, p.77-85, 1987.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

• Investigar o envolvimento de agentes infecciosos virais como causa da morte de um filhote de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e verificar a presença de vírus entéricos em uma população de quatis de vida livre.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Amplificar por meio de técnicas moleculares (PCR e RT-PCR) fragmentos gênicos do CDV, CAdV-1, CAdV-2, CaHV-1 e CPV-2 em órgãos de um filhote de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*);

• Avaliar a presença de rotavírus e CPV-2 nas fezes de uma população de quatis de vida livre ( $n=21$ ) por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e PCR, respectivamente.

• Analisar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos fragmentos gênicos de CPV-2 obtidos comparando com as sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank), incluindo os protótipos virais dos subtipos 2a, 2b e 2c, com intuito de verificar a similaridade entre as sequências e identificar o subtipo de CPV-2 presente no cachorro-do-mato e circulante na população de quatis avaliada;

• Realizar análise filogenética comparativa entre as sequências de nt do CPV-2 identificadas nesse estudo com aquelas disponíveis em bases públicas de dados (GenBank), incluindo os protótipos virais dos subtipos 2a, 2b e 2c.

### 3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

---

#### Artigo A

#### Identificação de parvovírus canino 2b em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) de vida livre<sup>1</sup>

Caroline G. Spera<sup>2</sup>, Gustavo C. Marques<sup>3</sup>, Luana A. Freitas<sup>2</sup>, Maíra B. Martins<sup>3</sup>, Elis Lorenzetti<sup>2</sup>, Carlos R. Teixeira<sup>3</sup>, Amauri A. Alfieri<sup>2\*</sup> e Alice F. Alfieri<sup>2</sup>

Spera C.G., Marques G.C., Freitas L.A., Martins M.B., Lorenzetti E., Teixeira C.R., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2016. [Identification of canine parvovirus 2b in crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) wildlife.] Identificação de parvovírus canino 2b em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) de vida livre. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Cx. Postal 10011, Londrina, PR 86057-970, Brasil. E-mail: alfieri@uel.br

#### ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV) belongs to *Parvoviridae* family and is the causal agent of one of the most dangerous infectious diseases in young dogs and it is responsible for a great number of deaths worldwide. The CPV has a linear ssDNA genome that codifies two structural proteins (VP1/VP2) and two non-structural proteins (NS1/NS2). The CPV-2 emerged as a variant of feline panleukopenia virus (FPV) which is adapted to the canine host by wild carnivores such as mink and foxes and spread rapidly. A few years later, CPV-2a emerged and replaced completely the CPV-2. After a new type called CPV-2b emerged and co-circulated with CPV-2a. In 2000, the CPV-2c was discovered and is co-circulating with CPV-2a and CPV-2b. The crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) is present in all Brazilian biomes and in some countries of South America. The aim of this study was to verify the involvement of viral infectious agents as cause of death of crab-eating fox wildlife detect the causal agent of diarrhea in a crab-eating fox. The Medical and Research Center for Wild Animals (CEMPAS) of the Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, received a crab-eating fox with 21 days old with diarrhea for attendance. The animal died and organ fragments (central nervous

1 system (CNS), intestine, kidney, heart, lung, tonsil, liver, and spleen) were collected. The  
2 nucleic acid extraction was performed using a combination of phenol/chloroform/isoamyl  
3 alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate methods. The extracted nucleic acid was  
4 submitted to RT-PCR assay that amplifies a fragment of the Canine distemper virus (CDV) N  
5 gene and to PCR assays that amplifies fragments of the Canine adenovirus A type 1 and type  
6 2 (CAAdV-1 and CAAdV-2) E gene; Canid herpesvirus type 1 (CaHV-1) glycoprotein B gene;  
7 and CPV-2 VP2 capsid protein gene. The CPV-2 PCR product was sequenced in ABI3500  
8 Genetic Analyzer sequencer. Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequence alignment (Clustal  
9 W) and the phylogenetic tree were performed in MEGA 5.05. The nt sequence identity matrix  
10 was performed in BioEdit. Out of eight organ fragments evaluated just the heart was positive  
11 to CPV-2 in PCR assay. The samples were negative in all other PCR and RT-PCR assays  
12 realized. The CPV-2 positive sample exhibited high (99.6%) nt identity with the CPV-2b  
13 prototype, CPV-39 strain. In the phylogenetic tree the strain described herein clustered with  
14 CPV-2b strains and in the aa analysis the strain revealed the presence of the codon GAT (D  
15 amino acid - Asp) at position 426 of the viral protein VP2 that characterize the subtype 2b.  
16 This report relates the detection of CPV-2b in a crab-eating fox wildlife in Brazil and the first  
17 description of CPV-2b in this species.

18

19 INDEX TERMS: CPV-2b, *Cerdocyon thous*, crab-eating fox, wildlife.

20

21

## RESUMO

22 O parvovírus canino (CPV) é um vírus icosaédrico, pequeno e não envelopado que pertence à  
23 família *Parvoviridae*. O CPV-2 é o agente etiológico da parvovirose canina, caracterizada por  
24 um quadro agudo de gastroenterite hemorrágica que acomete cães jovens geralmente no  
25 primeiro ano de vida. O genoma é constituído de DNA fita simples linear, tem  
26 aproximadamente 5 Kb e codifica duas proteínas estruturais (VP1/VP2) e duas proteínas não  
27 estruturais (NS1/NS2). O CPV-2 emergiu como uma variante do vírus da panleucopenia  
28 felina (FPV), adaptado ao hospedeiro canino pelos carnívoros silvestres, tais como raposas e  
29 martas e espalhou-se rapidamente. Alguns anos depois, o CPV-2a emergiu e substituiu  
30 completamente o CPV-2. Em seguida, emergiu um novo tipo chamado CPV-2b que cocircula  
31 com o CPV-2a.

32

33 Em 2000 foi descrito, o CPV-2c e atualmente cocircula com o CPV-2a e o CPV-2b. O  
34 cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) está presente em todos os biomas brasileiros e em  
alguns países da América do Sul. O presente estudo teve como objetivo verificar o

1 envolvimento de agentes infecciosos virais como causa da morte de um cachorro-do-mato  
2 (*Cerdocyon thous*) de vida livre. O Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens  
3 (CEMPAS) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu recebeu para atendimento  
4 um cachorro-do-mato, com aproximadamente três semanas de idade e aparentemente higido.  
5 Após 13 dias o animal apresentou anorexia, diarreia, febre, desidratação, hipotermia  
6 evoluindo para o óbito. Durante a necrópsia, foram colhidos fragmentos de órgãos (sistema  
7 nervoso central (SNC), intestino delgado e grosso, rim, coração, pulmão, tonsilas, fígado e  
8 baço) foram coletados para a identificação dos agentes virais. Foi realizada a extração do  
9 ácido nucleico utilizando a combinação das técnicas de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e  
10 sílica/isotiocianato de guanidina. O material extraído foi submetido à técnica de RT-PCR para  
11 amplificar um fragmento do gene N do vírus da cinomose canina (CDV) e à PCR para  
12 amplificar fragmentos do gene E do adenovírus canino A tipo 1 e tipo 2 (CAV-1 e CAV-2);  
13 do gene da glicoproteína B do herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) e do gene da proteína VP2  
14 do capsídeo do parvovírus canino. Dos oito fragmentos de órgãos avaliados apenas o  
15 fragmento do coração foi positivo para o CPV-2 na PCR. As amostras foram negativas em  
16 todas as outras PCR e RT-PCR realizadas. O produto de PCR do CPV-2 foi sequenciado em  
17 ABI3500 *Genetic Analyzer*. O alinhamento das sequências de nucleotídeo (nt) e aminoácido  
18 (aa) (*Clustal W*) e a árvore filogenética foram realizados no MEGA 5.05. A matriz de  
19 identidade das sequências de nucleotídeo foi realizada no *BioEdit*. A amostra positiva para  
20 CPV-2 apresentou alta identidade de nt (99,6%) com o protótipo CPV-2b, cepa CPV-39. Na  
21 árvore filogenética a cepa do presente estudo agrupou com cepas CPV-2b e na análise das  
22 sequências de aa a cepa revelou a presença do códon GAT (aminoácido D - Asp) na posição  
23 426 da proteína viral VP2 que caracteriza o subtipo 2b. O presente estudo relata a detecção de  
24 CPV-2b em um filhote de cachorro-do-mato de vida livre no Brasil e a primeira descrição de  
25 CPV-2b nesta espécie.

26

27 TERMOS DE INDEXAÇÃO: CPV-2b, *Cerdocyon thous*, cachorro-do-mato, vida livre.

28

29

## INTRODUÇÃO

30 O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) é um mamífero silvestre de pequeno  
31 porte que pode ser encontrado em várias regiões geográficas do Brasil e em outros países da  
32 América do Sul. Este animal é aparentemente tolerante a perturbações antrópicas, porém não  
33 à urbanização e está presente em todos os biomas brasileiros e em uma ampla variedade de  
34 habitats (Beisiegel et al., 2013). O cachorro-do-mato está na *Red List of Threatened Species*

1 pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) como risco de extinção Menos  
2 Preocupante (Courtenay & Maffei 2008). A vulnerabilidade da espécie está associada à  
3 destruição do seu ambiente natural, ao desmatamento para extensão de fronteiras agrícolas, à  
4 disseminação de comunidades urbanas no ambiente natural e à fragmentação de seu habitat  
5 pela construção de estradas (Deplazes et al. 2004, Furtado et al. 2004, Sinkoc et al. 2009).  
6 Além disso, doenças ocasionadas por patógenos que comumente acometem os cães  
7 domésticos e outras espécies selvagens podem levar a redução da população desses animais  
8 (Mech et al. 1997, Steinel et al. 2001, Curi et al. 2006).

9 O parvovírus canino (CPV) é um vírus pequeno, de simetria icosaédrica, não  
10 envelopado que pertence à espécie *Carnivore protoparvovirus 1*, gênero *Protoparvovirus*,  
11 subfamília *Parvovirinae*, família *Parvoviridae* (Murphy et al. 1999, ICTV 2016). O CPV  
12 possui genoma constituído de DNA fita simples linear com aproximadamente 5,000 pares de  
13 bases (pb) que codificam duas proteínas estruturais (VP1 e VP2) e duas não estruturais (NS1  
14 e NS2) (Moraes & Costa 2012). O CPV –2 foi identificado pela primeira vez em 1978 como  
15 um novo vírus que infectava canídeos (Parrish & Kawaoka 2005, Kapil et al. 2007). O CPV  
16 surgiu como uma variante do vírus da panleucopenia felina (FPV) que se adaptou ao  
17 hospedeiro canino por meio de carnívoros silvestres como martas e raposas (Truyen et al.  
18 1996, Hueffer et al. 2003). A origem do CPV-2 tem como hipótese a substituição de apenas  
19 dois aminoácidos (aa) na proteína VP2 do FPV, o que permitiu a utilização do receptor da  
20 transferrina (TfR) presente em células de cães, estabelecendo o CPV-2 como um novo  
21 patógeno para a espécie (Moraes & Costa 2012).

22 Atualmente o CPV-2 é subdividido em três subtipos – CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c,  
23 sendo que os três subtipos de CPV-2 já foram detectados em cães no Brasil (Castro et al.  
24 2011, Pinto et al. 2012, Headley et al. 2013, 2015). As vacinas comerciais disponíveis no  
25 Brasil contêm cepas atenuadas de CPV-2 ou CPV-2b (Castro et al. 2011). A principal  
26 diferença antigênica observada entre CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c está na posição 426 da  
27 sequência de aa da proteína VP2 do capsídeo viral. O subtipo 2a apresenta nessa posição o aa  
28 Asn (N), o subtipo 2b o aa Asp (D) e o subtipo 2c o aa Glu (E) (Parrish et al. 1991).

29 Um estudo realizado no Rio de Janeiro (RJ) analisou amostras coletadas entre os anos  
30 de 1995 a 2009 de cães vacinados apresentando diarreia, e o subtipo 2a de CPV foi o único  
31 detectado nas amostras coletadas entre 1995 a 2004 e os subtipos 2a e 2b foram detectados  
32 entre 2005 a 2009 (Castro et al. 2011). Outro estudo conduzido no RJ relatou a prevalência do  
33 CPV-2b durante o período de 1995 a 2002 (Costa et al. 2005). Pinto et al. (2012) relataram  
34 que o CPV-2c foi o principal subtipo detectado nas amostras com ou sem protocolo de

1 vacinação completo (78,6%; 33/42) provenientes de seis estados do Brasil, no período de  
2 2008 a 2010.

3 As doenças virais representam 56% dos patógenos que ameaçam as populações de  
4 carnívoros silvestres em todo o mundo (Pedersen et al. 2007). Na América do Norte três  
5 populações de coiotes (*Canis latrans*) (Barker et al. 1983, Thomas et al. 1984, Gese et al.  
6 1991) e uma população de lobos cinzentos (*Canis lupus*) foram sorologicamente positivas  
7 para o CPV-2 (Zarnke & Ballard 1987). A prevalência sorológica, a infecção e os sinais  
8 clínicos da doença ocasionada pelo CPV-2 já foram descritos em chacais (*Canis aureus*,  
9 *Canis adustus* e *Canis mesomelas*), raposas-cinzentas (*Urocyon littoralis*) e cachorro-do-mato  
10 (*Cerdocyon thous*) (Mann et al. 1980, Garcelon et al. 1992, Alexander et al. 1994). Na África,  
11 Woodroffe et al. (2012) demonstraram por técnicas sorológicas, a exposição ao CPV-2 tanto  
12 em cães silvestres como nos domésticos que viviam na mesma região geográfica, sugerindo a  
13 possível transmissão do CPV entre essas populações.

14 No Brasil, alguns estudos relataram a presença de animais silvestres soropositivos para  
15 CPV-2 pela técnica de inibição da hemaglutinação (HI), tais como cachorro-do-mato  
16 (*Cerdocyon thous*) (Jorge 2008, Curi et al. 2010), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Jorge  
17 2008, Curi et al. 2010), raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) (Curi et al. 2010), mão-pelada  
18 (*Procyon cancrivorus*) (Jorge 2008), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Jorge 2008), onça-  
19 parda (*Puma concolor*) (Jorge 2008) e cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (Jorge 2008).

20 Na Itália, Battilani et al. (2001) relataram a presença de CPV-2b utilizando a técnica  
21 de PCR em quatro amostras de fezes de lobos (*Canis lupus*). Nos EUA, Mech et al. (2012)  
22 descreveram a utilização da técnica de Real-time PCR para a detecção de CPV-2 em fezes de  
23 *Canis lupus*. No Brasil, estudos utilizando técnicas de biologia molecular para identificação  
24 de CPV-2 em animais silvestres são escassos.

25 Mech et al. (1997) descreveram a possibilidade de animais silvestres da família  
26 *Canidae* se infectarem com vírus detectados em animais domésticos e manifestarem sinais  
27 clínicos semelhantes. O presente estudo teve como objetivo verificar o envolvimento de  
28 agentes infecciosos virais como causa da morte de um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)  
29 de vida livre.

30

31

## MATERIAL E MÉTODOS

32 Em 2014, um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), fêmea, com aproximadamente 21 dias de  
33 idade de vida livre foi encaminhado de Bauru-SP ao Centro de Medicina e Pesquisa em  
34 Animais Selvagens (CEMPAS) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

1 (UNESP) em Botucatu. Durante o exame físico o animal estava hígido e com estado geral  
2 bom e começou a receber amamentação artificial com *PetMilk*, 40 mL a cada 3 h. Após 11  
3 dias no CEMPAS, o animal foi identificado com o *microchip AnimallTAG* de número  
4 9630080000463844. No 13º dia o animal começou a apresentar diarreia fétida de cor amarela,  
5 anorexia, febre e prostração. O hemograma revelou a presença de anemia microcítica  
6 hipocrômica, leucopenia e hipoproteinemia (Quadro 1) quando comparado com os valores de  
7 referência para a espécie (Mattoso et al. 2012). No 18º dia, o animal manifestou sinais  
8 neurológicos caracterizados por incoordenação motora com movimentos de pedalagem,  
9 evoluindo para choque hipovolêmico, convulsão e morte.

10 O animal foi submetido à necropsia e foram coletados em duplicata com luva estéril  
11 fragmentos de encéfalo, pulmão, rim, fígado, baço, intestino (delgado e grosso), coração e  
12 tonsilas. Parte dos fragmentos foi fixada por imersão em solução de formol tamponado a 10%  
13 e processados conforme procedimento de rotina para a avaliação histopatológica. A outra  
14 parte foi mantida em freezer a -80°C até o processamento.

15 Para a posterior realização dos procedimentos de identificação viral por técnicas  
16 moleculares, PCR para detecção de vírus DNA e RT-PCR para detecção de vírus RNA, foi  
17 realizada a extração do ácido nucleico, 500 microlitros de cada sobrenadante foi submetido a  
18 associação das técnicas de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de  
19 guanidina como descrito por Alfieri et al. (2006). Para a identificação do vírus da cinomose  
20 canina as amostras foram submetidas à RT-PCR para amplificar um fragmento 287 pb do  
21 gene N como descrito por Frisk et al. (1999) e Saito et al. (2006). Para detectar adenovírus  
22 canino tipo 1 e tipo 2 (CAV-1 e CAV-2), herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) e parvovírus  
23 canino (CPV-2) foi realizada a técnica de PCR para obter fragmentos de 508 pb e 1,030 pb do  
24 gene E (Hu et al. 2001), 450 pb do gene que codifica a glicoproteína B (Ronsse et al. 2005) e  
25 583 pb do gene que codifica a proteína VP2 (Hong et al. 2007), respectivamente. Em todos os  
26 procedimentos de extração do ácido nucleico, PCR e RT-PCR foram incluídas alíquotas de  
27 água ultrapura estéril como controle negativo. Como controles positivos foram utilizadas  
28 amostras positivas e sequenciadas de cada um dos vírus pesquisados pertencentes à coleção  
29 do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Alíquotas  
30 de 5 µL dos produtos amplificados na RT-PCR e PCR foram submetidas a eletroforese em gel  
31 de agarose 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob  
32 voltagem constante (100V) por 40 min, coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e  
33 visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas.

1 O produto amplificado na PCR para CPV foi purificado utilizando o kit comercial  
2 *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo* (Invitrogen Life Technologies,  
3 Carlsbad, CA, USA), quantificado em *Qubit Fluorometer* (Invitrogen Life Technologies,  
4 Eugene, OR, USA) e sequenciado com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*  
5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em ambas as direções utilizando os mesmos  
6 *primers* da PCR, em sequenciador automático ABI3500 *Genetic Analyzer*. A qualidade da  
7 sequência obtida foi avaliada pelo programa Phred e o *contig* foi obtido no programa CAP3.  
8 A sequência de nucleotídeo (nt) foi comparada com as sequências depositadas em bases  
9 públicas de dados (*GenBank*) para verificar a similaridade. O alinhamento (*Clustal W*) das  
10 sequências de nt e aminoácido (aa) foi realizado no MEGA 5.05. A árvore filogenética  
11 baseada nas sequências de nt foi obtida utilizando o método de *Neighbor-joining* com o  
12 modelo de *Kimura 2-parameter* com 1,000 réplicas no MEGA 5.05. A matriz de identidade  
13 de nt foi realizada no *BioEdit* versão 7.1.3.0. A sequência de nt obtida no presente estudo foi  
14 depositada no *GenBank* sob o número de acesso: XXXXX.

## 15

## 16 RESULTADOS

17 Na necropsia (Figura 1), nas lesões macroscópicas foi observada palidez de mucosas (Figura  
18 2) e órgãos, efusão abdominal serosa (20ml) (Figura 3), enterite mucoide difusa, congestão  
19 pulmonar difusa, áreas de hemorragia em coração (Figura 4) e congestão hepática grave. Na  
20 histopatologia, foi observada congestão encefálica discreta, pneumonia intersticial com  
21 infiltrado de células inflamatórias mononucleares (Figura 5), congestão moderada dos vasos  
22 pulmonares e congestão acentuada associada à degeneração epitelial tubular discreta no rim.

23 Dos oito fragmentos de órgãos analisados somente um *amplicon* com 583 pb do gene  
24 que codifica a proteína VP2 do capsídeo viral do CPV-2 foi amplificado, no fragmento  
25 correspondente ao coração. Em nenhum outro órgão foi possível detectar fragmentos  
26 correspondentes ao tamanho molecular esperado para CDV, CAdV-1, CAdV-2 e CaHV-1. A  
27 análise da sequência de nt da cepa de CPV detectada demonstrou elevada identidade (99,6%)  
28 com a cepa protótipo do CPV-2b (cepa CPV-39), com a cepa W42 (99.6%) detectada em um  
29 lobo na Itália e com outras cepas de CPV-2b (99.2 a 99.6%) depositadas em bases públicas de  
30 dados. Na árvore filogenética a cepa agrupou com as cepas CPV-2b (Figura 6) e na análise de  
31 aa demonstrou a presença do códon GAT (aminoácido D - Asp) na posição 426 da proteína  
32 VP2 confirmando que a cepa analisada no presente estudo pertence ao subtipo 2b (Quadro 2).

33  
34

## DISCUSSÃO

Essa é a primeira descrição do CPV-2b em um cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre, considerada uma espécie silvestre brasileira comum, que vive em matilhas, não são vacinados e geralmente vivem próximos a locais habitados em busca de alimento. O CPV é o agente etiológico de uma das mais importantes doenças infecciosas que acometem os cães jovens (Pedroza-Róldan et al. 2015) e outros membros da família *Canidae* no mundo todo (Mech et al. 1997, 2012).

No Norte da Espanha, Millán et. al. (2016) analisaram 54 amostras de lobos nos anos de 2010 e 2013, por meio de técnicas sorológicas de inibição da hemaglutinização e moleculares (PCR) para a exposição a quatro vírus patogênicos para cães domésticos (CPV, CDV, CAdV-1, CAdV-2 e CaHV-1). Um total de 76% dos lobos avaliados apresentaram exposição ao CPV (96% por HI; 66% por PCR) e 75% para o CAdV (75% por sorologia; 76% por PCR), existindo a coinfeção de CPV e CAdV-1 em 51% dos lobos avaliados. No presente trabalho em nenhum dos órgãos avaliados por técnicas moleculares foi possível detectar a presença de material genético de CDV, CAdV-1, CAdV-2 e CaHV-1.

O leucograma demonstrou 5.300 leucócitos totais sendo que o valor de normalidade para a espécie é de 10.300 a 16.500 por Mattoso et al. 2012, caracterizando desta forma, leucopenia grave que provavelmente foi decorrente da replicação viral em medula óssea que promove a destruição de células jovens de linhagem sanguínea e do sistema linfóide. Essa condição favorece a instalação de infecção bacteriana secundária e quando associada à condições de desidratação pode levar ao desequilíbrio eletrolítico, choque endotóxico e sepse (Nandi & Kumar 2010).

Os achados macroscópicos observados são compatíveis com os descritos na literatura para cães que vieram a óbito por infecção por CPV-2. A presença de sinais neurológicos em cães domésticos com parvovirose podem ser observados quando ocorre coagulação intravascular disseminada no sistema nervoso central ou em situações de hipoglicemia associadas à desidratação (Hueffer et al. 2003).

O edema pulmonar e a congestão passiva do fígado com grau variável de efusão abdominal e derrame pleural geralmente estão presentes em casos de miocardite ocasionados pelo CPV (Hayes et al. 1979b). As congestões pulmonar e hepática podem estar associadas à insuficiência cardíaca provocada pelo CPV. A manifestação clínica de miocardite é a principal causa de morte súbita em filhotes jovens com aproximadamente quatro semanas de idade (Mochizuki et al. 1996).

1 O animal foi encaminhado ao CEMPAS e estava aparentemente saudável. Não existe  
2 histórico de como esse filhote de cachorro-do-mato se separou da matilha e o caminho que  
3 percorreu até ser encontrado, sendo assim, há várias hipóteses de como e quando ocorreu a  
4 infecção. O animal passou a manifestar sinais clínicos após 13 dias, por isso acredita-se que a  
5 contaminação possa ter ocorrido depois do animal ter chegado ao CEMPAS. O CPV-2b,  
6 assim como o CPV-2a e o CPV-2c, em condições de campo, têm período de incubação de 4 a  
7 6 dias. Por ser bastante resistente às condições ambientais e excretado em grande quantidade  
8 nas fezes ( $10^{12}$  partículas por grama de fezes) (Calderón et al. 2011) a contaminação do  
9 ambiente se torna muito fácil. O CEMPAS recebe outros animais silvestres suscetíveis ao  
10 CPV que podem excretar o vírus, de forma assintomática, situação que também é comum  
11 entre os cães domésticos. Outra hipótese para a presença do vírus no ambiente envolvendo a  
12 resistência da partícula viral é a transmissão iatrogênica pelos próprios médicos veterinários,  
13 pelo uso de roupas ou equipamentos de uso diário no atendimento hospitalar, ou ainda a  
14 presença de vetores, ou pelos de animais e outros fômites que possam atuar na transmissão  
15 horizontal do vírus. Hipóteses de contato com cães domésticos também não podem ser  
16 descartadas, pois existe a possibilidade de transmissão durante o trajeto do animal até o  
17 CEMPAS. Como esta é a primeira descrição do CPV-2b nessa espécie silvestre, pode ser que  
18 ocorra um período de incubação maior, situação que foi verificada a campo com a cepa de  
19 CPV-2 original que possui período de incubação de 7 a 14 dias em cães domésticos (*Canis*  
20 *familiaris*) (Moraes & Costa 2012).

21 O único órgão positivo para CPV-2b foi o coração, sendo possível correlacionar esse  
22 achado com o descrito na década de 80 em cães domésticos com transmissão vertical do vírus  
23 em filhotes com idade igual ou menor que seis semanas de vida. Essa condição é incomum  
24 nos dias de hoje entre os cães domésticos pois a maioria das cadelas, mesmo as não  
25 vacinadas, entram em contato com o vírus de campo e passam anticorpos maternos pelo  
26 colostro, protegendo os filhotes da infecção no útero ou nas primeiras semanas de idade.  
27 Populações silvestres de vida livre não são vacinadas e normalmente vivem em matilhas  
28 isoladas, diminuindo a possibilidade de contato com o vírus. A saída do seu habitat natural, o  
29 possível contato com o cão doméstico que é reservatório do vírus, ou ambiente contaminado,  
30 pode ter possibilitado a transmissão do CPV-2 ao filhote de cachorro-do-mato. A idade  
31 estimada do animal quando foi recebido pelo CEMPAS era de 21 dias (três semanas de  
32 idade), nessa faixa etária as células do miocárdio estão em intensa atividade mitótica,  
33 disponibilizando a enzima polimerase celular que é essencial para a replicação viral. Isso

1 torna as células em fase S do ciclo celular um alvo específico para o CPV-2 (Moraes & Costa  
2 2012).

3 A miocardite com insuficiência cardíaca em filhotes geralmente observada em animais  
4 com menos de três meses de idade desprovidos de imunidade passiva (Hayes et al. 1979a)  
5 pode justificar a presença do vírus exclusivamente no tecido cardíaco do cachorro-do-mato.

6 As variantes antigênicas 2a, 2b e 2c do CPV-2 são descritas mundialmente,  
7 predominam em diferentes proporções na população canina e a sua frequência varia de acordo  
8 com a região geográfica analisada e o tempo/ano da coleta da amostra (Pérez et al. 2012).

9 Alguns estudos conduzidos no Brasil entre 1990 e 1995 (Pereira et al. 2000), nos EUA  
10 (Parrish et al. 1988), no Japão (Hirasawa et al. 1996), na Suíça (Truyen et al. 2000) e na  
11 África do Sul (Steinel et al. 1998) relataram que CPV-2b foi o subtipo mais prevalente nos  
12 cães avaliados. CPV-2a foi a cepa mais detectada na França, Taiwan e Itália (Chang et al.  
13 1992, Martella et al. 2004). Na Espanha CPV-2a e CPV-2b, foram encontrados distribuídos  
14 em proporções equivalentes (Ybanez et al. 1995). CPV-2c foi a cepa mais detectada no Vietnã  
15 (Nakamura et al. 2004), na Espanha (Decaro et al. 2006), no Reino Unido (Decaro et al.  
16 2007), no Uruguai (Pérez et al. 2007), na Argentina (Calderón et al. 2011) e no México  
17 (Pedroza-Róldan et al. 2015). Na Itália, Battilani et al. (2001) confirmaram que todas as cepas  
18 de CPV-2 circulantes em lobos silvestres pertenciam ao CPV-2b e concluíram que a mesma  
19 cepa estava predominantemente circulando entre os cães domésticos durante o mesmo período  
20 no país.

21 Os três subtipos de CPV já foram descritos em cães domésticos no Brasil (Pereira et  
22 al. 2007, Streck et al. 2009, Castro et al. 2011, Pinto et al. 2012, Fontana et al. 2013, Headley  
23 et al. 2013, 2015). Mutações-chave no gene VP1/VP2 do CPV-2 podem elevar a taxa de  
24 replicação viral permitindo que o vírus se dissemine mesmo em cães vacinados, Castro et al.  
25 (2011), demonstraram que não houve a substituição das cepas CPV-2a e 2b circulantes pela  
26 2c, mas que elas permanecem distribuídas de forma homogênea entre as populações avaliadas  
27 tanto no Brasil quanto em outros países do mundo. No Brasil os casos de parvovirose ainda  
28 ocorrem principalmente nas populações de cães não vacinadas, esse fato pode estar associado  
29 ao número de cães errantes, cerca de 37,1 milhão, que perambulam pelas diferentes regiões  
30 brasileiras (Censo IBGE, 2011/ ABINPET, 2012), e que podem manter em circulação as  
31 diferentes cepas de CPV-2 e facilitar a transmissão para outros animais ou espécies  
32 susceptíveis tanto domésticas quanto silvestres.

33

34

## CONCLUSÃO

Os achados clínicos e laboratoriais, as lesões macro e microscópicas e a detecção e caracterização do CPV-2b por meio da utilização da PCR e análise das sequências de nt e aa demonstraram o envolvimento deste vírus no óbito do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre, evidenciando que esta enfermidade também pode afetar canídeos silvestres. Esta é a primeira descrição do CPV-2b em um cachorro-do-mato no Brasil e desta forma, o CPV deve ser incluído como diagnóstico diferencial na clínica de silvestres auxiliando na proteção à integridade sanitária desses animais.

**Agradecimentos.** - Este trabalho foi financiado com recursos obtidos junto às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FINEP e Fundação Araucária (FAP/PR). Alfieri A.A. e Alfieri A.F. são bolsistas de produtividade em pesquisa do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Alexander P.W.K., Wayne R.K. & Fuller T.K. 1994. Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. *J. Wildlife Dis.* 30:486-491.
- Alfieri A.A., Parazzi M.E., Takiuchi E., Médici K.C. & Alfieri A.F. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38:521-526.
- Barker I.K., Povey R.C. & Voigt D.R. 1983. Response of mink, skunk, red fox and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence of antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario. *Can. J. Comp. Med.* 47:188-197.
- Battilani M., Scagliarini A., Tisato E., Turilli C., Jacoboni I., Casadio R. & Prospero S. 2001. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J. Gen. Virol.* 82:1555-1560.
- Beisiegel M.B., Lemos G.F., Azevedo C.F., Queirolo D. & Jorge S.R. 2013. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-Mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Revista Biodiversidade Brasileira. Seção: Avaliação do Estado de Conservação dos Carnívoros.* 3:138-145.

- 1  
2 Calderón M.G., Romanuttia C., D'Antuonoa A., Kellerb L., Mattiona N. & La Torre J. 2011.  
3 Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has  
4 become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res.*  
5 157:106-110.  
6
- 7 Castro T.X., Costa E.M., Leite J.P., Labarthe N.V. & Cubel Garcia R.C. 2011. Monitoring of  
8 canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res. Vet. Sci.*  
9 90:336-340.  
10
- 11 Chang S.F., Sgro J.Y. & Parrish C.R. 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of  
12 canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and  
13 haemagglutination properties. *J. Virol.* 66:6858-6867.  
14
- 15 Costa A.P., Leite J.P. & Labarthe N.V. 2005. Genomic typing of canine parvovirus  
16 circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain  
17 reaction assay. *Vet. Res. Commun.* 29:735-743.  
18
- 19 Courtenay O. & Maffei L. 2008. *Cerdocyon thous*. In: IUCN 2010. IUCN red list of  
20 threatened species. Version 2010.4. Acesso em 26 de junho de 2016.  
21
- 22 Curi N.H.A., Miranda I. & Talamoni S.A. 2006. Serologic evidence of *Leishmania* infection  
23 in freeranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem. Inst.*  
24 *Oswaldo Cruz* 101:99-101.  
25
- 26 Curi N.H.A., Araújo A.S., Campos F.S., Lobato Z.I.P., Gennari S.M., Marvulo M.F.V., Silva  
27 J.C.R. & Talamoni S.A. 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in  
28 Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation*  
29 19:3513-3524.  
30
- 31 Decaro N., Elia G., Martella V., Campolo M., Desario C. & Camero M. 2006. First detection  
32 of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. B*  
33 53:468-472.  
34

- 1 Decaro N., Desario C., Addie D.D., Martella V., Vieira M.J., Elia G., Davis C., Thompson G.,  
2 Truyen U. & Buonavoglia C. 2007. The study of molecular epidemiology of canine  
3 parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1222-1224.  
4
- 5 Deplazes P., Heggin D., Gloor S. & Romig T. 2004. Wilderness in the city: the urbanization  
6 of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol.* 20:77-84.  
7
- 8 Fontana D.S., Rocha P.R.D., Cruz R.A.S., Lopes L.L., Melo A.L.T., Silveira M.M., Aguiar  
9 D.M. & Pescador C.A. 2013. A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in  
10 midwestern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 33:214-218.  
11
- 12 Frisk A.L., Konig M., Moritz A. & Baumgartner W. 1999. Detection of canine distemper  
13 virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and  
14 cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37:3634-3643.  
15
- 16 Furtado M.M., Kashivakura C.K., Ferro C., Astete S.H., Suero D., Tôres N.M., Jácomo  
17 A.T.A. & Silveira L. 2004. Impacto de atropelamento de mamíferos na região do Parque  
18 Nacional das Emas. In: Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, Brasília, DF.  
19
- 20 Garcelon D.K., Wayne R.K. & Gonzales B.J. 1992. A serologic survey of the island fox  
21 (*Urocyon littoralis*) on the Channel Islands, California. *J. Wildlife Dis.* 28:223-229.  
22
- 23 Gese E.M., Schultz R.D., Rongstad O.J & Andersen D.E. 1991. Prevalence of antibodies  
24 against canine parvovirus and canine distemper virus in wild coyotes in southeastern  
25 Colorado. *J. Wildlife Dis.* 27:320-323.  
26
- 27 Hayes M.A., Russell R.G. & Babiuk L.A. 1979a. Sudden death in young dogs with  
28 myocarditis caused by parvovirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174:1197-1203.  
29
- 30 Hayes M.A., Russell R.G., Mueller R.W. & Lewis R.J. 1979b. Myocarditis in young dogs  
31 associated with a parvovirus-like agent. *Can. Vet. J.* 20:126-132.  
32
- 33 Headley S.A., Alfieri A.A., Fritzen J.T.T., Garcia J.L., Weissenböck H., Bodnar L., da Silva,  
34 A.P. & Alfieri A.F. 2013. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis,

- 1 canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a  
2 puppy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25:129-135.
- 3
- 4 Headley S.A., Santos T.R., Bodnar L., Saut J.P.E., Silva A.P., Alfieri A.F., Medeiros A.A.,  
5 Soares N.P. & Alfieri A.A. 2015. Molecular detection and phylogenetic relationship of  
6 wild-type strains of canine distemper virus in symptomatic dogs from Uberlândia, Minas  
7 Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 67:1510-1518.
- 8
- 9 Hirasawa T., Yono K. & Mikazuki K. 1996. Detection and genomic analysis of canine  
10 parvovirus by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Brasil.* 43:545-554.
- 11
- 12 Hong C., Decaro N., Desario C., Tanner P., Pardo M.C., Sanchez S., Buonavoglia C. & Saliki  
13 J.T. 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagn.*  
14 *Invest.* 19:535-539.
- 15
- 16 Hu R.L., Huang G., Qiu W., Zhong Z.H., Xia X.Z. & Yin Z. 2001. Detection and  
17 differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commun.*  
18 25:77-84.
- 19
- 20 Hueffer K. & Parrish C.R. 2003. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr.*  
21 *Opin. Microbiol.* 6:392-398.
- 22
- 23 ICTV, Internacional Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/>. Acesso  
24 em maio de 2016.
- 25
- 26 Jorge R.S.P. 2008. Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN  
27 SESC Pantanal e de animais domésticos da região. Tese de Doutorado. Universidade de  
28 São Paulo. 106p.
- 29
- 30 Kapil S., Cooper E., Lame C., Murray B., Rezabek G., Johnston L., Campbell G. & Johnson  
31 B. 2007. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006  
32 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45:4044-4047.
- 33

- 1 Mann P.C., Bush M., Appel M.J.G., Beehler B.A. & Montali R.J. 1980. Canine parvovirus  
2 infection in South American canids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177:779-783.  
3
- 4 Martella V., Cavalli A., Pratelli A., Bozzo G., Camero M., Buonavoglia D., Narcisi D.,  
5 Tempesta M. & Buonavoglia C. 2004. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J.*  
6 *Clin. Microbiol.* 42:1333-1336.  
7
- 8 Mattoso C.R.S., Catenacci L.S., Beier S.L., Lopes R.S. & Takahira R.K. 2012. Hematologic,  
9 serum biochemistry and urinary values for captive Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in  
10 São Paulo state, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 32:559-566.  
11
- 12 Mech L.D., Kurtz H.J. & Goyal S. 1997. Death of a wild wolf from canine parvoviral  
13 enteritis. *J. Wildlife Dis.* 33:321-322.  
14
- 15 Mech L.D., Almberg E.S., Smith D., Goyal S. & Singer R.S. 2012. Use of real-time PCR to  
16 detect canine parvovirus in feces of free-ranging wolves. *J. Wildlife Dis.* 48:473-476.  
17
- 18 Millán J., López-Bao J.V., García E.J., Oleaga Á., Llaneza L., Palacios V., de la Torre A.,  
19 Rodríguez A., Dubovi E.J. & Esperón F. 2016. Patterns of exposure of Iberian wolves  
20 (*Canis lupus*) to canine viruses in human-dominated landscapes. *Ecohealth.* 13:123-134.  
21
- 22 Mochizuki M., Horiuchi M., Hiragi H., San Gabriel M.C., Yasuda N. & Uno T. 1996.  
23 Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline  
24 panleucopenia. *J. Clin. Microbiol.* 34:2101-2105.  
25
- 26 Moraes M.P. & Costa P.R. 2012. *Parvoviridae*. In: Flores E.F. *Virologia Veterinária*, Santa  
27 Maria, 2 ed., UFMS, 1008p.  
28
- 29 Murphy F.A., Gibbs E.P., Horzinek M.C. & Studdert M.J. 1999. *Veterinary Virology*. 3rd ed.  
30 Academic Press, New York. 629p.  
31
- 32 Nakamura M., Tohya Y., Miyazawa T., Mochizuki M., Phung H.T., Nguyen N.H., Huynh  
33 L.M., Nguyen L.T., Nguyen P.N., Nguyen P.V., Nguyen N.P. & Akashi H. 2004. A novel

- 1 antigenic variant of canine Parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149:2261-  
2 2269.
- 3
- 4 Nandi S. & Kumar M. 2010. Canine Parvovirus: current Perspective. *Indian Journal of*  
5 *Virology: An Official Organ of Indian Virological Society* 21:31-44.
- 6
- 7 Parrish C.R., Aquadro C.F. & Carmichael L.E. 1988. Canine host range and a specific epitope  
8 map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and  
9 related feline, mink and racoon parvoviruses. *Virology* 166:293-307.
- 10
- 11 Parrish C.R., Aquadro C.F., Strassheim M.L., Evermann J.F., Sgro J.Y. & Mohammed H.O.,  
12 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine  
13 parvovirus. *J. Virol.* 65:6544-6552.
- 14
- 15 Parrish C.R. & Kawaoka Y. 2005. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of  
16 new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*  
17 59:553-586.
- 18
- 19 Pedersen A.B., Jones K.E., Nunn C.L. & Altizer S. 2007. Infectious diseases and extinction  
20 risk in wild mammals. *Conservation Biology.* 21:1269-1279.
- 21
- 22 Pedroza-Roldán C., Páez-Magallan V., Charles-Niño C., Elizondo-Quiroga D., Cervantes-  
23 Mireles R.L. & López-Amezcuca M.A. 2015. Genotyping of Canine parvovirus in western  
24 México. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27:107-111.
- 25
- 26 Pereira C.R., Monesi T.A. & Menhert D.U. 2000. Molecular characterization of canine  
27 parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75:127-133.
- 28
- 29 Pereira C.A., Monezi T.A., Mehnert D.U., D'Angelo M. & Durigon E.L. 2007. Molecular  
30 characterization of canine parvovirus in Brazil by PCR. *Vet. Microbiol.* 75:127-133.
- 31
- 32 Pérez R., Francia L., Romero V., Maya L., Lopez I. & Hernandez M. 2007. First detection of  
33 canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* :124:147-152.
- 34

- 1 Pérez R., Bianchi P., Calleros L., Francia L., Hernández M., Maya L., Panzera Y., Sosa K. &  
2 Zoller S. 2012. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain  
3 in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol.* 155:214-219.  
4
- 5 Pinto L.D., Streck A.F., Gonçalves K.R., Souza C.K., Corbellini Â.O., Corbellini L.G., &  
6 Canal C.W. 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008  
7 and 2010. *Virus Res.* 165:29-33.  
8
- 9 Ronsse V., Verstegen J. & Thiry E. 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological  
10 and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology* 64:61-74.  
11
- 12 Saito T.B., Alfieri A.A., Wosiacki S.R., Negrão F.J., Morais H.S.A. & Alfieri A.F. 2006.  
13 Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in  
14 the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Science* 80:116-  
15 119.  
16
- 17 Sinkoc A.L., Brum J.G.W. & Muller G. 2009. Gastrointestinal helminths of capybara  
18 (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) in cattle breeding farm in the area of the  
19 Ecological Reserve of Taim, Rio Grande. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52:327-333.  
20
- 21 Streck A.F., Souza C.K., Gonçalves K.R., Zang L., Pinto L.D. & Canal C.W. 2009. First  
22 detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 40:465-469.  
23
- 24 Steinel A., Venter E.H., Van Vuuren M. & Truyen U. 1998. Antigenic and genetic analysis of  
25 canine parvovirus in Southern Africa. *J. Vet. Res.* 65:239-242.  
26
- 27 Steinel A., Parrish C.R., Bloom M.E. & Truyen U. 2001. Review. Parvovirus infections in  
28 wild carnivores. *J. Wildlife Dis.* 37:594-607.
- 29 Thomas N.J., Foreyt W.J., Evermann J.F., Windberg L.A. & Knowlton F.F. 1984.  
30 Seroprevalence of canine parvovirus in wild coyotes from Texas, Utah and Idaho (1972-  
31 1983). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185:1283-1287.  
32
- 33 Truyen U., Evermann J.F., Vieler E. & Parrish C.R. 1996. Evolution of canine parvovirus  
34 involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215:186-189.

1  
2 Truyen U., Steinel A., Bruckner L., Lutz H. & Mostl K. 2000. Distribution of antigen types of  
3 canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. Schweiz Arch. Tierheilkd  
4 142:115-119.

5  
6 Woodroffe R., Prager K.C., Munson L., Conrad P.A., Dubovi E.J. & Mazet J.A.K. 2012.  
7 Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered African wild dogs  
8 (*Lycaon pictus*). PLoS One 7:e.30099.

9  
10 Ybanez R.R., Vela C., Cortes E., Simarro I. & Casal J.I. 1995. Identification of types of  
11 canine parvovirus circulating in Spain. Vet. Rec. 136:174-175.

12  
13 Zarnke R.L. & Ballard W.B. 1987. Serologic survey for selected microbial pathogens of  
14 wolves in Alaska, 1975–82. J. Wildlife Dis. 23:77-85.

#### 15 16 **Legendas das figuras**

17 Fig.1. Filhote de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) durante a necropsia.

18  
19 Fig.2. Palidez de mucosa oral de filhote de Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*).

20  
21 Fig.3. Efusão abdominal serosa em filhote de Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*).

22  
23 Fig.4. Área de hemorragia em miocárdio (seta).

24  
25 Fig.5. Infiltrado de células inflamatórias mononucleares em corte histológico de pulmão.

26  
27 Fig.6. Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeo (500 nt) do gene VP2 da  
28 cepa descrita neste estudo e de cepas representativas dos três subtipos de CPV-2.

#### 29 **Legendas dos quadros**

30 Quadro 1. Índices hematológicos do filhote de *Cerdocyon thous*, Botucatu, novembro de  
31 2014.

32  
33 Quadro 2. Alinhamento das sequências de aminoácido de um fragmento de 583 pb do gene  
34 VP2 amplificado por PCR (407-440 aa). As sequências alinhadas correspondem a uma cepa

1 vacinal CPV-2 (CPV-b, M38245), uma cepa representante do CPV-2a (CPV-15, M24003),  
2 uma cepa representante do CPV-2b (CPV-39, M74849) e uma cepa representante do CPV-2c  
3 (56/00, FJ222821). A posição 426 está destacada em negrito.

4

5

### Figuras

6 Figura 1



7

8

9

10 Figura 2

11



12

13

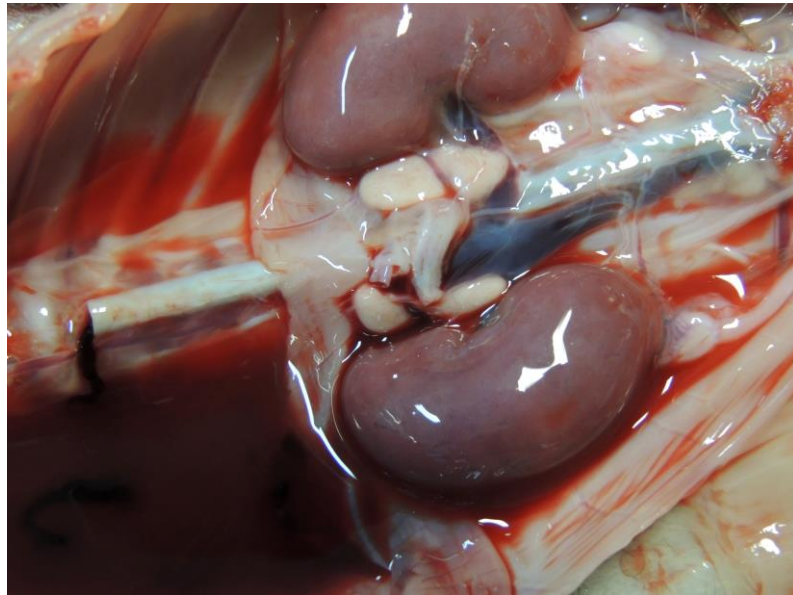
14

15

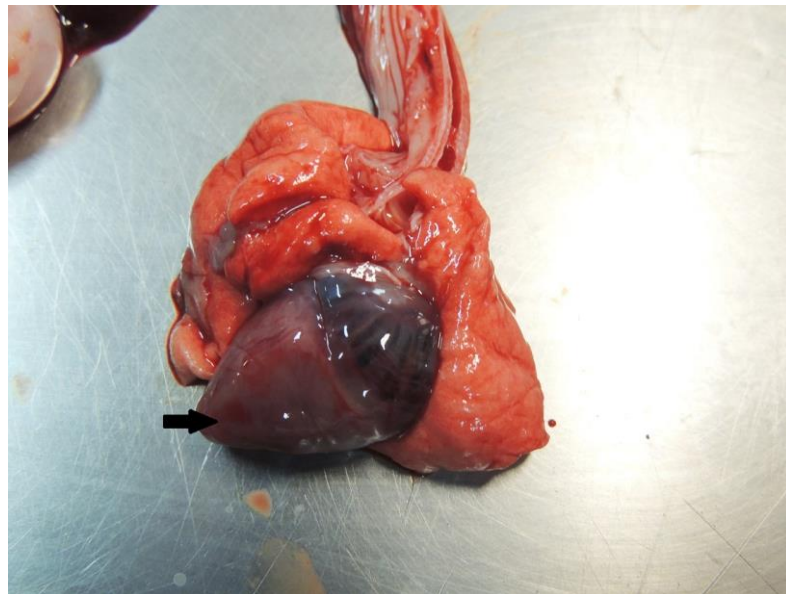
16

17

1 Figura 3  
2



3  
4  
5  
6  
7 Figura 4  
8



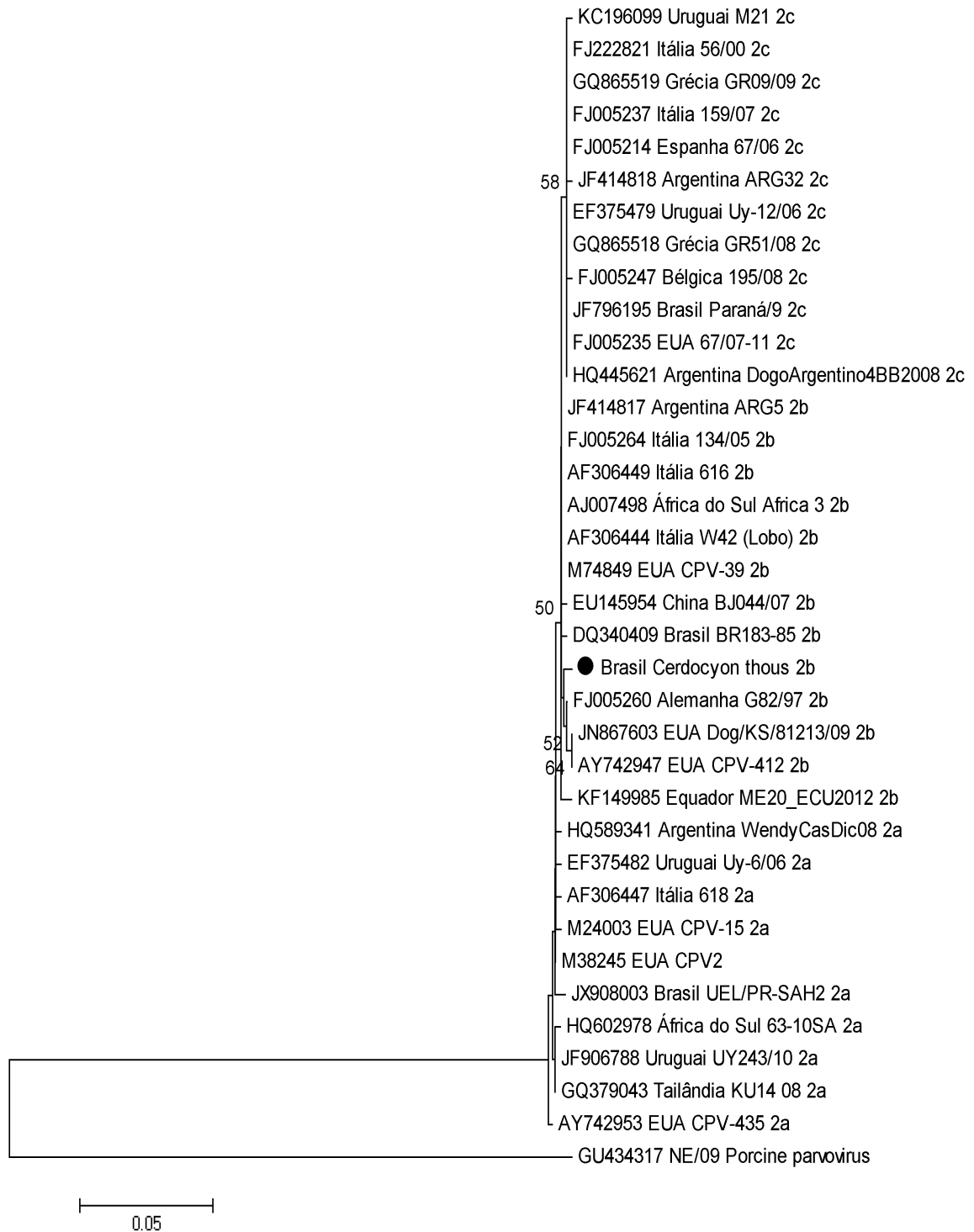
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

1 Figura 5  
2



- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35

1 Figura 6  
2



## Quadros

Quadro 1

Índices	<i>Cerdocyon thous</i> filhote	Valores de Referência
Hemácias (10 <sup>6</sup> /uL)	2,06	3,73 - 4,56
Hemoglobina (g/dL)	4,7	10,3 - 12,6
Hematócrito (%)	17	34 - 40
VCM (fL)	82,5	87,47 - 93,67
HCM (pg)	22,8	26,71 - 29,11
CHCM (%)	27,6	30,29 - 31,50
Metarrubríctos	0	0
Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> /uL)	5,3	10,3 - 16,5
Neutrófilos Bastonetes (10 <sup>3</sup> /uL)	0	0 - 0,33
Neutrófilos Segmentados(10 <sup>3</sup> /uL)	2,6	6,49 - 13,53
Linfócitos (10 <sup>3</sup> /uL)	1,9	1,47 - 2,47
Eosinófilos (10 <sup>3</sup> /uL)	0,4	0 - 0,93
Basófilos (10 <sup>3</sup> /uL)	0	0
Monócitos (10 <sup>3</sup> /uL)	0,4	0,21 - 0,66
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /uL)	0	0
Proteínas Totais (g/dL)	249,000	249 - 291
	2,0	5,9 - 8,2

Adaptado de Mattoso et al. (2012).

Quadro 2

Sequência / Aminoácido	407	426	440
CPV-2 (M38245)	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>N</b> DNVLLPTDPIGGKT		
CPV-2a (M24003)	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>N</b> DNVLLPTDPIGGKT		
CPV-2b (M74849)	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>D</b> DNVLLPTDPIGGKT		
CPV-2c (FJ222821)	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>E</b> DNVLLPTDPIGGKT		
<i>Cerdocyon thous</i>	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>D</b> DNVLLPTDPIGGKT		

**Artigo B****Identificação de parvovírus canino 2b em uma população de quatis *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) de vida livre <sup>1</sup>**

Caroline G. Spera<sup>2</sup>, Gustavo C. Marques<sup>3</sup>, Jacqueline M. Bisca<sup>3</sup>, Elis Lorenzetti<sup>2</sup>, Carlos R. Teixeira<sup>3</sup>, Amauri A. Alfieri<sup>2\*</sup> e Alice F. Alfieri<sup>2</sup>

Spera C.G., Marques G.C., Bisca J.M., Lorenzetti E., Teixeira C.R., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2016. [Identification of canine parvovirus 2b in a population of coatis *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) wildlife.] Identificação de parvovírus canino 2b em uma população de quatis *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) de vida livre. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Cx. Postal 10011, Londrina, PR 86057-970, Brasil. E-mail: alfieri@uel.br

**ABSTRACT**

CPV is the etiologic agent of Canine Parvovirus that causes enteritis and myocarditis in young dogs. The CPV type 2 (CPV-2) has emerged as a variant of Feline Panleukopenia Virus (FPV) which is adapted to the canine host by wild carnivores. Currently the CPV-2 is classified into three subtypes: CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. These subtypes cocirculate with variable frequency depending on geographic location. Rotavirus (RV) is considered an important viral agent that causes gastroenteric disorders in mammals. The coati (*Nasua nasua*) is a mammal of *Procyonidae* family, belonging to the wildlife of South America. This study was part of Births and Animal Health Survey Control Project of a population of free-living coatis inhabiting an environmental reserve where locates the Municipal Horto Florestal of Palmital, São Paulo. During the implementation of birth control project, 21 samples of coatis (both sexes, different ages and aspects of faeces) were collected in order to verify the presence of enteric viruses in coatis life free asymptomatic. The nucleic acid extracted was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (EPGA) to verify the presence of RV and polymerase chain reaction (PCR) in order to amplify a gene fragment VP2 of CPV-2. The PCR product of the CPV-2 were sequenced and subsequently the alignment of the sequences (nucleotide (nt) and amino acid (aa)), and phylogenetic tree were performed in the MEGA 5.5

1 program. The identity matrix was performed in program BioEdit. Of the 21 samples analyzed  
2 feces, eight (38%) were positive for CPV-2 in PCR. The samples positive for CPV-2 showed  
3 100% nt identity with the prototype strain of CPV-2b and CPV-39 phylogenetic tree strains  
4 described in the present study grouped with strains belonging to CPV-2b. The analysis of aa  
5 sequences revealed the presence of GAT codon (aa D - Asp) at position 426 of the VP2 viral  
6 protein (subtype 2b). This study describes that coatis asymptomatic can eliminate CPV-2 in  
7 the feces, with important links in the transmission and persistence of canine parvovirus in  
8 domestic and wild animal populations.

### 10 RESUMO

11 O parvovírus canino (CPV) é o agente etiológico da parvovirose canina que ocasiona enterite  
12 e miocardite grave em cães jovens. O CPV tipo 2 (CPV-2) emergiu como uma variante do  
13 vírus da panleucopenia felina (FPV) o qual foi adaptado ao hospedeiro canino por carnívoros  
14 selvagens. Atualmente o CPV-2 é classificado em três subtipos: CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c.  
15 Estes subtipos cocirculam em frequência variável dependendo da localidade geográfica. O  
16 rotavírus (RV) é considerado um importante agente viral que ocasiona distúrbios  
17 gastroentéricos em mamíferos. O quati (*Nasua nasua*) é um mamífero da Família  
18 *Procyonidae*, pertencente à fauna silvestre da América do Sul. Esse estudo fez parte do  
19 Projeto de Controle de Natalidade e Levantamento Zoonosológico de uma população de quatis  
20 de vida livre que habita uma reserva ambiental onde se localiza o Horto Florestal Municipal  
21 de Palmital, São Paulo. Durante a execução do projeto de controle de natalidade, 21 amostras  
22 de fezes de quatis (ambos os sexos, diferentes faixas etárias e aspectos das fezes) foram  
23 coletadas com o objetivo de verificar a presença de vírus entéricos em quatis de vida livre  
24 assintomáticos. O ácido nucleico extraído foi submetido à eletroforese em gel de  
25 poliacrilamida (EPGA) para verificar a presença de RV e à reação em cadeia da polimerase  
26 (PCR) com intuito de amplificar um fragmento do gene VP2 do CPV-2. Os produtos de PCR  
27 do CPV-2 foram sequenciados e posteriormente o alinhamento das sequências (nucleotídeo  
28 (nt) e aminoácido (aa)) e a árvore filogenética foram realizados no programa MEGA 5.05. A  
29 matriz de identidade foi realizada no programa BioEdit. Das 21 amostras de fezes analisadas,  
30 oito (38%) foram positivas para CPV-2 na técnica de PCR. As amostras positivas para CPV-2  
31 exibiram 100% de identidade de nt com a cepa protótipo do CPV-2b, CPV-39 e na árvore  
32 filogenética as cepas descritas no presente estudo agruparam com as cepas pertencentes ao  
33 CPV-2b. A análise das sequências de aa revelou a presença do códon GAT (aa D - Asp) na  
34 posição 426 da proteína viral VP2 (subtipo 2b). Este estudo descreve que quatis

1 assintomáticos podem eliminar CPV-2 nas fezes, sendo importantes elos na transmissão e na  
2 permanência da parvovirose canina em populações de animais domésticos e silvestres.

3  
4 TERMOS DE INDEXAÇÃO: CPV-2b, *Nasua nasua*, quatis, conservação.

## 6 INTRODUÇÃO

7 O quati (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766) é um mamífero da Família *Procyonidae* pertencente à  
8 fauna silvestre da América do Sul e um dos animais silvestres mais comuns da fauna  
9 brasileira (Figura 1) (Grompper & Decker 1998). Essa espécie está incluída na *Red List of*  
10 *Threatened Species* pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) como  
11 “Menos Preocupante (LC)” ao risco de extinção, não consta na lista brasileira de espécies  
12 ameaçadas e no estado de São Paulo é considerada uma espécie abundante (Chaves & Santos  
13 2009). As populações de quatis vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos em  
14 virtude da tolerância da espécie aos distúrbios antropogênicos, pois quando em regiões  
15 urbanas, buscam alimentos em lixeiras ou os recebem da população humana em parques e  
16 residências próximas a áreas habitadas por esses animais (Alves Costa & Eterovick 2007).

17 Inúmeros vírus podem determinar distúrbios gastroentéricos em animais domésticos e  
18 silvestres, dentre eles destaca-se o parvovírus canino (CPV) (Nandi & Kumar 2010, Mech et  
19 al. 2012). O CPV pertence à família *Parvoviridae*, possui aproximadamente 25 nm de  
20 diâmetro, não apresenta envelope glicoproteico e seu genoma é constituído de DNA fita  
21 simples. Com um dos menores genomas conhecidos, aproximadamente 5.2 kb, codifica  
22 quatro proteínas, duas estruturais (VP1 e VP2/VP3) e duas não estruturais (NS1 e NS2)  
23 (Moraes e Costa 2012).

24 Responsável por uma das mais graves doenças infecciosas que acometem os cães  
25 jovens em todo o mundo, o CPV pode determinar sinais clínicos caracterizados por enterite  
26 aguda acompanhada de acentuada leucopenia e miocardite em filhotes (Pedroza-Róldan et al.  
27 2015). Existem dois tipos de parvovírus, o *Canine Minute Virus* (CnMV) ou Parvovírus  
28 Canino Tipo 1 (CPV-1) descrito na década de 70 e o Parvovírus Canino Tipo 2 (CPV-2) que  
29 foi identificado pela primeira vez em 1978 como um novo agente infeccioso de canídeos  
30 (Parrish & Kawaoka 2005, Kapil et al. 2007).

31 O CPV-2 surgiu como uma variante do vírus da panleucopenia felina (FPLV) que se  
32 adaptou ao hospedeiro canino por meio de carnívoros silvestres como martas e raposas  
33 (Truyen et al. 1996, Hueffer et al. 2003). Esta adaptação ocorreu devido a substituição de dois  
34 aminoácidos na proteína VP2 do FPV, que permitiu ao vírus utilizar o receptor da transferrina

1 (TfR) presente em células intestinais de cães e desta forma, estabelecer o CPV-2 como um  
2 novo patógeno canino (Moraes e Costa 2012). O CPV-2 continuou sofrendo alterações  
3 genéticas dando origem três subtipos: CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c (Truyen 2006). As  
4 diferenças antigênicas observadas entre os subtipos está na posição 426 da sequência de  
5 aminoácidos da proteína VP2, em que o subtipo 2a encontra-se o aa Asn (N), no subtipo 2b o  
6 aa Asp (D) e no subtipo 2c o aa Glu (E) (Parrish et al. 1991).

7 No Brasil, estudos utilizando a técnica de de inibição da hemaglutinação (HI)  
8 demonstraram exposição ao CPV algumas espécies de animais silvestres como cachorro-do-  
9 mato (*Cerdocyon thous*) (Curi et al. 2010; Jorge 2008), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*)  
10 (Curi et al. 2010, Jorge 2008), raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) (Curi et al. 2010), mão-  
11 pelada (*Procyon cancrivorus*) (Jorge 2008), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Jorge 2008),  
12 onça-parda (*Puma concolor*) (Jorge 2008) e cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (Jorge  
13 2008). Na Itália, Battilani et al. (2001) determinaram pela técnica de PCR a presença do CPV-  
14 2b nas quatro amostras de fezes de lobos (*Canis lupus*). Nos EUA, Mech et al. (2012)  
15 descreveram a utilização da técnica de Real-time PCR para a detecção de CPV-2 em fezes de  
16 lobos (*Canis lupus*).

17 O contato de animais silvestres com os animais domésticos tem aumentado nos  
18 últimos anos e tem sido facilitado pela invasão do homem no habitat natural desses animais.  
19 Jones et al. 2008 descreveram que cerca de 60% das doenças infecciosas emergentes são  
20 zoonoses e destas mais de 70% são originárias de animais de vida livre com tendência a  
21 aumentar significativamente ao longo do tempo. Algumas enfermidades que possuem  
22 potencial zoonótico, como: raiva, arboviroses, tripanossomose, leishmaniose, leptospirose e  
23 algumas doenças fúngicas já foram relatadas (Guimarães et al. 2012). Informações sobre a  
24 possibilidade e a importância da participação dessa espécie animal silvestre no ciclo de  
25 transmissão de doenças infecciosas de etiologia viral aos cães e gatos ou de atuarem como  
26 reservatórios de agentes virais são escassas. O presente estudo teve como objetivo pesquisar a  
27 presença de rotavírus e parvovírus em fezes de quatis de vida livre assintomáticos.

28

29

## MATERIAL E MÉTODOS

30 Comitê de Ética

31 O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio  
32 Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A metodologia adotada no trabalho foi  
33 aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina  
34 Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

1 (nº09/2015-CEUA) e pelo SISBIO nº47767-1. Os quatis (*Nasua nasua*) avaliados nesse  
2 estudo fazem parte do projeto de Controle Populacional e Levantamento Zoonosológico  
3 desenvolvido pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP,  
4 organizado e coordenado pelo Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens  
5 (CEMPAS), autorizado pela Secretaria Estadual do Meio Ambiente em parceria com a  
6 Prefeitura de Palmital.

7

#### 8 Amostras

9 Nos meses de agosto de 2014 e março de 2015, foram capturados dentro da gaiola de  
10 alimentação utilizando um puçá, 21 quatis (Figura 1) que vivem no Horto Florestal da cidade  
11 de Palmital – SP, sendo que 10 eram machos e 11 eram fêmeas. De acordo com a faixa etária  
12 os quatis foram classificados em: adulto ( $n=11$ ), jovem ( $n=8$ ), idoso ( $n=1$ ) e filhote ( $n=1$ ). Os  
13 animais foram realocados em caixas de transporte de madeira e encaminhados ao centro  
14 cirúrgico da Prefeitura do Município de Palmital – SP.

15 Para avaliar as condições físicas, os animais foram transferidos para gaiolas de prensa,  
16 sedados, pesados e identificados com microchip (Quadro 1). Amostras de fezes foram  
17 coletadas de cada indivíduo diretamente da ampola retal com luvas de procedimento. De  
18 acordo com o aspecto as amostras de fezes foram classificadas em três categorias: normal  
19 para a espécie ( $n=13$ ), pastosa com muco ( $n=6$ ) e pastosa sem muco ( $n=2$ ). As amostras foram  
20 enviadas sob refrigeração ao laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de  
21 Londrina, onde foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Como esses  
22 animais estavam clinicamente saudáveis ao exame físico, foram encaminhados ao centro  
23 cirúrgico e submetidos aos procedimentos de vasectomia e histerectomia, sem a retirada das  
24 gônadas reprodutivas que produzem os hormônios responsáveis pela organização hierárquica  
25 e social da população.

26

#### 27 Extração do Ácido Nucleico

28 A extração do ácido nucleico foi realizada a partir de suspensões fecais (10 a 20%  
29 peso/volume) em tampão TRIS/ $\text{Ca}^{++}$  pH 7,2 (50mM Tris-HCl; 10mM NaCl; 1,5mM 2-  
30 mercaptoetanol; 3mM  $\text{CaCl}_2$ ) utilizando a associação das técnicas de fenol/clorofórmio/álcool  
31 isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina de acordo com Alfieri et al. (2006). Em todos os  
32 procedimentos de extração do ácido nucleico, Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)  
33 e PCR foram incluídas alíquotas de água ultrapura estéril como controle negativo. Como

1 controle positivo uma amostra positiva em PCR e sequenciada para o rotavírus A (RVA) e  
2 para o CPV-2 foi incluída na EGPA e na PCR, respectivamente.

### 3 4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

5 Para detectar a presença de vírus RNA fita dupla (fd) segmentado, todas as amostras  
6 de fezes foram submetidas à técnica de EGPA seguida pela impregnação com nitrato de prata  
7 (Herring et al. 1982, Pereira et al. 1983).

### 8 9 Reação em Cadeia da Polimerase

10 A PCR para CPV-2 foi realizada com *primers* que amplificam um fragmento de 583  
11 pb do gene que codifica a proteína VP2 do capsídeo viral (Hong et al. 2007). Alíquotas de 5  
12 µL dos produtos amplificados na PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%  
13 em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem  
14 constante (100V) por 40 min, coradas com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) visualizadas sob  
15 luz UV e fotodocumentadas.

### 16 17 Sequenciamento

18 Os produtos amplificados na PCR foram purificados utilizando o kit comercial  
19 *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo* (Invitrogen Life Technologies,  
20 Carlsbad, CA, USA), quantificados em *Qubit\_ Fluorometer* (Invitrogen Life Technologies,  
21 Eugene, OR, USA) e sequenciados com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*  
22 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em ambas as direções utilizando os mesmos  
23 *primers* da PCR em um sequenciador automático ABI3500 *Genetic Analyzer*. A qualidade das  
24 sequências obtidas foi avaliada no Phred e o *contig* foi obtido no CAP3  
25 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências de (nt) obtidas foram  
26 comparadas com as sequências de nt depositadas em bases públicas de dados (*GenBank*) para  
27 verificar a similaridade. O alinhamento (Clustal W) das sequências de nt e de aa foram  
28 realizados no programa MEGA 5.05. A árvore filogenética baseada nas sequências de nt foi  
29 obtida utilizando o método de *Neighbor-joining* com o modelo de *Kimura 2-parameter* com  
30 1,000 réplicas no programa MEGA 5.05. A matriz de identidade de nt foi realizada no  
31 BioEdit versão 7.1.3.0. As sequências de nucleotídeos (nt) obtidas no presente estudo foram  
32 depositadas no *GenBank* sob os seguintes números de acesso xxxxxx.

## 33 34 **RESULTADOS**

1 Um fragmento de 583 pb do gene que codifica a proteína VP2 do CPV-2 foi amplificado em 8  
2 (38%) das 21 amostras de fezes analisadas. Dos oito animais positivos, três eram adultos  
3 (duas fêmeas e um macho), quatro jovens (duas fêmeas e dois machos) e um idoso (macho)  
4 Quatro animais apresentavam fezes de aspecto normal para a espécie, três fezes pastosas com  
5 muco e um pastosa sem muco. O RNA fd segmentado característico dos rotavírus não foi  
6 detectado em nenhuma das amostras de fezes submetidas à técnica de EGPA.

7 Os fragmentos de 583 pb das oito amostras foram sequenciados e a análise das  
8 sequências de nt confirmou a presença do CPV-2 em sete amostras, uma das sequência de nt  
9 obtida não apresentou qualidade para confirmar a presença de CPV-2. As cepas identificadas  
10 como CPV-2 no presente estudo demonstraram 100% de identidade de nt com a cepa  
11 protótipo do CPV-2b (cepa CPV-39) e 99.6 a 100% de identidade de nt com outras cepas  
12 pertencentes ao CPV-2b. Na árvore filogenética as cepas de quati (*Nasua nasua*) agruparam  
13 com as cepas CPV-2b (Figura 2) e na análise dos aa as cepas apresentaram o códon GAT (aa  
14 D - Asp) na posição 426 da proteína VP2 confirmando que as cepas detectadas nos quatis  
15 pertencem ao subtipo 2b (Quadro 2).

16

17

## DISCUSSÃO

18 A proximidade dos animais silvestres com as áreas habitadas pelo homem e seus animais de  
19 estimação, geralmente cães e gatos, tem aumentado nas últimas décadas (Allison et al. 2014).  
20 Com o aumento da população humana, a demanda por áreas para a construção de novas  
21 moradias avança em direção a áreas antes preservadas, destinadas à produção de alimentos e  
22 ou animais de produção e compartilhadas por animais silvestres. Nesses locais habitam  
23 diferentes espécies de animais silvestres, que por sua vez se interessam em permanecer nesse  
24 ambiente à medida que o ser humano avança, pois a fartura de alimentos e a facilidade para  
25 consegui-los aumenta consideravelmente. Dessa forma, a convivência entre os animais  
26 domésticos e silvestres tem se tornado cada vez mais frequente.

27 Do ponto de vista epidemiológico muitos agentes infecciosos principalmente virais, de  
28 importância para o homem e animais, são mantidos na natureza pelos animais silvestres que  
29 entram em contato com os animais domésticos, e estes se tornam fontes de infecção e podem  
30 ser responsáveis pela emergência ou reemergência de patógenos e doenças infecciosas  
31 consideradas controladas (Allison et al. 2014).

32 Os quatis (*Nasua nasua*) avaliados no presente estudo estavam aparentemente  
33 saudáveis e habitavam um espaço controlado. A análise das amostras de fezes revelou a  
34 presença de 38% de quatis (*Nasua nasua*) positivos para CPV-2 em uma população mista de

1 21 animais. O CPV-2 foi identificado em ambos os sexos (macho e fêmea), em diferentes  
2 faixas etárias avaliadas (adulto, jovem e idoso) e nas três diferentes categorias avaliadas de  
3 acordo com o aspecto das fezes (normal para a espécie, pastosa com muco e pastosa sem  
4 muco) evidenciando que estes fatores não se apresentaram como decisivos no estado de  
5 portador assintomático.

6 Somente as amostras coletadas em agosto de 2014 foram positivas para CPV-2. No  
7 mês a temperatura média foi de 24,4°C, precedida pelos meses de junho e julho que  
8 registraram as temperaturas mais baixas do ano de 2014, 23,5°C e 22,2°C, respectivamente  
9 (Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP 2014). Mech et al.  
10 (2012) sugeriram que a manifestação do CPV-2 nas populações de animais silvestres é  
11 alterada dependendo da estação do ano, ou seja, em épocas mais frias a imunidade do animal  
12 diminui possibilitando a excreção viral. Os canídeos utilizam suas fezes como demarcação de  
13 território, esse fato aliado à resistência viral ambiental do CPV-2, permite sua disseminação e  
14 facilita a via de transmissão indireta em áreas de proteção ambiental (Allison et al. 2014).

15 Populações de vida livre como a desse estudo são de especial interesse para estudos  
16 epidemiológicos, pois o isolamento em relação a outras populações silvestres, pode resultar  
17 em aumento da consanguinidade provocando a diminuição da resistência imunológica, o que  
18 predispõe a instalação de agentes patogênicos (Jorge 2008).

19 O CPV-2b identificado nos quatis avaliados, é considerado o subtipo mais frequente  
20 detectado na população mundial de cães domésticos nos últimos anos (Miranda et al. 2014).  
21 Porém alguns estudos conduzidos em países como Argentina (Calderón et al. 2011) e México  
22 (Pedroza-Róldan et al. 2015), demonstraram que a cepa mais frequente em cães é tipo CPV-  
23 2c. Considerando que esses animais apresentavam fezes de aspecto normal ou pastoso e sem  
24 sinal clínicos de doença gastroentérica no momento da coleta, podemos considerá-los como  
25 portadores assintomáticos e possíveis transmissores do CPV para outros animais da mesma  
26 espécie ou espécies diferentes, sendo que a condição de portador assintomático é comum  
27 entre cães domésticos (Miranda et al. 2014).

28 O contato próximo dos quatis (*Nasua nasua*) com cães ou fezes de animais  
29 sintomáticos ou assintomáticos que vivem no entorno do parque, pode ter sido responsável  
30 pela contaminação dos quatis. O CPV-2 não apresenta envelope glicoproteico, esse fato  
31 associado ao pequeno tamanho da partícula viral o torna um dos vírus mais resistentes no  
32 meio ambiente. Essas características associadas a presença de grande quantidade de vírus nas  
33 fezes ( $10^{12}$  partícula por grama de fezes) contribuem para a transmissão horizontal do vírus

1 onde não é necessário o contato direto do animal doente ou assintomático com o animal  
2 suscetível (Moraes e Costa 2012).

3 As amostras deste estudo são provenientes de quatis aparentemente hígidos, e  
4 portanto, aptos à realização de procedimento cirúrgico de esterilização, junto ao projeto de  
5 Controle Populacional e Levantamento Zoosanitário. A captura e o transporte a que foram  
6 submetidos os animais, são situações estressantes que podem contribuir com a excreção viral  
7 para o meio ambiente. Outro fator que deve ser analisado em estudos futuros é o tempo de  
8 excreção do vírus. Em cães, a excreção do vírus inicia-se no terceiro ou quarto dia após a  
9 infecção e pode permanecer por até 20 dias. Em quatis essa informação ainda permanece  
10 desconhecida, mas como o estado de portador assintomático foi verificado em animais jovens,  
11 adultos e em um animal idoso, é possível que a excreção do CPV-2 nas fezes nessa espécie  
12 ocorra por um período similar.

13 Perderson et al. (2007) relataram que as doenças virais representam 56% dos  
14 patógenos que ameaçam as populações de carnívoros selvagens. Os quatis (*Nasua nasua*)  
15 avaliados vivem em uma área de reserva ambiental, onde se localiza o Horto Florestal  
16 Municipal, e muitas vezes são alimentados pela população que vive próxima ao local. A  
17 conduta dos humanos de alimentar espécies de animais silvestres é comum em parques e  
18 reservas, o que também pode facilitar a transmissão do vírus pelas roupas e calçados, se estes  
19 estiverem contaminados. O principal objetivo do projeto Controle Populacional e  
20 Levantamento Zoo-sanitário com a captura programada dos quatis (*Nasua nasua*) foi  
21 controlar a população desses animais e que devido à oferta de alimento, abrigo e água limpa  
22 em abundância, cresceu descontroladamente nos anos de 2013 e 2014. Na proximidade da  
23 área em que os quatis (*Nasua nasua*) transitam diariamente transitam cães e gatos domésticos.  
24 A identificação de animais portadores assintomáticos deixou evidente a circulação do CPV  
25 nessa espécie silvestre que não é vacinada e pode atuar como reservatório do vírus para cães e  
26 gatos domésticos além de outros canídeos suscetíveis, perpetuando a doença principalmente  
27 em cães e gatos não vacinados, fechando desta forma o ciclo de transmissão da parvovirose.

28

29

### CONCLUSÃO

30 Esse é o primeiro estudo que descreve a presença de CPV-2b em uma população de quatis de  
31 vida livre. Os animais assintomáticos podem promover a manutenção do vírus tanto nas  
32 populações domésticas quanto nas populações silvestres.

33

1 **Agradecimentos.-** Este trabalho foi financiado com recursos obtidos junto às agências de  
2 fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FINEP e Fundação Araucária (FAP/PR). Alfieri A.A. e  
3 Alfieri A.F. são bolsistas de produtividade em pesquisa do CNPq.

## 6 REFERÊNCIAS

7 Alfieri A.A., Parazzi M.E., Takiuchi E., Médici K.C. & Alfieri, A.F. 2006. Frequency of  
8 group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. Trop. Anim.  
9 Health Prod., v. 38, p. 521-526.

10  
11 Allison A.B., Kohler D.J., Ortega A., Hoover E.A., Grove D.M., Holmes E.C., Parrish C.R.  
12 2014. Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to  
13 different carnivore species. PLoS Pathog 10:1004475.

14  
15 Alves Costa, C.P. & Eterovick, P.C. 2007. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua*,  
16 Procyonidae) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. Acta  
17 Oecologica, 32, 77-92.

18  
19 Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP/ Seção Técnica de  
20 Serviços Meteorológicos – Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da  
21 Universidade de São Paulo – v 17, 2014 – São Paulo: IAG/USP, 2014.

22  
23 Battilani M., Scagliarini A., Tisato E., Turilli C., Jacoboni I., Casadio R. & Prospero S. 2001.  
24 Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. J Gen Virol  
25 82:1555–1560.

26  
27 Calderón M.G., Romanuttia C., D'Antuono A., Kellerb L., Mattiona N. & La Torre J. 2011.  
28 Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has  
29 become the predominant variant affecting the domestic dog population. Virus Res. 157:106-  
30 110.

31  
32 Chaves B.R.N. & Santos F.R. 2009. Diversidade genética e implicações para o manejo de  
33 quatis (Procyonidae: *Nasua nasua*). In: Seminário de Avaliação de Andamento de  
34 Dissertações e Teses, Belo Horizonte, MG.

- 1  
2 Curi N.H.A., Araújo A. S., Campos F. S., Lobato Z. I. P., Gennari S. M., Marvulo M. F. V.,  
3 Silva J. C. R. & Talamoni S. A. 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in  
4 Southeast Brazil: Disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation* 19:  
5 3513–3524.
- 6 Grompper M.E. & Decker D.M. 1998. Mammalian species: *Nasua nasua*. American Society  
7 of Mammalogists, v. 58, p. 1-9.
- 8
- 9 Herring A.J., Inglis N.F., Ojeh C.K., Snodgrass D.R. & Menzies J. 1982. Rapid diagnosis of  
10 rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide  
11 gels. *J Clin. Microbiol.* 16:473-477.
- 12
- 13 Hueffer K. & Parrish C.R. 2003. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr.*  
14 *Opin. Microbiol.* 6, 392-398.
- 15
- 16 Jones K. E., Patel N. G., Levy M. A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J. L. & Daszak P.  
17 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, v. 451, n. 7181, p. 990-993.
- 18
- 19 Jorge, R.S.P. 2008. Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN  
20 SESC Pantanal e de animais domésticos da região. Tese de Doutorado. Universidade de São  
21 Paulo. 106p.
- 22
- 23 Kapil S., Cooper E., Lame C., Murray B., Rezabek G., Johnston L., Campbell G. & Johnson  
24 B. 2007. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and  
25 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4044-4047.
- 26
- 27 Mann P.C., Bush M., Appel M.J.G., Beehler B.A. & Montali R.J. 1980. Canine parvovirus  
28 infection in South American canids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177:779-783.
- 29
- 30 Mech L.D., Almberg E.S., Smith D., Goyal S. & Singer R.S. 2012. Use of real-time PCR to  
31 detect canine parvovirus in feces of free-ranging wolves. *J. Wildlife Dis.* 48:473-6.

- 1 Miranda C., Parrish C. R., & Thompson G. 2014. Canine parvovirus 2c infection in a cat with  
2 severe clinical disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.26. p.462-464.
- 3
- 4 Moraes M.P., Costa P.R. 2012. *Parvoviridae*. In: Flores E.F. *Virologia Veterinária*, Santa  
5 Maria, 2 ed. da UFMS, 1008p.
- 6
- 7 Nandi S. & Kumar M. 2010. Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian J. Virol.* 21:31-  
8 44.
- 9
- 10 Parrish C.R., Aquadro C.F., Strassheim M.L., Evermann J.F., Sgro J.Y. & Mohammed H.O.  
11 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J.*  
12 *Virol.* 65:6544-6552.
- 13
- 14 Parrish C.R. & Kawaoka Y. 2005. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of  
15 new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:553-  
16 586.
- 17
- 18 Pedersen A.B., Jones K.E., Nunn C.L. & Altizer S. 2007. Infectious diseases and extinction  
19 risk in wild mammals. *Conservation Biology* 21:1269-1279.
- 20
- 21 Pedroza-Roldán C., Páez-Magallan V., Charles-Niño C., Elizondo-Quiroga D., Cervantes-  
22 Mireles R.L. & López Amezcua M.A. 2015. Genotyping of Canine parvovirus in western  
23 México. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27:107-111.
- 24
- 25 Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P.G., Candeias J.A.N., Rácz M.L., Linhares A.C., Gabbay  
26 Y.B. & Trabulsi J.R. 1983. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from  
27 Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg.* 90:117-125.
- 28
- 29 Truyen U., Evermann J.F., Vieler E. & Parrish C.R. 1996. Evolution of canine parvovirus  
30 involved loss and gain of feline host range. *Virology*, 215, 186-189.
- 31
- 32 Truyen U., 2006. Evolution of canine parvovirus—a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.*  
33 117, 9-13.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### Legendas das figuras

Fig. 1. Representantes da espécie *Nasua nasua* pertencentes ao Horto Florestal de Palmital – SP, 2013. **Fonte:** arquivo pessoal.

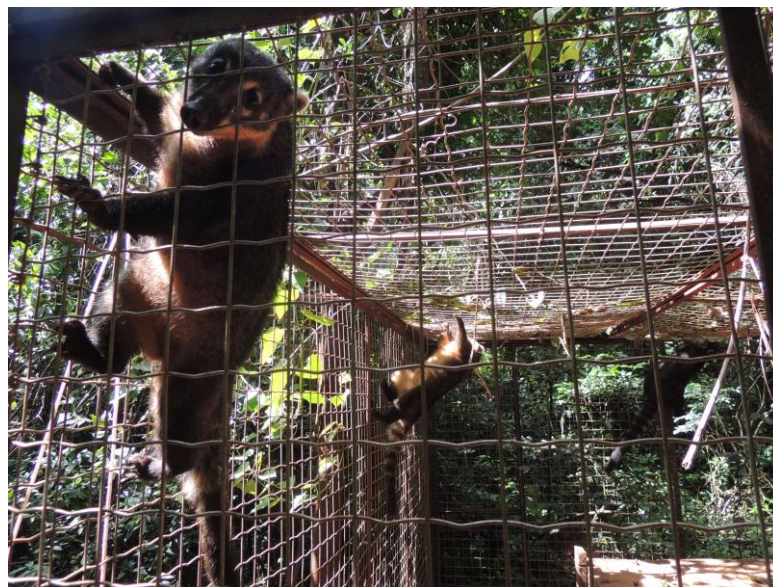
Fig. 2. Árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeo (500 nt) do gene VP2 das cepas descritas neste estudo e de cepas representativas dos três subtipos de CPV-2. As cepas de CPV-2b do presente estudo estão destacadas com um círculo preto.

### Legendas dos quadros

Quadro 1. Informações sobre os animais avaliados e resultados para CPV-2 na PCR.  
(\* ) amostras positivas.

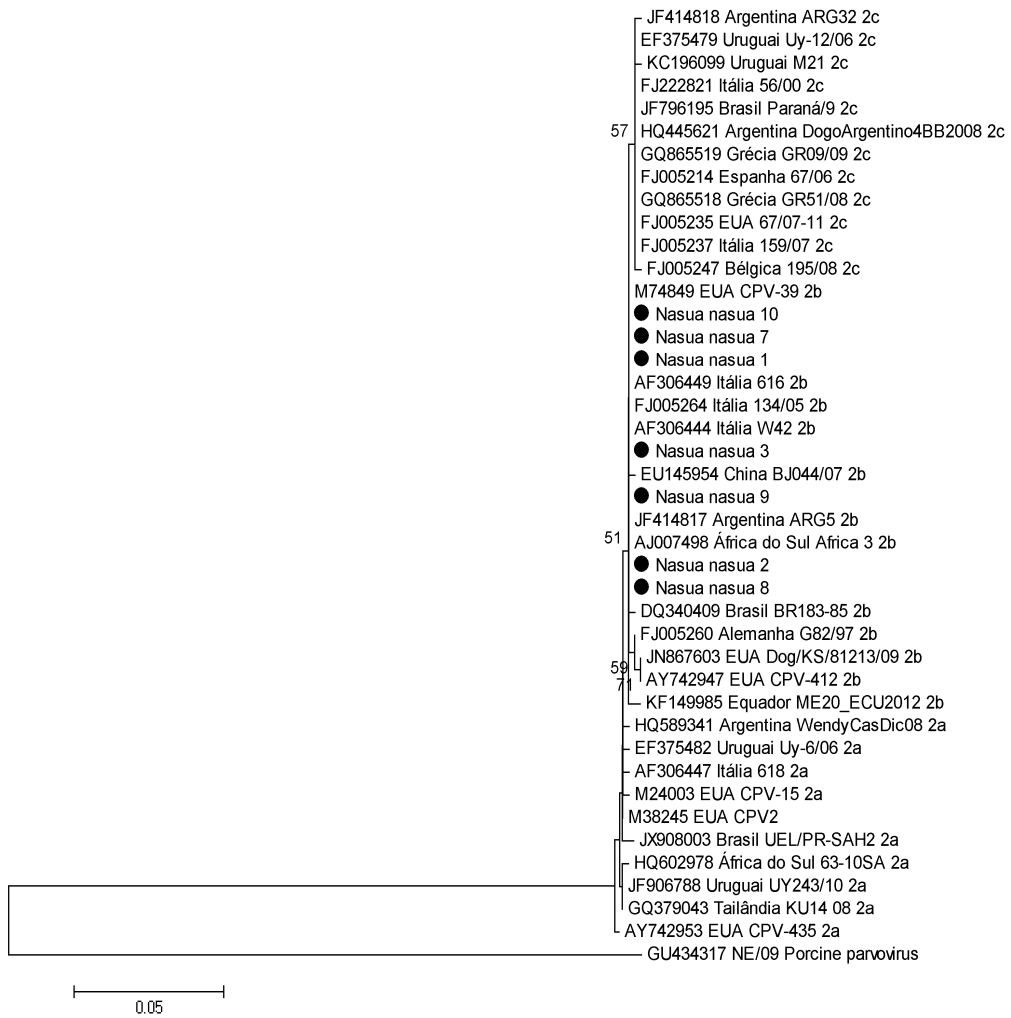
Quadro 2. Alinhamento das sequências de aminoácido de um fragmento do gene VP2 amplificado por PCR (407-440 aa). As sequências alinhadas correspondem a uma cepa vacinal CPV2 (CPV-b, M38245), uma cepa representante do CPV-2a (CPV-15, M24003), uma cepa representante do CPV-2b (CPV-39, M74849) e uma cepa representante do CPV-2c (56/00, FJ222821). A posição 426 está destacada em negrito.

Figura 1



20  
21

Figura 2



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14

## 1 Quadro 1

Número do microchip	Data da coleta	Resultado para CPV2 na PCR	Sexo	Faixa etária estimada	Peso em Kg	Aspectos visuais das fezes
963008000392416	16/08/2014	Negativo	F	Adulto	3,90	Normais para a espécie
963008000392423	16/08/2014	Negativo	F	Jovem	3,00	Normais para a espécie
963008000392424	16/08/2014	Negativo	M	Jovem	3,10	Normais para a espécie
963008000392425	16/08/2014	Negativo	M	Jovem	3,00	Normais para a espécie
963008000392426	16/08/2014	Negativo	F	Jovem	3,90	Pastosas com muco
963008000392428	20/03/2015	Negativo	F	Adulto	4,20	Normais para a espécie
963008000392430	16/08/2014	Negativo	F	Adulto	3,70	Pastosas com muco
963008000392435	20/03/2015	Negativo	F	Adulto	3,90	Normais para a espécie
963008000392436	20/03/2015	Negativo	M	Adulto	6,20	Normais para a espécie
963008000392437	20/03/2015	Negativo	M	Filhote	1,80	Pastosas com muco
963008000392439	20/03/2015	Negativo	F	Adulto	4,90	Normais para a espécie
963008000392501	02/08/2014	Positivo*	F	Adulto	5,00	Normais para a espécie
963008000392502	02/08/2014	Positivo*	F	Jovem	2,30	Pastosas com muco
963008000392503	02/08/2014	Positivo*	M	Idoso	7,20	Normais para a espécie
963008000392504	02/08/2014	Positivo*	M	Jovem	2,60	Normais para a espécie
963008000392505	02/08/2014	Positivo*	F	Jovem	5,10	Pastosas com muco
963008000392506	02/08/2014	Negativo	M	Adulto	5,30	Pastosas sem muco
963008000392507	02/08/2014	Negativo	M	Adulto	5,40	Normais para a espécie
963008000392508	02/08/2014	Positivo*	F	Adulto	3,90	Pastosas com muco
963008000392509	16/08/2014	Positivo*	M	Jovem	2,20	Normais para a espécie
963008000392510	16/08/2014	Positivo*	M	Adulto	5,10	Pastosas sem muco

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

## 1 Quadro 2

<b>Sequência/aminoácido</b>	<b>407</b>	<b>426</b>	<b>440</b>
CPV2 (M38245)	GRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKT		
CPV-2a (M24003)	GRYPEGDWIQNINFNLPVTNDNVLLPTDPIGGKT		
CPV-2b (M74849)	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
CPV-2c (FJ222821)	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>ED</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 1	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 2	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 3	PEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 7	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 8	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 9	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		
<i>Nasua nasua</i> 10	GRYPEGDWIQNINFNLPVT <b>DD</b> NDNVLLPTDPIGGKT		

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

#### 4. CONCLUSÕES

---

1

2 • Esta é a primeira descrição do CPV-2b em um cachorro-do-mato no Brasil;

3 • Canídeos silvestres podem desenvolver a parvovirose e assim como nos canídeos  
4 domésticos, essa enfermidade é preocupante principalmente para filhotes podendo levar esses  
5 animais a óbito;

6 • Esse é o primeiro estudo que descreve a presença de CPV-2b em uma população de quatis  
7 de vida livre assintomáticos;

8 • Os quatis assintomáticos podem promover a manutenção do CPV-2 em populações de  
9 animais domésticos ou silvestres atuando como reservatório do vírus.

10

11

12

13

14

15

16