



PARVOVIROSE CANINA: PERFIL HEMATOLÓGICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Modalidade: () Ensino (X) Pesquisa () Extensão

Nível: () Médio (X) Superior () Pós-graduação

Área: () Química () Informática (X) Ciências Agrárias () Educação () Multidisciplinar

Ana Paula da Veiga ARGUS¹, Jamile Jeannie CAOVI², Kyola Sthefanie CAMARGO², Hiago de Oliveira CARLOS², Andressa Fernanda KUNZ³, Elisabete TAKIUCHI³, André Luis Fachini de SOUZA⁴, Marlise Pompeo CLAUS⁴.

¹Discente do curso de Medicina Veterinária do IFC campus Araquari, ²Médica Veterinária ³Discente do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – PPPGCA/UFPR Setor Palotina, ⁴Docente do Curso de Medicina Veterinária da UFPR,

Introdução

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é o agente etiológico da parvovirose, pertence a família *Parvoviridae*, gênero *Parvovirus* (ICTV, 2015). É responsável por uma doença infecto-contagiosa com mortalidade considerável de cães até os dois anos de idade. Desde o seu surgimento, já foram identificadas três variantes denominados CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. Estudos que vinham sendo conduzidos no Brasil indicavam uma maior prevalência do CPV-2b, entretanto, atualmente o CPV-2c vem assumindo um importante papel na epidemiologia das infecções por parvovírus canino, principalmente em animais adultos e com histórico de vacinação (Martela *et al.*, 2004; Decaro *et al.*, 2007; Streck *et al.*, 2009).

Este trabalho teve como objetivo, detectar o CPV-2 em fezes de animais suspeitos de parvovirose através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e analisar o perfil hematológico desses animais no curso clínico da doença.

Material e Métodos

As amostras biológicas de fezes foram coletadas em clínicas veterinárias particulares localizadas no estado de Santa Catarina e armazenadas a 4°C até o seu processamento. A coleta de fezes se deu por defecação espontânea. A amostra de sangue total foi obtida por venopunção da veia jugular ou cefálica e acondicionada em tubo de ensaio com anticoagulante. As amostras processadas em Joinville foram realizadas através do equipamento automatizado ABX-60 e também pela observação microscópica do esfregaço em lâmina. Em Jaraguá do Sul, as amostras foram analisadas pelo o equipamento da IDEXX ProCyt Dx.

Para a extração de ácido nucleico foi realizada a associação das técnicas fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e da sílica/isotiocianato de guanidina (Sambrook *et al.*, 1989; Boom *et al.*, 1990), com modificações descritas por Alfieri *et al.*, (2006). Para a PCR foi utilizado o par de *primers* 555for: 5' CAGGAAGATATCCAGAAGGA 3' e 555rev:

5´ GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA 3´ (Buonavoglia *et al.*, 2001) para a amplificação de segmento de 583 pb do gene VP2 (nt 4003 a 4585). A amplificação foi realizada em termociclador e a análise dos fragmentos de DNA amplificado foi efetuada após eletroforese em gel de agarose 2% contendo solução de brometo de etídio e visualização sob luz UV.

Resultados e discussão

Foram avaliadas um total de 5 amostras pareadas de fezes e sangue total. A análise dos exames hematológicos evidenciou leucopenia em 2 pacientes, neutropenia em 3 e linfopenia em um. Durante a fase de recuperação é possível observar leucocitose, como observado em 1 amostra. Dois pacientes apresentaram anemia, provavelmente decorrente da perda sanguínea intestinal (Flores, 2012).

A anemia normocítica/normocrômica evidencia uma anemia arregenerativa, que pode ser decorrente de hemorragia e hemólise aguda sem tempo para a resposta, associada à deficiência de ferro. Nota-se trombocitopenia em cerca de 50% dos pacientes com deficiência de ferro. Os animais com anemia não regenerativa simultaneamente a neutropenia e trombocitopenia apresentam lesão da célula tronco reversível ou irreversível (Thrall *et al.*, 2014). Em uma amostra foi evidenciado anemia associada à trombocitopenia.

A partir do material genético extraído das fezes foi possível a amplificação de um produto de 583 pb na PCR. As amostras foram provenientes de animais exibindo sinais clínicos relacionados a gastroenterite com diferentes idades, raças, esquema de vacinação e presença de contactantes, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação das amostras em relação a raça, idade, contactantes, vacinação e resultado da PCR.

Município	Amostra	Raça	Idade	Contactantes	Vacinação	PCR
Jaraguá do Sul	1	SRD	11 meses	Não	Completa	Positiva
Jaraguá do Sul	2	SRD	4 meses	Sim	Incompleta	Positiva
Jaraguá do Sul	3	Pequinês	1 ano e 2 meses	Sim	Completa(Não ética)	Positiva
Joinville	4	Poodle	13 anos e 4 meses	Não informado	Incompleta	Positiva
Joinville	5	SRD	2 meses	Não informado	Não realizada	Positiva

A carga viral eliminada nas fezes varia ao longo da enfermidade. O período em que ocorre maior eliminação é entre 4 a 14 dias após a infecção. A eliminação propriamente dita



do vírus se inicia aproximadamente em 4 dias após a infecção e tem sua maior eliminação quando o animal começa a manifestar os sinais clínicos característicos da parvovirose (Mason, 1999; Schultz *et al.*, 2008). É de suma importância, fazer a coleta de fezes para o diagnóstico laboratorial no momento em que o animal estiver apresentando os sinais clínicos, pois a chance de estar eliminando o vírus é maior. Além disso, não se pode descartar a possibilidade da presença de outros agentes virais responsáveis pelo complexo gastroenterite hemorrágica.

A utilização de kits de diagnóstico rápido utilizado na rotina clínica, como o *snap test*, detecta as seguintes cepas: CPV-1, CPV-2, CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. A técnica molecular utilizada nesse estudo, embora de alta sensibilidade e especificidade, assim como o *snap test*, não permite identificar qual a variante do CPV-2 está sendo identificada. Para tanto, será realizado o sequenciamento genético dos fragmentos amplificados na PCR desse estudo. É importante ressaltar a detecção da variante CPV-2c relacionada a quadros de gastroenterite hemorrágica em cães jovens vacinados ou não e também em animais com idade superior a dois anos que apresentam esquema de vacinação completo (Decaro *et al.*, 2006, 2008; Rolim *et al.*, 2014).

Têm sido sugerido que a vacina baseada no tipo-2 é eficaz contra as variantes que estão atualmente em circulação no campo (Wilson *et al.*, 2014). Entretanto, recentes estudos epidemiológicos e moleculares envolvendo a presença do CPV-2c em amostras biológicas provenientes de animais vacinados, levanta o questionamento da eficácia das vacinas atualmente utilizadas para a proteção do desafio de campo (Calderon *et al.*, 2009; Streck *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2012). O CPV-2c foi detectado em amostras de fezes provenientes de cães que apresentaram sinais clínicos de diarreia, indicando que esse vírus está circulando na população canina do Brasil, sendo o principal tipo de CPV que circulou no Brasil entre os anos 2008 a 2010 (Streck *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2012).

Devido a esse novo perfil epidemiológico observado nas infecções pelo CPV-2, em especial com o envolvimento da variante CPV-2c, é fundamental que estudos que identifiquem a presença desse vírus continuem a serem desenvolvidos e divulgados.

Conclusão



Este trabalho demonstrou a ocorrência de parvovirose canina, tanto em animais jovens como em animais adultos, sem ou com esquemas de vacinações completos. Estudos recentes apontam a importância epidemiológica dessa variante nesses casos. Dessa maneira, os resultados indicam a possibilidade da variante CPV-2c estar envolvida e estudos envolvendo o sequenciamento genético estão sendo encaminhados.

Referências

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, v.38, p.521-526, 2006.

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

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; NOORDAA-VAN DER, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.495-503, 1990.

CALDERON, M. G.; MATTION, N.; BUCAFUSCO, D.; FOGEL, F.; REMORINI, P.; TORRE, J. L. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs, v.159, p. 141-145, 2009.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; BELLACICCO, A. L.; CAMERO, M.; MANNA, L.; D.; ALOJA, D.; BUONAVOGLIA, C. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.53, p.468-472, 2006.

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

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

FLORES, E. F. 2012. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 1007p.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2015 Release. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 01 de abril de 2016.

MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; PRATELLI, A.; BOZZO, G.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, D.; NARCISI, D.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A canine



parvovirus mutante is spreading in Italy. Journal of Clinical Microbiology, v.42, p.1333-1336, 2004.

MASON, G. D. Good business, good medicine: Use diagnostics to help confirm parvo. DVM. March 1, 1999.

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

ROLIM, V. M.; SONNE, L.; CASAGRANDE R. A.; SOUZA S.O.; PINTO L. D.; WOUTERS A. T. B.; WOUTERS, F.; CANAL, C. W.; DRIEMEIER, D. Enterites caused by type 2c canine parvovirus in a 5-year-old dog. Acta Scientiae Veterinarie, v.42, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. In: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed.: 1989, New York, Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989.

SCHULTZ, R. D.; LARSON, L. J.; LORENTZEN, L. P. Effects of modified live canine parvovirus vaccine on the SNAP ELISA antigen assay. Paper presented at: International Veterinary Emergency Critical Symposium; September 18–21, Phoenix, Arizona, USA, 2008.

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

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. 2014. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo:Roca, 582p.

WILSON, S.; ILLAMBAS, J.; SIEDEK, E.; STIRING, C.; THOMAS, A.; PLEOVÁ, E.; STURE, G.; SALT, J. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2c) induces neutralising antibody responses to CPV-2^a and CPV-2c. Vaccine, v.32, p.5420-5424, 2014.