

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO E
CORONAVÍRUS CANINO**

Luciane Dubina Pinto

Porto Alegre
2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO E
CORONAVÍRUS CANINO**

Luciane Dubina Pinto

**Tese apresentada como
requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio
Wageck Canal**

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Pinto, Luciane Dubina
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO E
CORONAVÍRUS CANINO / Luciane Dubina Pinto. -- 2013.
73 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. parvovirus canino. 2. coronavirus canino
pantrópico. 3. detecção. 4. caracterização. 5.
filogenia. I. Canal, Cláudio Wageck, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luciane Dubina Pinto

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARVOVÍRUS CANINO E
CORONAVÍRUS CANINO

Aprovada em 04 de março de 2013

APROVADA POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Ana Cláudia Franco
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Profa. Dra. Ana Paula Ravazollo
Membro da Comissão (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço Àquele que nos deu a oportunidade de estarmos aqui, neste mundo, para reparar o que fizemos de mal no passado e renovar as atitudes para um futuro de luz, resignação e esperança.

Ao Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal pela oportunidade, paciência e importante orientação na elaboração desse trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao querido amigo André Felipe Streck pela confiança, amizade e ensinamentos.

Aos queridos amigos de caminhada nesses anos de estudo: Ângela Corbellini, Carine Kunzler Souza, Matheus Weber, Renata Budaszewiski, Karla Gonçalves, Daniele Gava, Helena Mata, Jéssica Antunes, Priscilla Dupont, Ana Cristina Mosená, Christian Travassos, Tuane Rosa, Oscar Granados.

A Dona Orema pela amizade e preciosa ajuda na preparação dos materiais para os experimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Virologia-FAVET-UFRGS.

Ao LABMAS - VPS - FMVZ – USP pela parceria através do Prof. Dr. Paulo Brandão e da querida amiga Iracema Barros.

Ao Setor de Patologia Veterinária FAVET-UFRGS pelas amostras cedidas e parceria nos trabalhos.

A Dra. Sandra Marques pelo incentivo e amizade nesses anos de superação.

Aos queridos amigos e familiares pelo carinho, apoio e confiança nesses anos de estudo.

Aos meus pais pelo incentivo e apoio imprescindíveis.

Ao Marcelo Gomes Bicca pela amizade, carinho e compreensão.

RESUMO

O parvovírus canino (CPV-2) e o coronavírus canino (CCoV-II) são considerados os principais patógenos responsáveis pela gastroenterite viral aguda em cães filhotes, causando, em alguns casos a alta morbidade e mortalidade, sobretudo em função da capacidade de potencializar infecções por outros agentes. Esses vírus estão distribuídos mundialmente na população canina, sendo responsáveis por diversos surtos em muitos países, sobretudo onde ocorre grande concentração de animais, como em abrigos e canis. O CPV-2 e o CCoV-II foram identificados a partir da década de 1970 e desde então, têm sido detectados em animais clinicamente saudáveis, assim como em cães que apresentam vômitos e diarreia severa. A presente tese tem como objetivo a identificação desses agentes na população canina do Brasil, sendo constituída de dois capítulos distintos: Capítulo 1- Caracterização de cepas de parvovírus canino circulantes no Brasil entre 2008 e 2010 e o Capítulo 2 - Caracterização do coronavírus canino pantrópico no Brasil. No Capítulo 1, foram analisadas amostras de fezes de 144 cães pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para CPV-2, 29,2% (42/144) das amostras foram positivas. Das 42 amostras positivas, 71,4% (30) dos cães tinham sinais de gastroenterite hemorrágica. O sequenciamento de 583 pb do gene VP2 das amostras positivas, identificaram 78,6% (33/42) como CPV-2c, 19% (8/42) como CPV-2b e 2,4% (1/42) como tipo de 2a. A análise filogenética dos CPV-2 encontrados nas amostras brasileiras mostrou que elas são muito semelhantes às de outros países e o CPV-2c tornou-se predominante no Brasil. No Capítulo 2, foram analisadas amostras de órgãos de cinco cães jovens pela transcrição reversa (RT-PCR) para os genes M e S de CCoV-II, sendo que três cães foram positivos para CCoV-II e CPV-2, um foi positivo apenas para CCoV-II e um para o CPV-2 e o outro foi negativo para todos os agentes pesquisados. O sequenciamento dos produtos de amplificação identificou que eles eram CPV-2c e CCoV-IIa. A análise filogenética dos CCoV-IIa circulantes na população canina da região Sul do Brasil mostrou que são semelhantes aos encontrados em outros países. No entanto, os espécimes brasileiros tendem a agrupar-se em um único clado, sugerindo um ancestral comum. Os sinais clínicos e lesões causados pela nova variante de CPV-2 e do subtipo pantrópico CCoV-II foram muito semelhantes entre si, sendo de grande importância a inclusão do diagnóstico diferencial entre esses dois agente virais. Esta foi a primeira caracterização do subtipo CCoV-IIa em cães no Brasil. A detecção e caracterização do CPV-2 e do CCoV-II, que estão circulando atualmente, são essenciais para o entendimento da evolução viral e para o desenvolvimento de medidas de controle e prevenção.

Palavras-chaves: parvovírus canino, CPV-2c, detecção, caracterização, filogenia, coronavírus pantrópico, CCoV-IIa.

ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV-2) and canine coronavirus (CCoV-II) are considered the major pathogens causing acute viral gastroenteritis in puppies, in some cases with high morbidity and mortality, especially in terms of ability to potentiate infections by other agents. These viruses are distributed worldwide being responsible for outbreaks in many countries, especially where there is high concentration of animals, such as shelters and kennels. The CPV-2 and CCoV-II were identified from the late 1970 and since then have been detected in clinically healthy animals, as well as in dogs with vomiting and severe diarrhea. This work aims the identification of these agents in the canine population of Brazil, comprised by two distinct chapters: Chapter 1- Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010, and Chapter 2- Characterization of pantropic canine coronavirus in Brazil. In chapter 1, stool samples of 144 dogs were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) for CPV-2, 29,2% (42/144) of them were positive. Of the 42 positive samples, 7,4% (30) of the dogs had signs of hemorrhagic gastroenteritis. The sequencing of 583 bp VP2 gene of the positive samples identified 78,6% (33/42) as CPV-2c, 19% (8/42) as CPV-2b and 2,4% (1/42) as type 2a. Phylogenetic analysis of CPV-2 found in the canine population of Brazil, has shown that they are very similar to those of other countries and CPV-2c has become prevalent in Brazil. In Chapter 2 organ samples of five puppies were analyzed by reverse transcription (RT-PCR) for CCoV-II M and S genes, of wich three dogs were positive to CCoV-II and CPV-2, one was positive only to CCoV-II and one for CPV-2 and the other was negative for all the agents searched. The sequencing of the amplification products identified that they were CPV-2c and CCoV-IIa. Phylogenetic analysis of circulating CCoV-IIa in canine population in southern Brazil showed that they are similar to those found in other countries. However, the Brazilian specimens tend to group together in a single clade, suggesting a common ancestor. Clinical signs and injuries caused by the new CPV-2 variant and of pantropic subtype of CCoV-II are very similar to each other, being of great importance for the diagnosis including the differential diagnosis of these two viral agents. This was the first characterization of subtype CCoV-IIa in dogs in Brazil. The detection and characterization of CPV-2 and CCoV-II, that are currently circulating, are essential to understanding the viral evolution and to the development of more effective control and prevention measures

Keywords: canine parvovirus, CPV-2c, detection, characterization, phylogeny, pantropic coronavirus, CCoV-IIa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Crio-eletromicroscopia com indicações das estruturas na superfície do CPV-2: depressões, chamadas de dimples (1); projeções ou espículas (2).....	13
FIGURA 2. Representação esquemática do genoma do CPV-2.....	14
FIGURA 3. A- Imunocitoquímica em células MDCK negativas para CPV-2. B- Imunocitoquímica em células MDCK positivas para CPV-2 (x100).....	23
FIGURA 4. Micrografia eletrônica de um coronavírus.....	25
FIGURA 5. Representação esquemática do genoma do CCoV.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-72	<i>Fibroblast Canine Cell Line</i>
ALT	Alanina aminotransferase
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
CAV	Adenovírus canino
CCoV	Coronavírus canino
CCoV-I	Coronavírus canino tipo I
CCoV-II	Coronavírus canino tipo II
CCoV-IIa	Coronavírus canino tipo II subtipo IIa
CCoV-IIb	Coronavírus canino tipo II subtipo IIb
CDV	Vírus da cinomose canina
CID	Coagulação intravascular disseminada
CnMV	Vírus minuto dos cães
CPV-2	Parvovírus canino
CPV-2a	Parvovírus canino tipo 2a
CPV-2b	Parvovírus canino tipo 2b
CPV-2c	Parvovírus canino tipo 2c
CRCoV	Coronavírus respiratório canino
CRFK	<i>Feline Kidney Cells</i>
CRV	Rotavírus canino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Proteína do envelope
FPLV	Vírus da panleucopenia felina
GEH	Gastrenterite hemorrágica
Glu	Ácido Glutâmico
HI	Inibição da Hemaglutinação
ICQ	Imunocitoquímica
IFA	Imunofluorescência
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IHC	Imuno-histoquímica
IPX	Imunoperoxidase
Kb	Quilobase
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cell Line</i>
MEV	Vírus da enterite dos visons
nm	Nanômetro
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Pós-infecção
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
SN	Soroneutralização
TfR	Receptor da transferrina
TGEV	Vírus da gastroenterite transmissível suína
VI	Isolamento viral
VP2	Proteína viral 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	PARVOVÍRUS CANINO	13
2.1.1	Caracterização e Classificação	13
2.1.2	Epidemiologia e Patogenia	16
2.1.3	Manifestações Clínicas e Lesões	19
2.1.4	Diagnóstico	21
2.1.5	Prevenção e Controle	23
2.2	CORONAVÍRUS CANINO	24
2.2.1	Caracterização e Classificação	24
2.2.2	Epidemiologia e Patogenia	26
2.2.3	Manifestações Clínicas e Lesões	27
2.2.4	Diagnóstico	28
2.2.5	Prevenção e Controle	29
3.	ARTIGOS CIENTÍFICOS	30
3.1	TYPING OF CANINE PARVOVIRUS STRAINS CIRCULATING IN BRAZIL BETWEEN 2008 AND 2010	31
3.2	CHARACTERIZATION OF PANTROPIC CANINE CORONAVIRUS FROM BRAZIL	36
4.	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Doenças gastroentéricas compõem grande parte da casuística da clínica médica de pequenos animais, os quais apresentam sinais clínicos típicos como vômitos e diarreias (BURROWS; BATT; SHERDING, 1997). As enterites virais são consideradas uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em cães com menos de 6 meses de idade. Dentre os principais agentes causadores de diarreias estão o parvovírus canino (CPV-2), o coronavírus canino (CCoV), o rotavírus canino (CRV) e o vírus da cinomose canina (CDV) (HOSKINS, 1997; TAMS, 2005). Desde o final dos anos setenta, o CPV-2 ganhou destaque como um dos principais agentes etiológicos de gastroenterites infecciosas em cães jovens (APPEL et al., 1979; MORAES e COSTA, 2012). Assim, a parvovirose canina, por sua elevada frequência aliada à grande resistência no meio ambiente, tem se destacado, dentre as demais, por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade (OTTO et al., 2001). O CPV-2 foi primeiramente isolado em 1978 e, desde então, deu origem a novos tipos antigênicos que se difundiram na população de cães (APPEL et al., 1979; MORAES e COSTA, 2012). Com o tempo, o vírus original foi sendo substituído pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b (DECARO et al., 2008a). Um vírus CPV-2 mutante com uma alteração em um sítio antigenicamente importante foi reconhecido na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001). A nova variante, denominada 2c, também foi identificada no Vietnã e na Espanha por Nakamura et al. (2004) e Decaro et al. (2006b), respectivamente. Na América do Sul, o primeiro relato desta nova cepa foi no Uruguai por Pérez et al. (2007). Recentemente, Streck et al. (2009) identificaram o tipo 2c em amostras de fezes caninas oriundas da região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Na Europa e Estados Unidos, vários estudos observaram que cães imunizados com vacinas contendo os genótipos CPV-2 e CPV-2b apresentaram sintomas da infecção, sendo que a maioria desses animais foram positivos para o tipo CPV-2c (DECARO et al. 2006a; PÉREZ et al. 2007; HONG et al. 2007). Cavalli et al. (2008) concluíram que as vacinas atuais devam conter todas as variantes do CPV-2 ou as cepas presentes no ambiente dos cães, já que as vacinas com um só tipo de cepa não protegeram satisfatoriamente contra as outras.

Já o CCoV causa enterites em cães jovens, facilitando a infecção por outros vírus, quando presente em co-infecção, agravando a severidade das diarreias. Ele pode ser detectado, também, em cães clinicamente saudáveis (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012). Os tipos CCoV-I e CCoV-II estão amplamente distribuídos pelo continente europeu (DECARO et al., 2010, 2011) e vários surtos desses agentes foram relatados em todo o mundo, principalmente em ambientes como canis e abrigos para animais (RIMMELZWAAN et al., 1991; TENNANT et al., 1993; BANDAI et al., 1999; SCHULZ et al., 2008). A infecção simultânea pelas duas variantes pode ocorrer (PRATELLI et al., 2004; DECARO et al., 2005), sendo usualmente restrita ao trato gastrointestinal e associada com anorexia, diarreia e vômito (TENNANT et al., 1991). O CCoV-II é dividido em dois subtipos, CCoV-IIa e CCoV-IIb, sendo que esses vírus possuem recombinação genética com o FCoV-II e com o TGEV, respectivamente (DECARO et al., 2010). Buonavoglia et al. (2006), relataram um surto fatal do CCoV-II em filhotes, onde foi identificado um subtipo CCoV-IIa (pantrópico), altamente patogênico. Este subtipo é responsável pela doença sistêmica em infecções naturais e experimentais (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2008b), causando severas lesões em órgãos como pulmões, rins, baço e fígado (BUONAVOGLIA et al. 2006). A identificação dos tipos de CPV-2 e CCoV é importante para o monitoramento destes agentes na população canina, contribuindo para o estudo de suas filogenias e posterior epidemiologia. Como as vacinas atualmente usadas para a prevenção de CPV-2 e CCoV não possuem as novas variantes, a população canina brasileira está suscetível a graves surtos, como os ocorridos em vários países, comprometendo a sanidade desses animais. O presente estudo tem como objetivos a detecção, caracterização e análise filogenética do CPV-2 e CCoV, em cães no Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

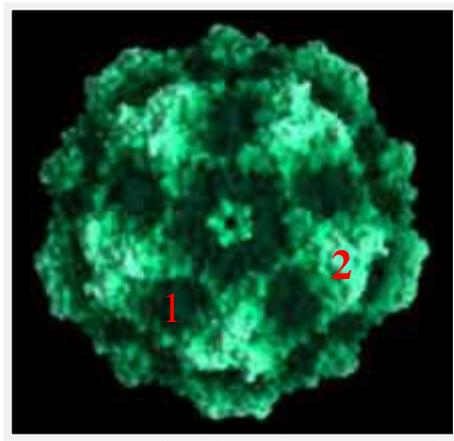
2.1 Parvovírus canino

2.1.1 Caracterização e Classificação

O CPV-2 é um patógeno de grande importância em medicina veterinária e propriedades únicas do vírus tornam-no um agente emergente e reemergente de cães em todo o mundo (BUONAVOGLIA et. al., 2001; DECARO et. al., 2007a).

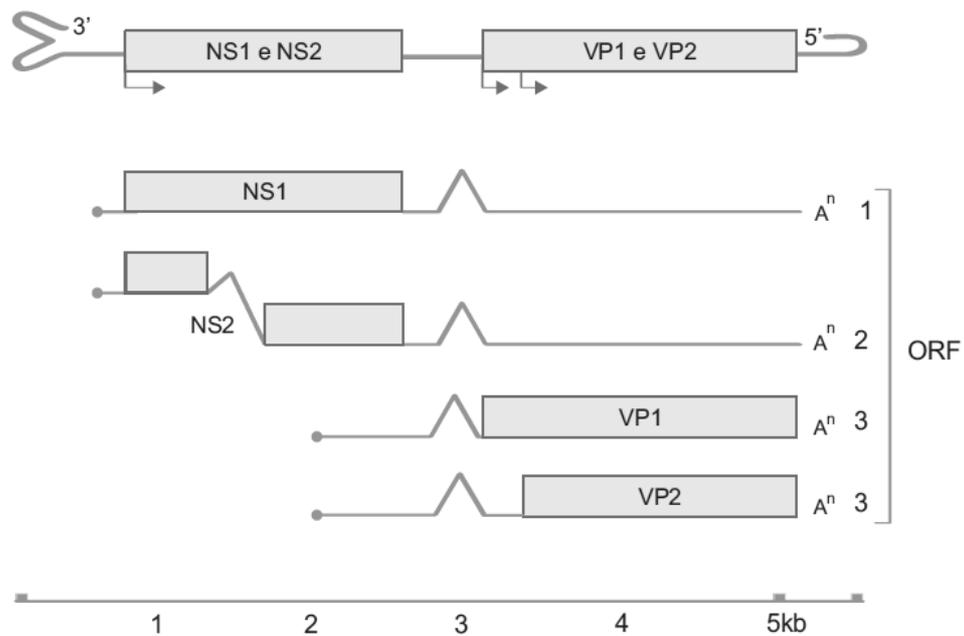
O CPV-2 pertence à família *Parvoviridae* e caracteriza-se por ser um vírus pequeno (20 a 25 nm), esférico, com capsídeo icosaédrico (FIGURA 1), possuindo uma molécula de DNA linear de fita simples como genoma.

Figura 1: Crio-eletromicroscopia com indicações das estruturas na superfície do CPV-2: depressões, chamadas de dimples (1); projeções ou espículas (2).
Fonte: http://www.marvistavet.com/html/body_oseltamivir.html



Os parvovírus possuem somente quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes (*open reading frames* – ORFs) sobrepostas no genoma de 5 quilobases (kb) (FIGURA 2). Este apresenta de 6 a 10 seqüências palindrômicas que possibilitam a formação de estruturas em forma de grampo nas regiões terminais, sendo essenciais para a replicação do genoma viral e para sua encapsidação. A sua dependência por células na fase S do ciclo celular faz com que afetem, preferencialmente, órgãos que apresentam células em multiplicação, como, por exemplo, os da medula óssea, embrionárias e das criptas intestinais (MORAES e COSTA, 2012). São extremamente estáveis no ambiente, podendo manter sua infectividade durante meses em determinadas condições, sendo relativamente resistentes aos desinfetantes, pois são vírus não envelopados (MARULAPPA e KAPIL, 2009).

Figura 2: Representação esquemática do genoma do CPV-2. Fonte: Moraes e Costa (2012).



O parvovírus circulante na década de 1970 foi denominado de vírus minuto dos cães (CnMV) (GREENWOOD et al., 1995), pertencente ao gênero *Bocavirus*. O CnMV era um vírus apatogênico, porém estudos recentes demonstraram que pode causar reabsorção fetal e abortamento em cadelas (POLLOCK & COYNE, 1993; PARRISH, 1994). Em 1978, surgiu o CPV-2 do gênero *Parvovirus*, que sofreu, posteriormente, alterações genéticas que originaram as variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b. As diferenças entre essas duas variantes são mínimas, o que confere uma boa proteção cruzada (MORAES e COSTA, 2012). No Brasil, foram relatados casos de infecção pelo CPV-2 a partir de 1980 (HAGIWARA, 1980; DURIGON et al., 1987; MOOJEN et al., 1992).

De acordo com as pesquisas efetuadas ao longo dos anos, observou-se que o CPV-2 apresenta características antigênicas e genéticas semelhantes às do vírus da panleucopenia felina (FPLV) e às do vírus da enterite dos visons (MEV) (LENGHAUS e STUDDERT, 1980; McMASTER et al., 1981; TRUYEN e PARRISH 1992; GREENWOOD et al., 1995). A origem do CPV-2 tem como hipótese mais provável o FPLV, o qual difere pela substituição de dois aminoácidos na proteína VP2 do capsídeo, que permitiu a utilização do receptor da transferrina (TfR) presente em células de cães, estabelecendo o CPV-2 como um novo patógeno dessa espécie (PARRISH, 1999; TRUYEN, 1999; MORAES e COSTA, 2012). A proteína VP2, além de ser o sítio de ligação ao receptor, confere ao vírus a propriedade hemaglutinante e contém os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (LOPEZ de TURIZO et al., 1991). Com o tempo, o CPV-2 foi sendo substituído, na população canina, pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b (PRATELLI et al., 2001a).

Segundo Truyen (2006), o CPV-2 é diferenciado dos outros parvovírus pelo uso de anticorpos monoclonais específicos, sendo que sua replicação pode ocorrer em células felinas *in vitro*, mas não *in vivo* (TRUYEN e PARRISH, 1992). Em contraste, as novas variantes antigênicas replicam-se em gatos e, em infecções experimentais, podem induzir doença clínica (TRUYEN et al., 1996). Uma terceira variante do CPV-2, cuja primeira denominação foi mutante Glu-426 e subsequentemente renomeada para CPV-2c, foi detectada na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001). O CPV-2c diferencia-se das outras por apresentar na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo, uma substituição dos aminoácidos Asn e Asp pelo Glu (HONG et al., 2007).

2.1.2 Epidemiologia e Patogenia

Desde sua descoberta, no final dos anos 70, a parvovirose canina gerou altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo sua gravidade inicialmente atribuída à falta de imunidade natural da população canina contra o vírus. A vacinação e a resistência natural contra a doença deveriam conferir maior proteção aos cães, entretanto, a alta incidência da infecção se mantém em animais com idade entre 6 semanas e 6 meses (MORAIS e COSTA, 2012). Os filhotes são mais propensos ao desenvolvimento da gastroenterite hemorrágica pelo CPV, porém cães de qualquer idade, gênero ou raça podem ser acometidos (PARRISH, 1999; McCANDLISH, 2001; MORAES e COSTA, 2012). Algumas raças de cães de médio e grande porte, como Doberman, Labrador, Pastor Alemão, Pit Bull e Rottweiler podem ser mais suscetíveis e vir a desenvolver uma doença mais grave quando infectados (NELSON e COUTO, 2006; MORAIS e COSTA, 2012). Nas populações suscetíveis, alguns animais adultos soroconvertem sem manifestar sinais, indicando que é comum a infecção branda ou inaparente, enquanto que a enterite pode se disseminar rapidamente entre animais mais jovens (HOSKINS, 2004). A estabilidade do CPV-2 no ambiente do canil e a excreção de grandes quantidades de vírus por animais doentes podem expor filhotes suscetíveis a doses infecciosas maciças do agente. A susceptibilidade imunológica coincide com o desmame nos filhotes, que ocorre na faixa etária de 6 a 8 semanas de idade (MARULAPPA e KAPIL, 2009). Antes das 6 semanas de idade, normalmente, os filhotes encontram-se protegidos contra a infecção através dos anticorpos maternos. O vírus é extremamente resistente, sobrevivendo nas fezes, em temperatura ambiente, por mais de um ano e em solo contaminado por cinco meses (GORDON e ANGRICK, 1986). Estudos de infecção experimental em filhotes de cães mostraram que a infecção natural ocorre pela via oral, com replicação inicial do vírus nos tecidos linfóides da orofaringe dois dias após infecção (PI). A seguir, uma intensa viremia é observada em até cinco dias PI, disseminando o vírus para outros tecidos: medula óssea, tecido linfóide e intestino delgado (MACARTNEY et al., 1984a; McCANDLISH, 2001). Como facilitadores da transmissão viral, há também a participação do homem, roedores e insetos (HOSKINS, 1997). A infecção, portanto, ocorre por exposição oro - nasal às fezes, fômites ou ambientes contaminados (MORAES e COSTA, 2012).

A identificação e caracterização do CPV-2 no Brasil é importante para que ocorra o monitoramento de sua disseminação em distintas regiões do país, a ocorrência

de surtos da doença e a identificação das variantes antigênicas, contribuindo, com esses dados, para a sua epidemiologia. As vacinas atualmente usadas para a prevenção da parvovirose canina são compostas pelas cepas CPV-2 ou CPV-2b. Este fator coloca em dúvida se estas vacinas estão conseguindo proporcionar uma proteção eficiente para o CPV-2c.

Estudos na Itália demonstraram, pelas técnicas de Inibição da Hemaglutinação (HI) e Soro Neutralização (SN), a imunogenicidade conferida por duas vacinas com vírus vivo atenuado das cepas CPV-2 e CPV-2b. Foram utilizados 36 filhotes de cães, divididos em dois grupos distintos, cada grupo recebeu um tipo de vacina, ocorrendo à titulação dos anticorpos 30 dias após a vacinação. A imunogenicidade da cepa 2b foi um pouco maior do que a da CPV-2 original (PRATELLI et al., 2001).

Na Europa e Estados Unidos, vários estudos observaram que cães imunizados com vacinas contendo as variantes CPV-2 e CPV-2b apresentaram sintomas da infecção, sendo que a maioria desses animais foram positivos para o tipo CPV-2c (DECARO et al. 2006; HONG et al. 2007; PÉREZ et al. 2007).

Cavalli et al. (2008) concluíram que as vacinas atuais devem conter todas as variantes do CPV-2 presentes no ambiente dos cães. As vacinas com uma só variante antigênica não protege satisfatoriamente contra as outras.

Hass et al. (2008) detectaram, através da HI, títulos de anticorpos ≥ 80 contra o CPV em 90,3% dos cães domiciliados, em 91,5% dos que tinham acesso à rua e em 100% nos que viviam na rua. Pratelli et al. (2001) não observaram diferenças significativas entre os níveis de anticorpos e as condições de moradia de cães, isto ocorreu, provavelmente, pelas características epidemiológicas do CPV-2, como sua excreção em grandes quantidades pelas fezes e, sobretudo, sua grande resistência no meio ambiente. Contudo, a prática de vacinação contra o CPV-2 parece ser altamente justificada e necessária somente em animais jovens, pois esses não apresentam anticorpos em níveis protetores, sendo suscetíveis às infecções virais.

Pereira et al. (2000) identificaram, em amostras de fezes caninas, as variantes de CPV-2 presentes em várias regiões do Brasil. As amostras foram coletadas de cães com sintomatologia para parvovirose nos anos de 1980-1986 e 1990-1995 e testadas através da PCR. A variante predominante na década de 80 foi CPV-2a e na década de 90 CPV-2b.

A prevalência de anticorpos observada para CPV-2, no Rio Grande do Sul, foi de 68% e no do Rio de Janeiro, encontraram 97% de positividade, sendo a variante

CPV-2b a mais observada em ambos os estudos (COSTA et al. 2005; DEZENGRINI et al. 2007).

As vacinas contendo o CPV-2 estão sendo substituídas por vacinas que possuem a variante CPV-2b, com vírus vivo atenuado. O maior problema da imunização de filhotes é o alto título de anticorpos maternos que interferem na resposta vacinal. Porém, estes anticorpos decaem entre 2 a 5 semanas de vida, fazendo que esses cães fiquem suscetíveis à infecção. A aplicação intranasal da vacina com vírus vivo atenuado CPV-2b teve o mesmo efeito quando comparada a via parenteral. A vacina induziu a soro conversão em 100% dos cães que estavam com títulos de anticorpos maternos menores que 80 no momento da vacinação e em 51,6% dos cães com títulos entre 160 e 320 (MARTELLA et al. 2005).

A terceira variante CPV-2c, foi descoberta na Itália em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001), apresentando grande disseminação entre a população canina daquele país (DECARO et. al., 2006b) e em outros países europeus, como também na Ásia (NAKAMURA et. al., 2004) e nas Américas (HONG et. al., 2007; KAPIL et. al., 2007; PÉREZ et. al., 2007; STRECK et al., 2009).

Embora os primeiros relatos mostrassem uma baixa patogenicidade do CPV-2c, dados experimentais e observações a campo indicaram, atualmente, um curso clínico mais grave e maiores taxas de mortalidade, bem como a capacidade de infectar e causar doença em cães adultos, mesmo adequadamente vacinados (DECARO et. al., 2008).

As vacinas comerciais atualmente no mercado são constituídas por CPV-2 ou CPV-2b, não existindo nenhuma vacina com o tipo 2c (MARULAPPA e KAPIL, 2009). Contudo, as pesquisas divergem sobre a proteção dessas vacinas frente ao desafio com o CPV-2c (BUONAVOGLIA et al., 2001; NAKAMURA et. al., 2004; HONG et. al., 2007; KAPIL et. al., 2007; PÉREZ et. al., 2007).

2.1.3 Manifestações Clínicas e Lesões

A evolução clínica após a exposição ao CPV-2 depende, em grande parte, do grau de imunidade materna, virulência da cepa viral, dose infectante do vírus e da defesa imunológica do hospedeiro (HOMEM et al., 1999; TAMS, 2005; NELSON e COUTO, 2006). Duas síndromes clínicas são descritas em cães acometidos por CPV-2: a miocardite e a gastroenterite hemorrágica (GEH). A miocardite pode ocorrer em cães recém-nascidos que tiveram infecção intrauterina ou em suas primeiras semanas de vida. Esses animais apresentam morte súbita ou sintomas inespecíficos, desenvolvendo sinais de insuficiência cardíaca. A miocardite ocorreu, com maior frequência, quando foram relatados os primeiros surtos de parvovirose no final dos anos 1970. Com o aumento da prevalência de anticorpos contra o CPV-2, nos dias atuais, essa manifestação é considerada muito rara.

A principal manifestação da parvovirose canina é a gastroenterite (MORAES e COSTA, 2012). A diarreia apresenta-se de diferentes formas, onde são observadas fezes de cor amarelada, hemorrágicas ou com estrias de sangue. A consistência pode variar de pastosa a levemente fluida, caracterizando-se por apresentar um odor desagradável (APPEL et al., 1979; McCANDLISH, 2001). A perda do epitélio intestinal permite a penetração de bactérias e outros agentes na circulação sanguínea, o que contribui para o agravamento dos sinais clínicos. A excreção do vírus nas fezes inicia no terceiro ou quarto dia após a infecção, sendo excretado em grandes quantidades por até 20 dias e seu término está, provavelmente, relacionado com o desenvolvimento de imunidade (MORAES e COSTA, 2012). O vômito é, normalmente, um achado predominante e pode ser grave o suficiente para causar esofagite. A apresentação típica da GEH ocorre, geralmente, em cães jovens não vacinados, os quais apresentam uma acentuada desidratação com a progressão dos sinais clínicos (CARMICHAEL, 2005; DECARO et al., 2005; KOCATURK, et al., 2010)

Animais infectados demonstram, no hemograma, leucopenia, neutropenia e linfopenia, podendo ocorrer leucocitose na fase de recuperação. A anemia é justificada pela perda de sangue intestinal e o hematócrito elevado é resultante da desidratação (DECARO et al., 2005; MORAES e COSTA, 2012; KOCATURK, et al., 2010). Os níveis de uréia e creatinina aumentados são consequência da oligúria e azotemia pré-

renal (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). A hipoalbuminemia e anormalidades eletrolíticas como hiponatremia, hipocalemia e hipocloremia são vistas em 25-33% dos cães. A enzima alanina aminotransferase (ALT) encontra-se elevada em aproximadamente 25% dos cães e anormalidades acidobásicas podem ser vistas em cães severamente afetados, geralmente sugestivas de acidose metabólica (STROMBECK e GUILFORD, 1991). Alterações na temperatura retal, como hipertermia, podem ser observadas em decorrência da própria infecção viral ou bacteriana, porém, devido à evolução rápida da doença alguns cães apresentam hipotermia, septicemia e coagulação intravascular disseminada (CID), sinais terminais em pacientes em choque endotóxico (HOSKINS, 2004; KOCATURK, et al., 2010). Os sinais clínicos de choque inicialmente são: pulso normal ou fraco, palidez das mucosas, tempo de preenchimento capilar aumentado, hipotensão, nível de consciência reduzido e temperatura corporal baixa. Os animais não tratados adequadamente nesse estágio evoluem para um nível terminal, apresentando bradicardia, mucosas pálidas e cianóticas, hipotensão grave, anúria, estupor ou coma. Nessa situação, a parada cardíaca e respiratória são eminentes, levando os animais a óbito (MORAES e COSTA, 2012).

As lesões macroscópicas no intestino causadas pelo CPV-2 são variáveis e inespecíficas, apresentando-se mais acentuadas na parte distal do duodeno, posteriormente atingindo o jejuno, evidenciando-se as placas de Peyer (POLLOCK e CARMICHAEL, 1990; OLIVEIRA et al., 2009). As lesões variam de leves a graves, com as alças intestinais apresentando a camada serosa de aspecto hemorrágico, coberta ou não por fibrina. A congestão da subserosa e o edema na mucosa espessam a parede intestinal (OLIVEIRA et al., 2009). O lúmen intestinal pode apresentar-se vazio ou com conteúdo fluido hemorrágico ou de coloração amarela. Os linfonodos mesentéricos encontram-se aumentados e edemaciados com hemorragia multifocal em petéquias no córtex (HAGIWARA, 1980; APPEL e PARRISH 1987; OLIVEIRA et al., 2009). Oliveira et al. (2009) relataram que, durante a necropsia de filhotes de cães, além das lesões citadas anteriormente, também foram encontrados atrofia do timo e esplenomegalia. Na medula óssea, pode-se observar necrose e depleção das células germinativas e células maduras das séries mielóide e eritróide, seguida de hipoplasia regenerativa durante a fase de recuperação (POLLOCK e CARMICHAEL, 1990; OLIVEIRA et al., 2009).

McCandlish (2001) cita que a recuperação da doença pode ser rápida, mas pode levar de 7 a 10 dias ou mais nos animais gravemente afetados, o que exige tratamento intensivo.

2.1.4 Diagnóstico

Tratando-se de uma doença de caráter infecto-contagioso, o diagnóstico rápido e precoce da parvovirose canina torna-se essencial para evitar a disseminação da doença (VIEIRA et al., 2008). O diagnóstico presuntivo, na rotina clínica, geralmente é feito pelo histórico, sinais clínicos e hemograma (MORAES e COSTA, 2012). Nelson e Couto (2006) ainda relatam que o diagnóstico é de um modo geral, estabelecido por tentativa, sendo a neutropenia uma alteração do hemograma sugestiva de parvovirose, mas não sensível ou específica o suficiente para fechar diagnóstico, pois esta pode ocorrer devido à outra infecção grave. O diagnóstico definitivo de parvovirose exige a identificação do vírus por testes específicos (MORAES e COSTA, 2012).

A detecção do vírus nas fezes de pacientes suspeitos pode ser realizada por intermédio de Microscopia Eletrônica, Hemaglutinação Direta (HA), isolamento viral (IV) em cultivo celular ou ELISA. Estes métodos são os mais sensíveis e específicos para o diagnóstico, porém dependem do período de eliminação do antígeno fecal, que é breve. Os testes sorológicos indiretos, como HI, Soroneutralização (SN), ELISA indireto e Imunofluorescência indireta (IFI) também podem ser utilizados para diagnóstico de infecção passada, ou mesmo para o acompanhamento da condição imunológica do animal após vacinação. Concentrações séricas elevadas de IgM podem ser observadas ainda na primeira semana de infecção natural ou mesmo após vacinação recente com vírus atenuado. Já na segunda semana, as concentrações séricas de IgG apresentam aumento, sendo a classe de imunoglobulina predominante em ambos os casos (HOSKINS, 2004).

O isolamento viral a partir de fezes ou de tecidos pode ser realizado em células de origem canina, como as MDCK e A-72, e/ou em células da linhagem CRFK de origem felina (MORAES e COSTA, 2012). Strottmann et al. (2008) citam que o isolamento em cultivo celular é considerado o teste padrão, mas a PCR tem sido amplamente utilizada, principalmente pela alta especificidade e sensibilidade deste teste. A detecção do material genético viral, pela PCR, em amostras de fezes é sem

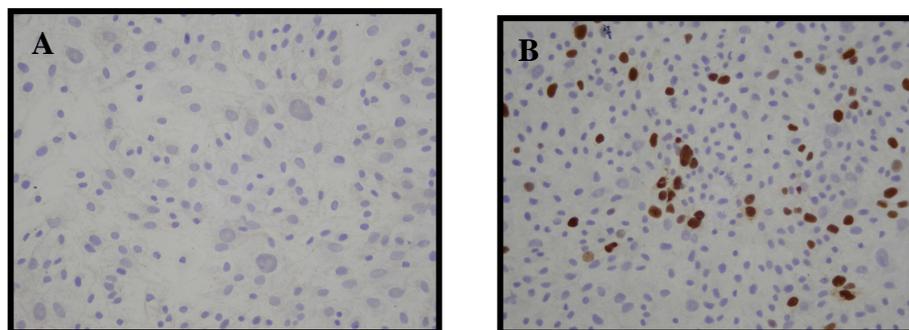
dúvida o método atual de escolha, uma vez que contribui para excluir muitos falsos positivos e falsos negativos (DE MARI et al., 2003). Estudos anteriores demonstram que a PCR é mais específica e sensível para a detecção de CPV-2 em fezes de cães, quando comparada com HA, ELISA e isolamento viral (MOCHIZUKI; HARASAWA e NAKATAN, 1993). Uma técnica muito utilizada é a da imunoperoxidase (IPX), que pode ser aplicada em monocamadas celulares, esfregaços ou diretamente em tecidos, sendo denominada de imunocitoquímica (ICQ) (FIGURA 3) ou imuno-histoquímica (IHQ), respectivamente. Esses métodos detectam as proteínas virais após a multiplicação do vírus em cultivos celulares ou em tecidos, confirmando a presença do agente que, em alguns casos, apresenta pouca citopatologia ou a não produção do efeito citopático (MORAES e COSTA, 2012).

O diagnóstico *post-mortem* dos cães acometidos pela parvovirose canina é realizado com base nos achados macroscópicos observados na necropsia e lesões histológicas características (HOSKINS, 1997). Na necropsia observa-se a mucosa intestinal congesta, hemorrágica e frequentemente recoberta por uma pseudomembrana, a medula óssea pode apresentar-se liquefeita e hiperêmica. A histopatologia intestinal revela necrose epitelial, colapso das vilosidades e aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria (MORAES e COSTA, 2012).

Em estudo recente, Oliveira et al. (2009) observaram que o aumento das placas de Peyer do intestino delgado e a hiperemia da mucosa e serosa intestinal foram os achados macroscópicos mais detectados em noventa e seis cães necropsiados com lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose canina. Microscopicamente, foi visualizada enterite necrótica em 77% dos cães, mas em 17,7% as alterações histológicas do intestino delgado ficaram prejudicadas pela autólise, dificultando a interpretação. A identificação viral nos tecidos pela IHQ não foi possível em todos os casos, sendo o intestino delgado o melhor órgão para a identificação do CPV-2. Entretanto, a IHQ de tecidos linfóides revelou um menor número de cortes positivos para CPV-2 e, em geral, com pequena quantidade de células linfóides marcadas, resultado que sugere a rápida passagem do CPV-2 nesses órgãos.

Os achados histopatológicos podem ser inespecíficos ou são prejudicados por autólise, principalmente no intestino delgado onde esta alteração *post-mortem* se apresenta precocemente (SVARA et al., 2003). Desta forma, métodos de diagnóstico auxiliares são necessários para a confirmação da parvovirose canina.

Figura 3: A- Imunocitoquímica em células MDCK negativas para CPV-2b. B- Imunocitoquímica em células MDCK positivas para CPV-2b (x100). Fonte: Setor de Patologia Veterinária - FAVET-UFRGS



2.1.5 Prevenção e Controle

Cães com parvovirose devem ser isolados e receber tratamento em um local específico. A limpeza e desinfecção de boxes e utensílios podem ser feitas com formol a 5%, hipoclorito de sódio a 0,175% ou calor a 60°C por 30 minutos (MORAES e COSTA, 2012).

Na tentativa de prevenir a disseminação da doença, é importante lembrar que o CPV-2 persiste por um longo período de tempo no ambiente, tornando difícil o seu controle. Em cães assintomáticos, pode-se detectar a presença do vírus nas fezes, sendo que a imunidade passiva, que em alguns filhotes persiste por 18 semanas de idade, pode inativar o vírus vacinal (NELSON e COUTO, 2006).

A maneira mais efetiva de prevenção da parvovirose é a vacinação sistêmica de filhotes, que devem receber a primeira dose com seis a oito semanas de idade, com duas doses de reforço a cada quatro semanas. Uma quarta dose pode ser efetuada, principalmente para aqueles animais considerados sob risco em geral. Recomenda-se o isolamento dos animais até completarem a imunidade, sempre observando a desinfecção do local (McCANDLISH, 2001; NELSON e COUTO, 2006; MORAES e COSTA, 2012). A revacinação anual é, geralmente, recomendada para o CPV-2, embora possam ser realizados a cada três anos (NELSON e COUTO, 2006; HORZINEK, 2010).

McCandlish (2001) cita que as vacinas com vírus vivo modificado e inativado da FPLV foram utilizadas para proteger cães contra o CPV-2 devido aos antígenos comuns que estimulam proteção cruzada, porém o baixo nível de proteção conferido tornou-as sem utilidade.

Essas vacinas foram substituídas por vacinas vivas atenuadas contendo as variantes CPV-2 e CPV-2b. Em animais imunizados com vacinas contendo estas variantes antigênicas e desafiados com amostras de campo de CPV-2c e CPV-2b, apresentaram uma proteção eficiente quando comparados ao grupo controle, evidenciando a proteção vacinal (LARSON e SCHULTZ, 2008; SPIBEY et al., 2008). No entanto, outros pesquisadores colocam em discussão se as mutações genóticas sofridas durante esses anos pelo CPV-2 têm alterado a capacidade das vacinas em proteger adequadamente contra a doença (DECARO et al. 2007; DECARO et al., 2008). Embora o significado dessa variabilidade antigênica ainda seja investigado, acredita-se que tenha importância principalmente quando os filhotes, com imunidade passiva materna, são desafiados com vírus antigenicamente diferentes, ou seja, um determinado título de anticorpos é suficientemente alto para proteger contra o desafio com o vírus homólogo, mas não o suficiente para evitar uma infecção por uma cepa heteróloga, podendo causar doença nesses cães (TRUYEN, 2006).

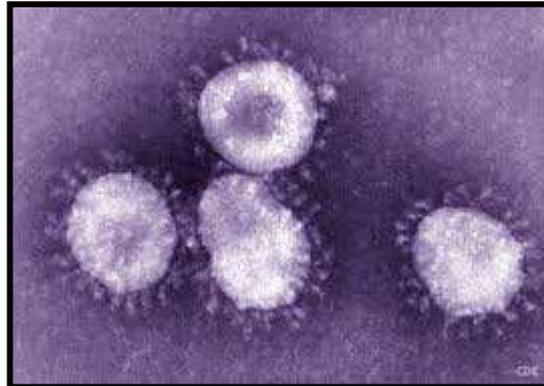
2.2 Coronavírus canino

2.2.1 Caracterização e Classificação

O coronavírus canino (CCoV), é classificado como um *Alphacoronavirus 1*, da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, gênero *Alphacoronavirus* (CARSTENS, 2010). Causa infecção gastrointestinal nos cães, a qual geralmente se manifesta em filhotes com letargia, anorexia, vômitos e diarreia, com duração de uma a duas semanas (DECARO e BUONAVOGLIA, 2008). As fezes são geralmente normais a aquosas, com uma variação de cor de amarelo a esverdeado e, algumas vezes, pode-se observar diarreia hemorrágica. A maioria dos animais se recupera após um período de 7-10 dias (CARMICHAEL e BINN, 1981). A coronavirose entérica canina é uma doença infecciosa cosmopolita, que ocorre de forma endêmica, com elevadas morbidade e mortalidade em filhotes (ZAPPULLI et al., 2008) e é considerada extremamente contagiosa, especialmente em locais como canis e abrigos de animais, sendo a prevalência significativamente maior nesses locais, com maior densidade populacional, comparados com os cães alojados separadamente (CARMICHAEL e BINN, 1981). O CCoV (FIGURA 4) replica-se primariamente na

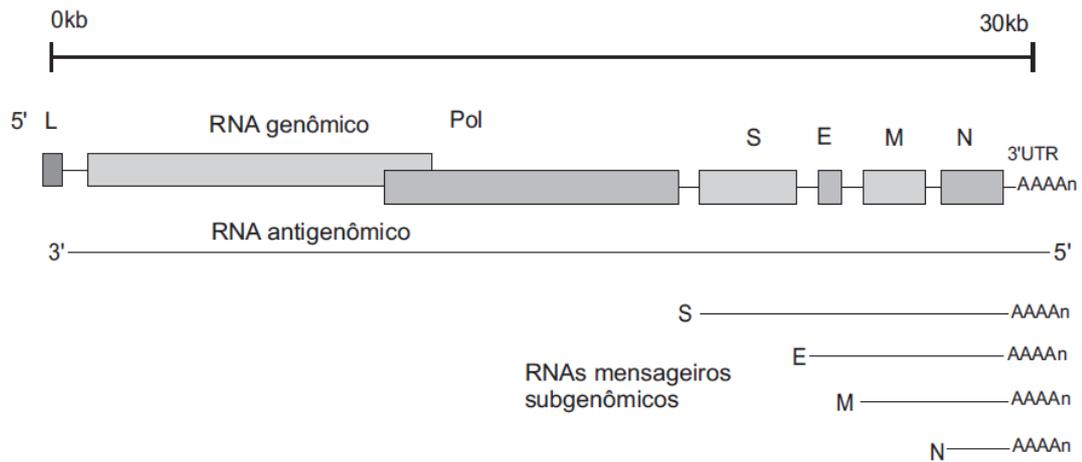
extremidade dos vilos do intestino delgado, causando uma infecção lítica seguida por descamação e encurtamento dos vilos e diarreia em 18 a 72 horas pós-infecção. Além disso, este vírus pode ser encontrado em infecções simultâneas com bactérias, parasitos, ou outros vírus, como adenovírus canino (CAV) ou CPV-2 (PRATELLI et al. 2001b).

Figura 4: Micrografia eletrônica de um coronavírus. Fonte: http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/10270/10270_lores.jpg.



Os coronavírus possuem RNA não segmentado, de fita simples, sentido positivo e 27 a 32 kb de comprimento (FIGURA 5), são envelopados, pleomórficos, aproximadamente arredondados com até 220 nm de diâmetro (LAI e HOLMES, 2001). O nome coronavírus é derivado do latim *corona* que significa coroa, esta morfologia se deve a glicoproteínas estruturais que se encontram na superfície viral (HOLMES e LAI, 1996). O CCoV apresenta um genoma composto dos genes codificadores das proteínas: poliproteína replicase (ORF1 – *open read frame 1*), de espícula (S), de envelope (E), de membrana (M) e de nucleocapsídeo (N) (LAI e HOLMES, 2001). Além da espécie de CCoV, uma segunda espécie, denominada de coronavírus respiratório canino (CRCV), formalmente conhecida como *Betacoronavirus 1*, gênero *Betacoronavirus* (CARSTENS, 2010), foi relatada causando processos respiratórios em cães (ERLES et al., 2003).

Figura 5: Representação esquemática do genoma do CCoV. Fonte: Lovato e Dezengrini (2007)



2.2.2 Epidemiologia e Patogenia

A infecção por CCoV é restrita ao trato gastroentérico e está associada com anorexia, diarreia e vômitos (TENNANT et al., 1991). A doença ocorre principalmente em abrigos para cães e canis, pois o vírus é altamente contagioso, disseminando-se rapidamente na população canina. A principal via de infecção é a oral, sendo as fezes e fômites contaminados a fonte do vírus. O CCoV é eliminado nas fezes por até duas semanas pós infecção e alguns estudos demonstram que este período pode se prolongar por até 180 dias. Cães saudáveis podem excretar o vírus nas fezes por longos períodos (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

Atualmente, o CCoV é classificado em dois genótipos: CCoV tipo 1 (CCoV-I) e o CCoV tipo 2 (CCoV-II) (DECARO e BUONAVOGLIA, 2008). O CCoV-II foi detectado após um surto de doença clínica severa em filhotes de cães (BUONAVOGLIA et al., 2006). O vírus foi encontrado nas fezes e em vários órgãos parenquimatosos, sendo isolado em cultivo celular e inoculado em cães livres de patógenos específicos (SPF), reproduzindo a doença. Esses cães vieram a óbito, confirmando a virulência desse novo tipo. A distribuição do CCoV-II é mundial, com destaque na Europa (DECARO et al. 2009) e Ásia (WANG et al. 2006; SOMA et al. 2010). O CCoV-II pode ser classificado em dois subtipos: CCoV-IIa e CCoV-IIb (TGEV-like) (DECARO et al., 2009). O subtipo CCoV-IIb tem sido relatado em vários países europeus (ERLES e BROWNLIE, 2009; DECARO et al., 2010), bem como no Japão (SOMA et al., 2010). Ele foi detectado em órgãos, mas não sendo relacionado à doença sistêmica em cães (DECARO et al., 2009; NTAFFIS et al., 2011). Porém, o

subtipo CCoV-IIa, é responsável pela ocorrência de severos surtos da doença (NTAFIS et al., 2010; ZICOLA et al., 2012). Em países como o Japão, Itália e Turquia a prevalência sorológica para CCoV, em cães com diarreia, foi de 44,1% a 74,3% (BANDAI et al., 1999; PRATELLI et al., 2002; YESILBAG et al., 2004). No Brasil, Mosca (2003) encontrou 55 animais positivos de um total de 80 testados (68,8%) e Guirão (2009), 47 positivos de 100 animais testados (47%); no Rio Grande do Sul, Dezengrini et al.(2007) encontraram 412 animais soropositivos para CCoV de 817 animais estudados (50,4%). O CCoV também foi detectado em animais selvagens, como coiotes (GREEN et al., 1984), lobos (ZARNKE et al., 2001) e hienas (EAST et al., 2004).

2.2.3 Manifestações Clínicas e Lesões

Os animais infectados pelo CCoV-I apresentam sinais clínicos leves a moderados, incluindo perda de apetite, vômito, diarreia fluida, desidratação e, ocasionalmente, morte. Geralmente, doença sistêmica não é observada durante a infecção, embora o vírus tenha sido isolado de vários tecidos (tonsilas, pulmões e fígado) em filhotes infectados experimentalmente (TENNANT et al., 1991). A doença fatal comumente ocorre em consequência de infecções mistas com CPV-2 (DECARO et al., 2006b, 2007b), adenovírus canino tipo 1 (DECARO et al., 2007a) ou vírus da cinomose (DECARO et al., 2004a). Na infecção por CCoV-II os sintomas e lesões são mais graves, possuindo ou não coinfeção por outros agentes. Os animais apresentam febre, letargia, anorexia, vômito, GEH, sintomas neurológicos (ataxia, convulsões), acentuada leucopenia (linfopenia), óbito em 2 -3 dias após o início dos sintomas, severas lesões no trato gastroentérico, pulmões, baço, fígado, rins (BUONAVOGLIA et al., 2006). Evermann et al. (2005) relataram dois casos fatais em filhotes em que não foi demonstrada coinfeção por outro agente viral. O vírus, após infectar cães pela via fecal-oral, atinge o intestino delgado, replicando nas vilosidades. A excreção nas fezes inicia entre um a dois dias pós-infecção e os sintomas clínicos aparecem entre um a quatro dias.

As lesões macroscópicas causadas pelos CCoV-I e CCoV-II são: intestino delgado dilatado, conteúdo líquido e de coloração amarelada ou esverdeada, evidenciação das placas de Peyer, mucosa intestinal encontra-se hiperêmica e

hemorrágica, os linfonodos mesentéricos podem estar edemaciados. As lesões microscópicas se caracterizam por atrofia das vilosidades intestinais, depressão das criptas, achatamento das células epiteliais, aumento da celularidade da lâmina própria e aumento das células globosas. A necrose e infiltrado no parênquima pulmonar e hepático, severa depleção linfóide no baço, extensas áreas de necrose renal, são encontradas somente na infecção por CCoV-II (ZAPPULLI et al., 2008; BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

2.2.4 Diagnóstico

Para detecção do CCoV nas fezes ou no intestino e sua diferenciação de enterites causadas por outros agentes, como o CPV-2, o rotavírus (CRV), CAV e o vírus da cinomose canina (CDV) são utilizadas as técnicas de ELISA, SN, IPX, VI, IFA, RT-PCR e PCR em tempo real (qPCR). O IV em células não é muito utilizado, entretanto diferentes laboratórios obtiveram sucesso utilizando células primárias de rim, timo e membrana sinovial canina. As células de linhagem de rim canino A-72 são particularmente susceptíveis ao CCoV, além de células de embrião e de linhagem de rim felino (CRFK). O vírus produz efeito citopático caracterizado pela formação de sincícios e a confirmação da identidade do agente é realizada por IFA (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012). As técnicas de RT-PCR (PRATELLI et al., 2001) e qPCR (DECARO et al., 2004) realizadas diretamente das fezes têm sido utilizadas, principalmente em pesquisas. Um estudo por RT-PCR detectou o RNA viral em 20% (3/15) das amostras de fezes caninas testadas (MOSCA et al., 2003). Em testes com vacinas experimentais observaram que essas técnicas detectam quantidades menores de vírus excretadas nas fezes, por períodos maiores, quando comparadas com o isolamento viral. A sorologia não é muito utilizada, pois alguns fatores influenciam nos resultados, como a ampla distribuição do vírus na população canina e, em muitos casos, a ocorrência de infecções subclínicas (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

2.2.5 Prevenção e Controle

Como medida de prevenção para o CCoV deve ser evitado o contato com animais infectados, falta de sanidade, superpopulação, desmame precoce e infecções concomitantes por outros agentes. No meio ambiente, o vírus é facilmente inativado pelo calor e por solventes lipídicos. No entanto, em temperaturas baixas, pode manter-se infeccioso por longos períodos (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012). O tratamento utilizado para CCoV é de suporte e baseia-se na restituição do equilíbrio hídrico-eletrolítico, além do controle de infecções secundárias (HOSKINS, 1997). Vacinas inativadas existem para o controle dessa doença, mas seu valor de proteção é controverso (MAcLACHLAN e DUBOVI, 2011). As vacinas vivas atenuadas foram testadas com bons resultados, onde cães vacinados pela via oral apresentaram títulos mais altos de IgA do que cães vacinados pela via intramuscular. Os cães que receberam a vacina pela via oral não excretaram o vírus nas fezes, mas os cães vacinados pela via intramuscular excretaram o vírus por um período de até 10 dias (BRANDÃO, LOVATO e SLHESSARENKO, 2012).

As vacinas atualmente no mercado não apresentam esses novos subtipos em sua formulação, o que seria necessário para uma maior proteção. Segundo alguns trabalhos, os subtipos CCoVIIa e CCoVIIb possuem uma reação cruzada limitada com o genótipo CCoV-I, comprometendo a eficiência vacinal (DECARO et al., 2009; DECARO et al., 2010; DECARO et al. 2011).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados, bem como os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos, serão apresentados a seguir na forma de dois artigos científicos como segue:

1. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010

Publicado no periódico científico *Virus Research*, em 1º de janeiro de 2012.

2. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil

Está em elaboração e será submetido ao periódico científico *Veterinary Microbiology*.

3.1 Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010

Virus Research 165 (2012) 29–33



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres



Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010

Luciane Dubina Pinto^a, André Felipe Streck^b, Karla Rathje Gonçalves^a, Carine Kunzler Souza^a,
Ângela Oliveira Corbellini^a, Luís Gustavo Corbellini^c, Cláudio Wageck Canal^{a,*}

^a Laboratório de Virologia Veterinária, Faculdade de Veterinária 9090, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

^c Laboratório de Epidemiologia, Faculdade de Veterinária 9090, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2011
Received in revised form
19 December 2011
Accepted 1 January 2012
Available online 8 January 2012

Keywords:

Canine parvovirus
CPV-2
Detection
Characterisation
Phylogeny

ABSTRACT

Detection and characterisation of the canine parvovirus (CPV-2) strains that are currently circulating are essential for the understanding of viral evolution and the development of measures to control its spread. In the present study, stool samples from 144 dogs were analysed by polymerase chain reaction (PCR) for CPV-2, and 29.2% (42/144) of them were positive. From the 42 positive strains, 71.4% (30) of the dogs had signs of haemorrhagic gastroenteritis. The sequencing of the 583 bp fragment of the VP2 gene from the positive strains identified 78.6% (33/42) of them as type 2c, 19% (8/42) as type 2b and 2.4% (1/42) as type 2a. A phylogenetic analysis of the variants circulating in the canine population of Brazil showed that they are very similar to those found in other countries and type 2c has become the predominant type circulating in Brazil.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Treatment of gastrointestinal diseases comprises a large part of small animal medicine, in which typical clinical signs are vomiting and diarrhoea that can lead to death of the animal (Sellon, 2005). Among the main viruses that cause diarrhea are the canine parvovirus-2 (CPV-2), canine enteric coronavirus (CCoV), canine rotavirus (CRV) and canine distemper virus (CDV) (Hoskins, 1997; Tams, 2003). Since the late 1970s, the CPV-2 strain has been known to be a major etiologic agent of infectious gastroenteritis in young dogs (Appel et al., 1979; Morais and Costa, 2007). Thus, canine parvovirus, which occurs with high frequency and endures for long periods of time in the environment, has stood out among other diseases because it results in high rates of morbidity and mortality (Hoskins, 1997). CPV-2 was first isolated in 1978, and since then, it has given rise to new antigenic types that have spread in the dog population (Appel et al., 1979; Morais and Costa, 2007). Over time, the original CPV-2 has been replaced by its antigenic variants, CPV-2a and CPV-2b (Decaro et al., 2008). A strain with an amino acid change, (Asp) – 426 to (Glu) – 426, in an important antigenic site was recognised in Italy in 2000 and was named

CPV-2c (Buonavoglia et al., 2001). Subsequently, this strain was identified in Vietnam (Nakamura et al., 2004) and Spain (Decaro et al., 2006). In South America, this new type was first reported in Uruguay (Pérez et al., 2007), followed by Brazil (Streck et al., 2009) and Argentina (Calderón et al., 2009). The identification and monitoring of the types of CPV-2 circulating in the canine population are important in the understanding of viral evolution and the development of measures to control its spread. The present study aimed to detect the presence and characterise the types of CPV-2 circulating in Brazil between the years 2008 and 2010.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The analysis was performed on 144 samples of dog faeces collected in 20 districts of six Brazilian states from April 2008 to July 2010. These animals, which were aged between 1 month and 1 year, included animals with or without symptoms of haemorrhagic gastroenteritis (HGE), animals with or without a vaccination history and animals from different breeds and both genders.

2.2. DNA extraction

The stool samples were diluted to 20% (w/v) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). The solution was frozen and thawed

* Corresponding author at: Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 91.540-000, Brazil. Tel.: +55 51 33086926; fax: +55 51 33087325.

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br (C.W. Canal).

three times and then centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min. DNA was extracted from the supernatant using a commercial kit based on guanidine isothiocyanate and silica (Biotechnology Simbios, Canoas-RS, Brazil) as described by Boom et al. (1990) and stored at -20°C until use. A commercial vaccine was used as a positive control and distilled water was used as a negative control.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR)

We amplified 583 bp of the VP2 gene (position 4003–4585) using the protocol described by Buonavoglia et al. (2001). The PCR products were electrophoresed in 2% agarose gels, visualised under UV light and compared with a 100 bp molecular weight ladder (Fermentas, USA).

2.4. Sequencing of the amplification products

The amplification products were purified using GFX PCR DNA and gel band purification (Amersham Bioscience, USA) and sequenced by using the Abi-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The alignment and analysis were interpreted using the Clustal method with the BioEdit 7.0.0 software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The sequences were submitted to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the accession numbers are shown in Table 1.

2.5. Phylogenetic analysis

For the phylogenetic analysis, 28 CPV-2 sequences from 14 countries were retrieved from GenBank. Two Brazilian sequences (DQ340434 and DQ340409) (Pereira et al., 2000) and a sequence of feline panleukopenia virus (AB054225), representing the out group, were also included. The Bayesian inference (BI) of phylogeny was performed using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). The substitution model for BI analyses was found using MrMODELTEST (Nylander, 2002) with the AIC criterion. Four Markov chains, one cold and three heated, were run for 2×10^6 generations, trees were strained every 100 generations and those generated prior to stationary were discarded as “burn-in”. The posterior probability values for all clades in the final majority rule consensus tree are reported. The support values shown along each branch are Bayesian posterior probabilities (Nodal support values <50% not shown).

Samples were assigned to one CPV-2 type based in the presence of a deduced asparagine (2a), aspartic acid (2b) or a glutamic acid (2c) in the amino acid position 426 (Buonavoglia et al., 2000).

3. Results

Of the 144 stool samples analysed by PCR, 29.2% (42/144) were positive for CPV-2 (Table 1). Amplification of the partial VP2 gene displayed a single band with the expected 583 bp. Of the dogs examined, 38.8% had haemorrhagic gastroenteritis (HGE), but from the 42 positive samples, 71.4% displayed signs of HGE (Table 2). From Rio Grande do Sul, 111 samples were analysed, which were from the municipalities of Porto Alegre, Viamão, Cachoeirinha, Taquara, Canoas, Caxias do Sul, Passo Fundo, Bagé, Glorinha, Gravataí, Santana do Livramento, Lavras do Sul, Novo Hamburgo, Rio Pardo and São Francisco de Paula. The states of Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) and Rondônia (RO) had a total of 33 samples that resulted in nine CPV-2-positive samples. Sequencing the amplification product from the 42 positive samples allowed us to identify nucleotide mutations, although the majority were silent (Table 1). It was possible to identify 78.6% (33/42) of the samples as type 2c, 19% (8/42) as type 2b and 2.4% (1/42) as type 2a. From the positive animals, 33.3% (14/42) were aged less than 2 months, 47.6% (20/42) had no vaccination history and the 6

animals with a complete immunisation schedule were positive for CPV-2c. Regarding breed, 11 mixed breeds, 6 German Shepherds and 3 Rottweilers were CPV-2c positive and their ages ranged from 2 to 10 months.

In general, the BI and NJ trees (not shown here) were different because many possible topological resolutions were found, with weak support. Salient features of all trees included that (a) CPV-2 Brazilian variants can be considered to be cosmopolitan, with similar variants in South America, Europe, Africa and Asia and (b) no clear geographic structure was found showing that CPV-2 variants are widely dispersed along the studied area. The BI tree (Fig. 1) showed that the CPV-2 Brazilian variants have clustered into different groups.

4. Discussion

Since its emergence in the late 1970s, parvovirus has caused high rates of morbidity and mortality, but the severity was initially attributed to a lack of natural immunity in the canine population against the virus. Therefore, dog vaccination and natural exposure to infection should have improved protection; however, a high incidence of disease continues in animals aged between 6 weeks and 6 months (Morais and Costa, 2007). This trend was confirmed by data found in the present study, in which 95.2% of the positive animals were between 1 and 6 months of age. Puppies are more prone to the development of haemorrhagic gastroenteritis caused by CPV-2, although dogs of any age, gender or breed may be affected (McCandlish, 1999; Morais and Costa, 2007; Parrish, 1999). From the 42 positive animals detected in the present study, 12 displayed no signs of HGE, showing that the clinical outcome may depend on the degree of maternal immunity, virulence of the virus strain, infectious virus dose and the host's immune system (Homem et al., 1999; Sellon, 2005; Tams, 2003).

It should be noted that in Brazil, canine parvovirus vaccines consist of live attenuated virus (CPV-2 and CPV-2b) and which, although it is rare, may be detected in the faeces of dogs (Decaro et al., 2007). However, the sequencing analyses of the CPV-2b described in the current study demonstrated that a point mutation at residue position 570 (A–G), which is characteristic of the CPV-2b vaccine strain, was not observed in the present sequences, confirming that the CPV-2b strains detected were not related to vaccination. These data corroborate previous reports that have demonstrated the high stability of the virulence attenuation of the strains used in current vaccines (Decaro et al., 2006).

German Shepherds and Rottweilers were among the breeds of dogs that were CPV positive. These two breeds, as well as other medium and large breeds, are more susceptible and can develop a more severe clinical picture when infected by CPV (Morais and Costa, 2007; Sellon, 2005). Interestingly, the six animals that had received a complete vaccination protocol were infected by the variant CPV-2c and displayed HGE, which resulted in death for one of them. These data corroborate previous findings in the United States and Uruguay (Kapil et al., 2007; Pérez et al., 2007), although it had been shown that vaccination would protect dogs exposed to CPV-2c (Spibey et al., 2008). However, in field situations, the vaccination protocol and maternal antibody titers are variable and may influence the appropriate response to the vaccine (Sellon, 2005).

The Brazilian CPV-2a strain contained the amino acid valine at position 555 of VP2, which has been described by Pérez et al. (2007). In the 1980s, CPV-2a strains from many countries displayed the amino acid valine in this position (Cavalli et al., 2008; Decaro et al., 2006). The Ile555Val change can be considered to be a reversion to the original CPV-2 (Martella et al., 2006; Pereira et al., 2007). Comparison of the CPV-2c strains from Europe and Uruguay with those found in Brazil revealed silent mutations in residue 461 (AG)

Table 1
Characteristics of the CPV-2 positive dogs in different locations in Brazil, describing the main differences in some nucleotides and amino acids.

Accession no.	Breed	Gender	Age	Vaccin. program	CPV-2 type	Position of the codon and amino acid									
						426	431	440	461	546	547	555	573		
FJ222821 VP2	56/00	-	-	-	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
EE375479 Uruguay	ST	NA	NA	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
DQ340409	NA	NA	NA	NA	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
DQ340434	NA	NA	NA	NA	2a	AAT(Asn)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
EU797726	Mo	M	5m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
EU797727	GS	F	4m	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
EU797728	Mo	F	NA	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
FJ236063	GS	F	3m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
FJ236064	P	F	2m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
FJ236065	NA	NA	2m	NA	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
FJ236066	NA	NA	2m	NA	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
FJ236067	NA	NA	6m	NA	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
FJ236068	NA	F	NA	NA	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796211	D	M	2m	NV	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796210	Mo	M	12m	NV	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796208	GS	M	2m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796209	GS	F	2m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
GQ395692	R	M	3m	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
GQ452297	Mo	F	3m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796207	S	F	2m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	ACA(Thr)	GTA(Val)	TTT(Phe)		
JF796206	BI	M	2m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	ACA(Thr)	GTA(Val)	TTT(Phe)		
JF796205	A	M	4m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796204	Mo	M	5m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796203	Mo	M	3m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796202	Mo	F	3m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796201	R	M	4m	NV	2c	GAA(Glu)	GTA(Val)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796200	Mo	M	4m	NV	2a	AAT(Asn)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796199	GS	M	4m	NV	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796198	R	M	6m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796197	Mo	M	3m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796196	Mo	F	4m	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796195	Mo	F	5m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796194	LR	M	4m	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796193	Mo	M	4m	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796192	P	F	2m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796191	GS	M	2m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796190	D	M	2m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796189	Mo	F	2m	NV	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796188	Y	M	4m	V	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796187	Mo	M	10m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796186	P	M	6m	V(I)	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796185	GR	M	1m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAC(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796184	S	F	3m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796183	Mo	M	2m	NV	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796182	GS	M	2m	V(I)	2c	GAA(Glu)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		
JF796181	Mo	F	4m	NV	2b	GAT(Asp)	CTA(Leu)	ACA(Thr)	CCA(Pro)	AAT(Asn)	CCA(Pro)	GTA(Val)	TAT(Tyr)		

F: female; M: male; m: month; Mo: Mongrel; GS: German Shepherd; GR: Golden Retriever; P: Pinscher; Y: Yorkshire; LR: Labrador Retriever; R: Rotweiler; A: Akita; D: Dachshund; BI: English Bulldog; Sch: Schnauzer; S: Shi-tzu; ST: Short Terrier; NA: not available; NV: not vaccinated; V(I): incomplete vaccination; V: vaccinated. In bold are the mutations found in the CPV-2 Brazilian sequences.

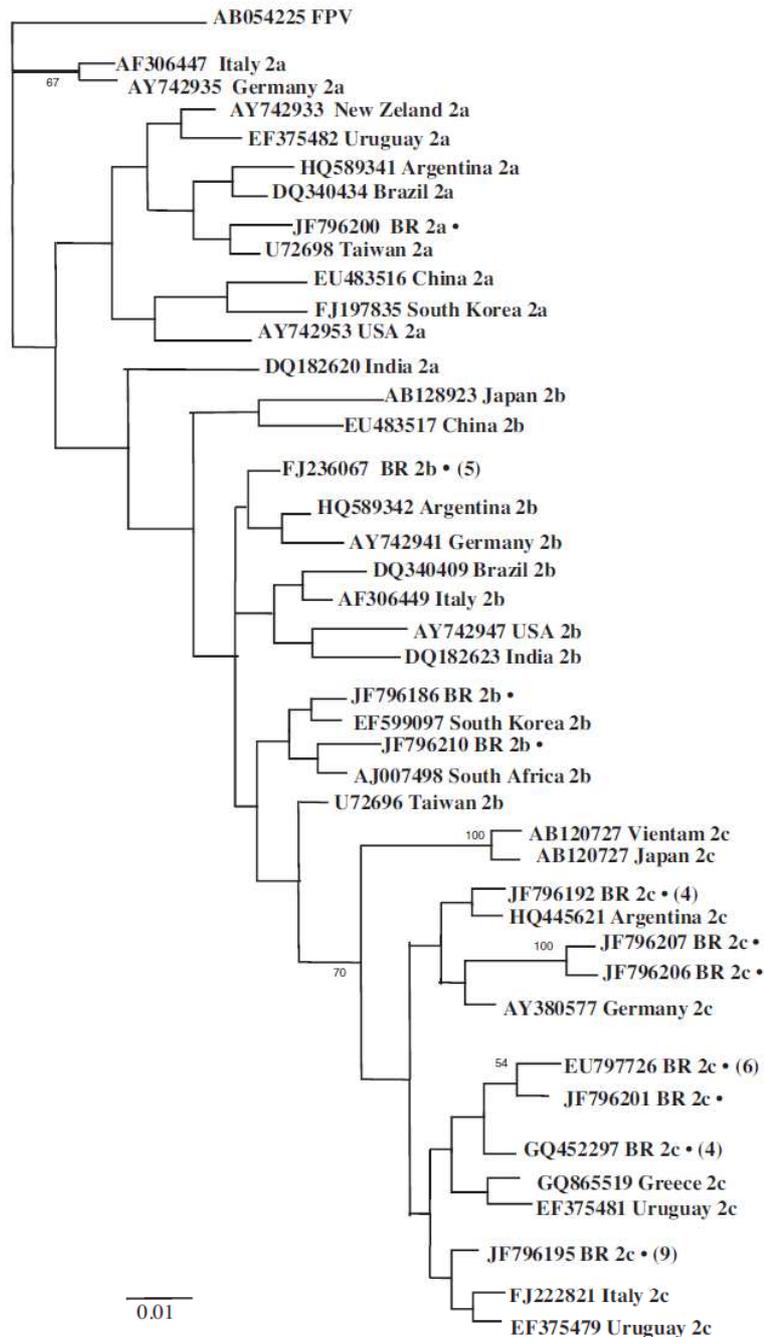


Fig. 1. Nucleotide phylogenetic tree based on the VP2 gene of CPV-2 strains circulating in Brazil between the years 2008 and 2010 (●) with 28 other worldwide CPV-2 variants. Principal bootstrap values are indicated. The values in parentheses indicate the number of strains with identical sequences to that included in the tree. (5): FJ236068, JF796199, JF796181, JF796189, JF796211; (4): JF796190, JF796193, JF796203, JF796198; (6): EU797728, JF796209, FJ236065, EU797727, FJ236066, FJ236063; (4): JF796197, GQ395692, JF796196, JF796184; (9): JF796204, JF796182, JF796202, JF796191, JF796205, JF796183, JF796194, JF796188, JF796187.

Table 2
Results of the analysis by PCR for CPV-2 from stool samples of dogs with and without haemorrhagic gastroenteritis (HGE).

	Positive by PCR	Negative by PCR	Total
Dogs with HGE	30	26	56
Dogs without HGE	12	76	88
Total	42	102	144

and 546 (CT) from eleven strains and amino acid mutations in two strains (Pro547Thr and Tyr573Phe). The Brazilian strains did not show the mutation at position 440 (TA) that had been previously described (Calderón et al., 2011; Decaro et al., 2009; Hong et al., 2007; Kapil et al., 2007). The CPV-2c was the main subtype detected in the Brazilian samples, as previously found in the United States (Hong et al., 2007), Uruguay (Pérez et al., 2007) and Argentina (Calderón et al., 2009). The detection of CPV-2c in Europe, Asia and the Americas is an indication of the worldwide spread of this new variant in the canine population (Decaro et al., 2006, 2007). Martella et al. (2005) indicated an increasing replacement of subtypes

CPV-2a and CPV-2b by CPV-2c that, from 2000 until 2004, increased from 17% to 60% of the samples in Italy. Pérez et al. (2007) suggested that the rapid spread of subtype 2c was likely associated with an important nucleotide substitution and might lead to the elimination of the other subtypes of CPV-2 over time. In other countries, such as India (Raj et al., 2010), Belgium and Italy (Decaro et al., 2009), the predominance of the type 2a strains has been verified. The CPV-2b has a more homogeneous distribution and has been detected in different Brazilian regions and in other European countries, such as France and the UK (Decaro et al., 2009; Pereira et al., 2000).

Phylogenetic analysis of the variants circulating in the canine population of some regions of Brazil has shown that they are very similar to those found in other countries and do not indicate a common geographical origin and are thus termed cosmopolitan. In contrast, mutations were detected in two amino acids (547 and 573) from sequences with the accession numbers JF796207 and JF796206, which were not reported in any other country.

The results of the present study demonstrate that 2c is the main CPV type that circulated in Brazil between the years 2008 and 2010, affecting puppies either with or without a complete vaccination protocol. Most of the positive samples, as identified by PCR, were from dogs with signs of haemorrhagic gastroenteritis. Phylogenetic analysis of the variants circulating in the canine population of Brazil shows that they are very similar to those from other countries in the Americas.

Conflict of interest statement

No conflicts of interest exist regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

We are thankful to Simbios Biotecnologia Ltda. for kindly supplying the DNA extraction kits. We thank the veterinarians who collected samples of dog faeces and the graduate and post graduate students of the Laboratório de Virologia for their collaboration in this work. Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Propesq/UFRGS.

References

- Appel, M.J.G., Cooper, B.J., Greisen, H., Scott, F.W., Carmichael, L.E., 1979. Canine viral enteritis. I. Status report on corona and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet.* 69, 123–133.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E., Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Buonavoglia, D., Cavalli, A., Pratelli, A., Martella, V., Greco, G., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2000. Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23, 93–96.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025.
- Calderón, M.G., Mattion, N., Bucafusco, D., Fogel, F., Remorini, P., La Torre, J., 2009. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: detection

- of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J. Virol. Methods* 159, 141–145.
- Calderón, M.G., Romanutti, C., D'Antuono, A., Keller, L., Mattion, N., Torre, J.L., 2011. Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV 2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res.* 157, 106–110.
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A.L., Palo, P., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C., 2008. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 534–539.
- Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., D'Aloja, D., Buonavoglia, C., 2006. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with hemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med.* 53, 468–472.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25, 1161–1166.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazz, A., Nardi, M., Buonavoglia, C., 2008. Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31, 125–130.
- Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2009. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 385, 5–10.
- Homem, V.S.F., Mendes, Y.G., Linhares, A.C., 1999. Gastroenterite canina-Agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51, 531–536.
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C., Saliki, J.T., 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 535–539.
- Hoskins, J.D., 1997. Update on canine parvoviral enteritis. *Vet. Med.* 92, 694–709.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston III, L., Campbell, G., Johnson, B., 2007. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs: 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4044–4047.
- Martella, V., Cavalli, A., Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Bozzo, G., Tarsitano, E., Buonavoglia, C., 2005. Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (12), 1243–1245.
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11–13.
- McCandlish, I.A.P., 1999. Infections specific canine. In: Dunn, J.K. (Ed.), *Textbook of Small Animal Medicine*. W.B. Saunders Company, London, pp. 915–920.
- Morais, M.P., Costa, P.R., 2007. Parvoviridae. In: Flores, E.F. (Ed.), *Virologia Veterinária*. Ed. da UFSM, Santa Maria, pp. 388–392.
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H.T., Nguyen, N.P., Huynh, L.M., Nguyen, L.T., Nguyen, P.N., Nguyen, P.V., Nguyen, N.P., Akashi, H., 2004. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261–2269.
- Nylander, J.A.A., 2002. MrModeltest v.1.0b. Program distributed by the author. <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>.
- Parrish, C.R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69, 29–40.
- Pereira, C.A.D., Monezi, T.A., Mehnert, U., D'Angelo, M., Durigon, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127–133.
- Pereira, C.A., Leal, E.S., Durigon, E.L., 2007. Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. *Infect. Genet. Evol.* 7, 399–409.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., 2007. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 124, 147–152.
- Raj, J.M., Mukhopadhyay, H.K., Thanissar, J., Antony, P.X., Pillai, R.M., 2010. Isolation, molecular, characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1237–1241.
- Sellon, R.K., 2005. Canine virus disease. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Veterinary Internal Medicine*, sixth ed. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 646–652.
- Spibey, N., Greenwood, N.M., Sutton, D., Chalmers, W.S.K., Tarpey, I., 2008. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* 128, 48–55.
- Strech, A.F., Souza, C.K., Gonçalves, K.R., Zang, L., Pinto, L.D., Canal, C.W., 2009. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 40, 465–469.
- Tams, T.R., 2003. *Handbook of Small Animal Gastroenterology*, second ed. Saunders Company, St. Louis.

3.2 Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil

Veterinary Microbiology

Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil

Luciane Dubina Pinto^a, Iracema Nunes de Barros^b, Renata da Fontoura Budaszewiski^a,
Matheus Nunes Weber^a, Helena Mata^a, Jéssica dos Reis Antunes^a, Fabiana Marques
Boabaid^c, Angélica Terezinha Barth Wouters^c, David Driemeier^c, Paulo Eduardo
Brandão^b, Cláudio Wageck Canal^a

^aLaboratory of Veterinary Virology, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre/RS, Brazil.

^bDepartment of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo/SP, Brazil.

^cDivision of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre/RS, Brazil.

Corresponding author. Tel.: +55 5133086926 Fax.: +55 5133087325 *E-mail address:*

lucianedubina@yahoo.com.br (L. Pinto)

Abstract

Detection and characterization of the canine coronavirus (CCoV) strains that are currently circulating are essential for the understanding of viral evolution and the development of measures to control its spread. In the present study, five puppies that died with diarrhea, vomiting, fever, decreased appetite and prostration. Organ samples were analyzed by Reverse Transcription followed by Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assays for the M and the S partial genes of CCoV and for the VP2 gene of canine parvovirus (CPV-2). Three dogs were positive for CCoV and CPV-2, one was positive only for CCoV and one only to CPV-2. Sequencing of the amplification products showed the strains were from the antigenic type CPV-2c and the CCoV were from the pantropic type (CCoV-IIa). The phylogenetic analysis of the CCoV-IIa circulating in the canine population of south Brazil indicated that they are similar to those found in other countries; however, they tend to group together in a single clade, suggesting a common ancestor. Can be concluded that the clinical signs and lesions are very similar to those caused by CPV-2 and is necessary to include CCoV in the differential diagnosis of CPV-2. This is the first report of pantropic CCoV-II in puppies from Latin America.

Keywords: dogs, coronavirus, pantropic, genotyping

1. Introduction

Canine coronavirus (CCoV) belongs to the family *Coronaviridae*, being recently classified as a member of the genus *Alphacoronavirus*, species *Alphacoronavirus 1* (Carstens, 2010). CCoV has a genome that ranges from 27 kb to 31 kb of single-stranded RNA, consisting of two large open reading frames (ORFs), which encode four structural proteins (spike (S), membrane (M), envelope (E) and nucleocapsid (N)) and five nonstructural proteins (3a, 3b, 3c, 7a and 7b) (Decaro and Buonavoglia, 2008). Coronavirus infection is characterized by high morbidity and low mortality, and its transmission occurs via the fecal-oral route (Tennant et al., 1991). Studies have demonstrated that it is a ubiquitous disease, infecting mainly dogs in kennels and shelters (Rimmelzwaan et al., 1991; Tennant et al., 1993; Bandai et al., 1999; Naylor et al., 2001; Yesilbag et al., 2004; Schulz et al., 2008, Ntafis et al., 2010). CCoV was limited to the gastrointestinal tract, causing vomiting, diarrhea, dehydration, loss of appetite and, in some cases, death, especially when coinfections with canine parvovirus (CPV-2), canine adenovirus type 1 (CAV-1) and canine distemper virus (CDV) were present (Decaro et al., 2004; 2006; 2007a, 2007b). Even though systemic infection by CCoV was not observed, Tennant et al. (1991) isolated the virus from some organs in experimental infections. Currently, CCoV can be grouped into two genotypes: CCoV type 1 (CCoV-I) and CCoV type 2 (CCoV-II) (Decaro and Buonavoglia, 2008). CCoV-II was detected after an outbreak of severe clinical disease in puppies (Buonavoglia et al., 2006). The virus was detected in the feces and in several parenchymatous organs, and was isolated in cell culture and inoculated into specific pathogen-free (SPF) dogs, reproducing the disease. These dogs eventually died, confirming the virulence of this new type of CCoV. Recently, CCoV-II, known as pantropic, was classified into two subtypes, CCoV-IIa and CCoV-IIb, the latter of which derives from a recombination

with TGEV (Decaro et al., 2009; 2010). The CCoV-IIb subtype was found in organs, but was not associated with systemic disease in dogs (Decaro et al., 2009; Ntafis et al., 2011). Currently available vaccines do not contain these new subtypes in their formula, which would be necessary for further protection (Decaro et al. 2010). The development of a more virulent pantropic CCoV (subtype IIa), detection, identification and monitoring of these new agents is of paramount importance in the clinical diagnosis of dogs, chiefly for the differential diagnosis of CPV-2, whose clinical symptoms are quite similar. The aim of the present paper was to provide the pathological and phylogenetic characterization of coronaviruses detected in organs of dogs that had presented with gastroenteritis symptoms and eventually died.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Five dogs which eventually died at the Clinical Veterinary Hospital of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, southern Brazil, between June and September 2011, were necropsied at the hospital's Division of Pathology. The animals were aged 1 to 6 months, were of different breeds, both male and female, with or without history of vaccination. Twenty samples were collected from different organs of each dog, totaling 100 biological samples, which were identified separately and stored at -80°C. The stool samples were diluted to 20% (w/v) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). The solution was frozen and thawed three times and then centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min before nucleic acid extraction. A commercial vaccine was used as a positive control and distilled water was used as a negative control.

2.2. Identification of other gastrointestinal viruses

The stool suspensions were used for identification of other gastrointestinal viruses, as previously described by PCR: CPV-2 (Buonavoglia et al., 2001) and canine adenovirus types 1 and 2 (CAV-1 and CAV-2) (Hu et al., 2001) or by RT-PCR: canine distemper virus (CDV) (Frisk et al., 1999); and canine rotavirus (CRV) (Gouvea et al., 1990).

2.3. RNA extraction and reverse transcription (RT-PCR)

The organs were crushed separately, centrifuged at 5000 x g for 15 min., and the supernatant was stored at -80°C. The total RNA was extracted from the supernatants of organs or stool samples using TRIzol[®] LS (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out immediately after extraction using Superscript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). The reactions were standardized to a final volume of 20 µL and incubated for 5 minutes at 65°C followed by a one-hour cycle at 55°C and 15 minutes at 72°C.

2.4. DNA extraction

DNA was extracted from the supernatant of the stool suspension using a commercial kit based on guanidine isothiocyanate and silica (Simbios Biotecnologia, Canoas-RS, Brazil), as described by Boom et al. (1990), and stored at -20° C until use.

2.5. PCR for partial amplification of the M gene of CCoV

CCoV1 and CCoV2 primer pairs were used for the partial amplification of the M gene (409 bp), as described by Herrewegh et al. (1998).

2.6. PCR for partial amplification of the S gene of CCoV region 3'

EL1F, EL1R and S5, S6 primer pairs were used for differentiation between CCoV-I (346 bp) and CCoV-II (694 bp), respectively (Pratelli et al., 2004).

2.7. PCR specific to CCoV-IIa and CCoV-IIb

PCR specific to CCoV (CCoV-IIa) and TGEV-like (CCoV-IIb) were performed taking advantage of the large diversity of the 5'end region of the S gene. The following primer pairs were used in two different reactions: CCoV-IIaF, CCoV-IIaR and CCoV-IIbF CCoV-IIbR, which yielded amplification products of 758 bp and 499 bp, respectively (Decaro et al., 2010).

2.8. Sequencing and phylogenetic analysis

The PCR products were electrophoresed in 2% agarose gels, visualized under UV light and compared with a 100 bp molecular weight ladder (Fermentas, USA). They were purified using GFX PCR DNA and gel band purification (Amersham Bioscience, USA) and sequenced by using the Abi-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Sequence traces were visually checked and manually edited using Bioedit 6.0.7 (HALL, 1999). The sequences were submitted to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

In order to identify homologous sequences to those found in this study, MegaBLAST searches were performed in the nucleotide collection (nr/nt) database using the NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) in January, 2013. To perform the phylogenetic analyses, sequences with multiple homologies were selected based on the best-scoring homology. Sequences were aligned using the Clustal W 2.1 program (Thompson et al, 1994).

To reconstruct phylogenies, three different strategies were implemented by using three different datasets. First, to identify and to characterize the CCoV sequences, we used an alignment of 16 sequences based on 332 bp from the M gene (transmembrane protein). This alignment included reference sequences of different strains of *Alphacoronavirus* and similar sequences recovered during the MegaBLAST searches. Second, to further characterize CCoV strains, we constructed an alignment of 16 sequences using a 569-bp fragment of the 3'-end region of the S gene. Third, also to characterize the pantropic CCoV strains, we used a dataset containing a 938-bp fragment of the spike gene (369 bp of the 5-end region plus 569 bp of the 3'-end region) which maximized the number of molecular characters, but minimized the number of sequences (n=9) due to the high variability of the 5'-end region. In all datasets, saturation was evaluated by plotting transitions and transversions against *p*-distance using DAMBE 5.2.18 (Xia and Xie, 2001).

The maximum likelihood (ML) trees were constructed using PhyML v. 3.0 (Guindon et al., 2010), incorporating 1,000 bootstrap replicates to evaluate branch support. The best substitution models were estimated using JModeltest v.0.1.1 (Posada, 2008) for the nucleotide dataset and ProtTest v. 2.4 (Abascal, 2005) for the amino acid dataset, both with the Akaike information criterion (AIC). For Bayesian inference, we selected substitution models according to the AIC using MrModeltest (Nylander, 2002) for the nucleotide datasets and a prior setting allowing model jumping between fixed-rate amino acid models for amino acid datasets. Each Bayesian analysis involved two independent runs, each consisting of one million generations of Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling with one cold and three heated chains; samples were taken every 100 generations, and we discarded trees from the first 250,000 generations as burn-in. Plots of likelihood scores against the generation number

indicated that analyses reached stationary distributions, and convergence diagnostics implemented in MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) indicated that the independent runs converged on the same posterior distribution. Based on the post burn-in samples of trees, we calculated majority-rule consensus trees for each dataset, and assessed branch support based on posterior probability values. Due to the absence of outgroups in the datasets, all trees were midpoint rooted.

3. Results

3.1. Clinical signs and gross pathology

On clinical examination, these animals presented with haemorrhagic gastroenteritis (HGE), vomiting, fever, loss of appetite and prostration. At necropsy, the dogs had similar lesions, which consisted of rough and thick small intestinal mucosa, submucosal edema and evidencing of Peyer's patches. Other findings included enlarged mesenteric lymph nodes and non-collapsed lungs of diffuse reddish color with a shining surface, with mild to moderate flow of frothy fluid from the cut surface. Microscopic findings indicated necrotic enteritis, with atrophy and fusion of microvilli; there was edema and congestion of mesenteric lymph nodes; and mild to moderate edema and diffuse congestion were observed in the lungs. Bone marrow depletion occurred in all animals, as well as necrosis of lymphoid and myeloid cell lines.

3.2. PCR analysis for CCoV-II and CPV-2

Of the five dogs tested, three were positive for CCoV-II and three were positive for CPV-2 (Table 1). The results for the presence of CCoV-II in the organs are shown in Table 2. The partial amplification of region 5' of the S gene (CCoV-II) and of the VP2

gene (CPV-2) and later sequencing allowed identifying the presence of (pantropic) CCoV-IIa and CPV-2c. One dog was negative for all viruses tested, and those dogs that were positive for CCoV-II and/or CPV-2 were negative for CDV, CRV, CAV-1 and CAV-2. The nucleotide sequences of the analyzed pantropic Brazilian strains were deposited in GenBank under accession numbers for the M gene (JX442376, JX442377, JX442378) and for the 3'-end region of the S gene (JX983596, JX446572, JX446573) and for the 5'-end region of the S gene (KC138238, KC138237, KC138236).

Table 1. Results for the partial amplification by PCR of M and 5'end S genes (CCoV-IIa) and VP2 (CPV-2), in dog feces.

Dogs	1	2	3	4	5
CCoV-IIa	-	+	-	+	+
CPV-2	-	+	+	+	-

Table 2. Results for the partial amplification by PCR of the S gene in the 5-end region for CCoV-IIa in organ samples.

Organs	Dog 2	Dog 4	Dog 5
	CCoV-IIa	CCoV-IIa	CCoV-IIa
cerebellum	+	+	-
brain	+	+	+
brain bulb	-	-	-
heart	+	+	-

lung	+	+	+
thymus	-	+	+
tongue	+	+	+
tonsils	-	+	-
spleen	+	+	+
bladder	+	+	+
kidney	+	+	+
pancreas	-	+	+
liver	+	+	+
mesenteric lymph node	+	+	+
retropharyngeal lymph node	+	+	-
bone marrow	+	-	-
duodenum	+	-	+
jejunum	+	+	+
colon	+	+	+
rectum	+	+	+

3.3. Phylogenetic analyses

The MegaBLAST searches in the nr/nt database, using the fragment of the M gene from Brazilian dogs as query, yielded very similar sequences to CCoV-II (e.g. GU300127) presenting 98-97% of identity over 330 bp and *e*-values close to zero. Similar levels of identity with CCoV-II (96-95% covering 100% of the query sequences) as well as *e*-values close to zero were observed in MegaBLAST searches when we used fragments of the 5' end and 3' end regions of the S gene.

Plots of pairwise divergence did not show evidence of saturation in the datasets, except in the 3'-end fragment of the S gene, which exhibited saturation of substitutions due to the presence of very divergent AY307020 and EU186072. However, results of the ML and Bayesian analyses in which AY307020 and EU186072 were excluded (Figure 1B) were very similar to those in which these taxa were included (Figure 1A), indicating that saturation did compromise the phylogenetic analyses. Additionally, the phylogenies based on amino acid sequences containing AY307020 and EU186072 sequences concur with those shown in Figure 1, presenting the same topological resolution (trees not shown).

Phylogenetic trees obtained using different datasets and estimated by different methods indicated a close relationship between the Brazilian samples and CCoV-II related group (Fig1 and Fig 2A). The phylogenetic analyses based on nucleotide sequence of the M gene grouped the Brazilian pantropic samples isolated in Rio Grande do Sul state (southern Brazil) with GU300127, identified from a dog in São Paulo state (southeastern Brazil) in both ML and BI analyses with moderate to high statistical support (Fig 1). However, the position of this clade within the CCoV-II group could not be solved reliably. In fact, the similarity between the pantropic samples from southern Brazil and GU300127 ranges between 95.5 and 98.6%, being very similar to those found for the comparison with reference samples AY704916 (Germany) (94.4-96.7%) and DQ112226 (Italy) (93.7-95.2%).

The phylogenies based on the 3' end region of the S gene using different datasets and methods grouped the Brazilian samples into a principal group with CCoV-IIa, FCoV-II and TGEV with moderate to high support. However, the relationships within this group are not fully resolved. Analysis using the concatenated fragment of the S gene (5' end plus 3' end) also supported this principal group and clustered the Brazilian

samples into a highly supported monophyletic clade in all analyses. The phylogeny also suggests a sister-group relationship between the Brazilian samples and the group composed of JQ404410, FCoV-II X80799, and NC002306.

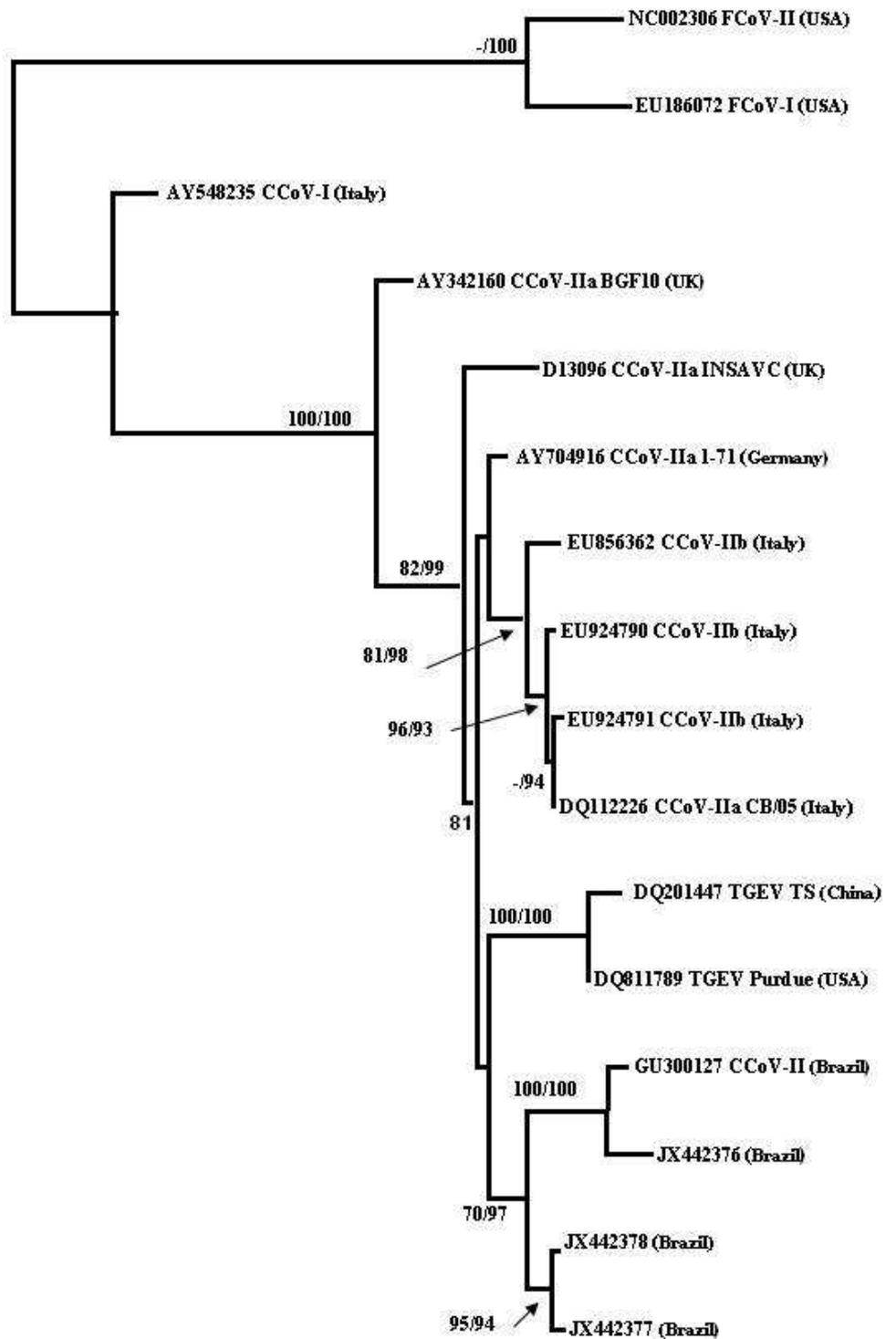
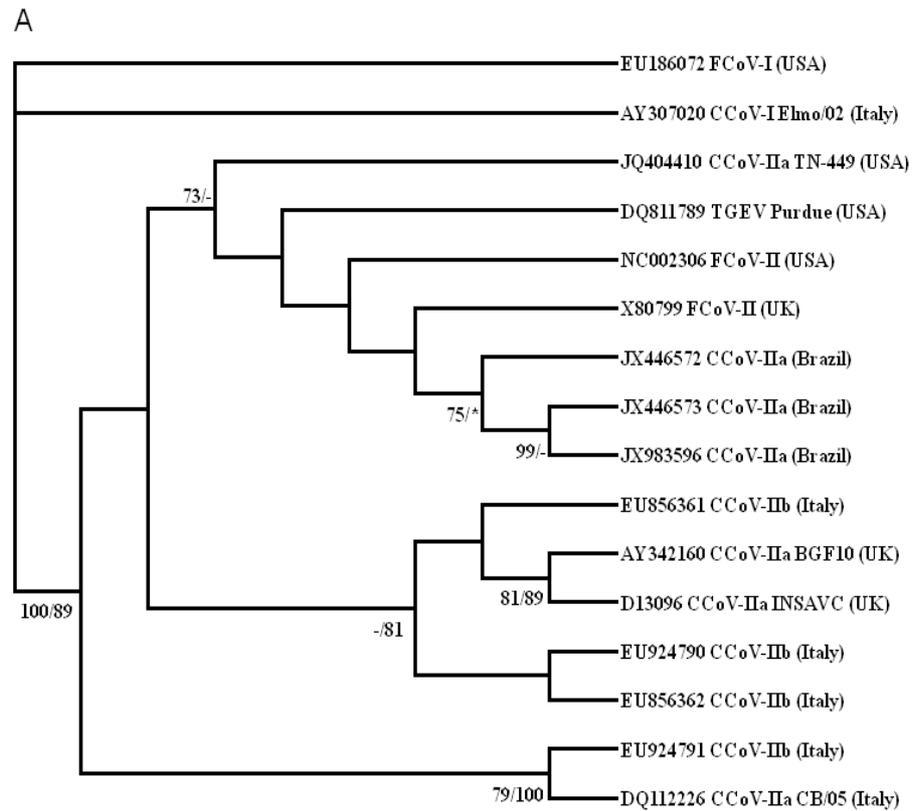


Figure 1. ML tree showing the relationships between CCoV strains based on a 332 bp fragment of the M gene using the TIM2+G model. Nodal support values (<0.7 posterior probability or <70% bootstrap not shown) are indicated for ML and BI methods, respectively. (–) indicates values <70%.



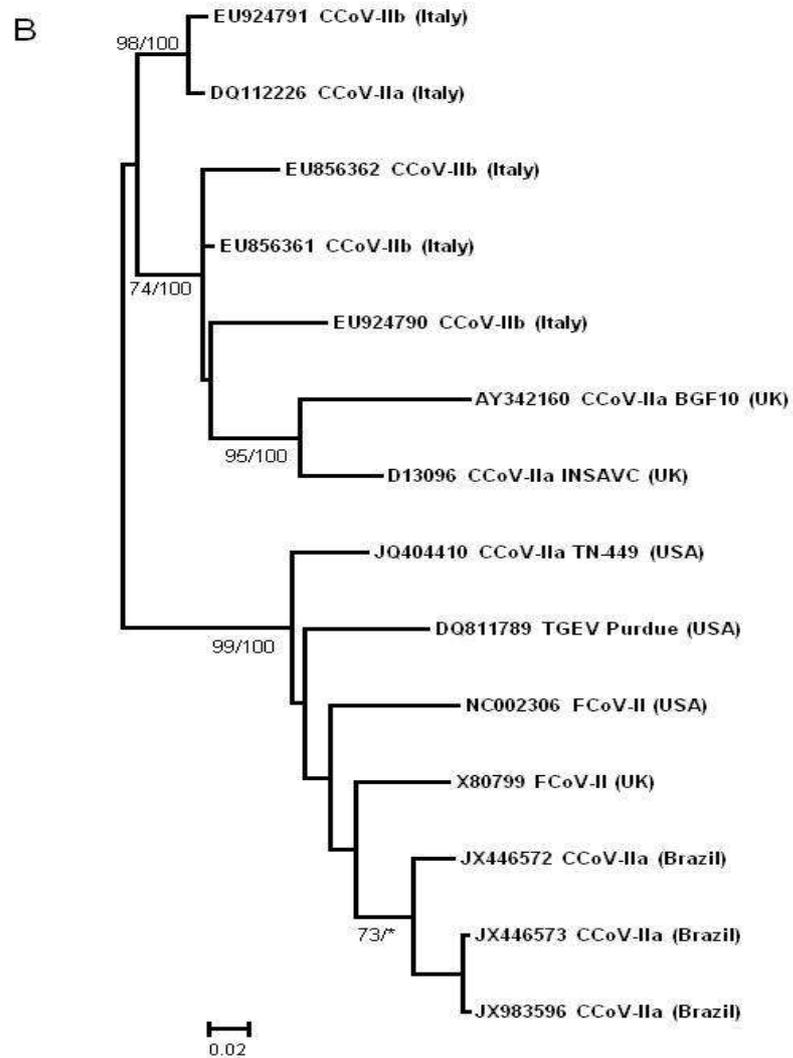


Figure 2. A) ML tree based on a 569 bp fragment from the 3' end region of the S gene and on the TIM2+I+G model. The topology shows the relationships between 16 CCoV strains. B) ML tree based on a 569 bp fragment from the 3' end region of the S gene and on the TRN+I+G model using 14 CCoV strains. Nodal support values (<0.7 posterior probability or <70% bootstrap not shown) are indicated for ML and BI methods, respectively. (–) indicates values <70% while (*) stands for different resolution in BI analysis.

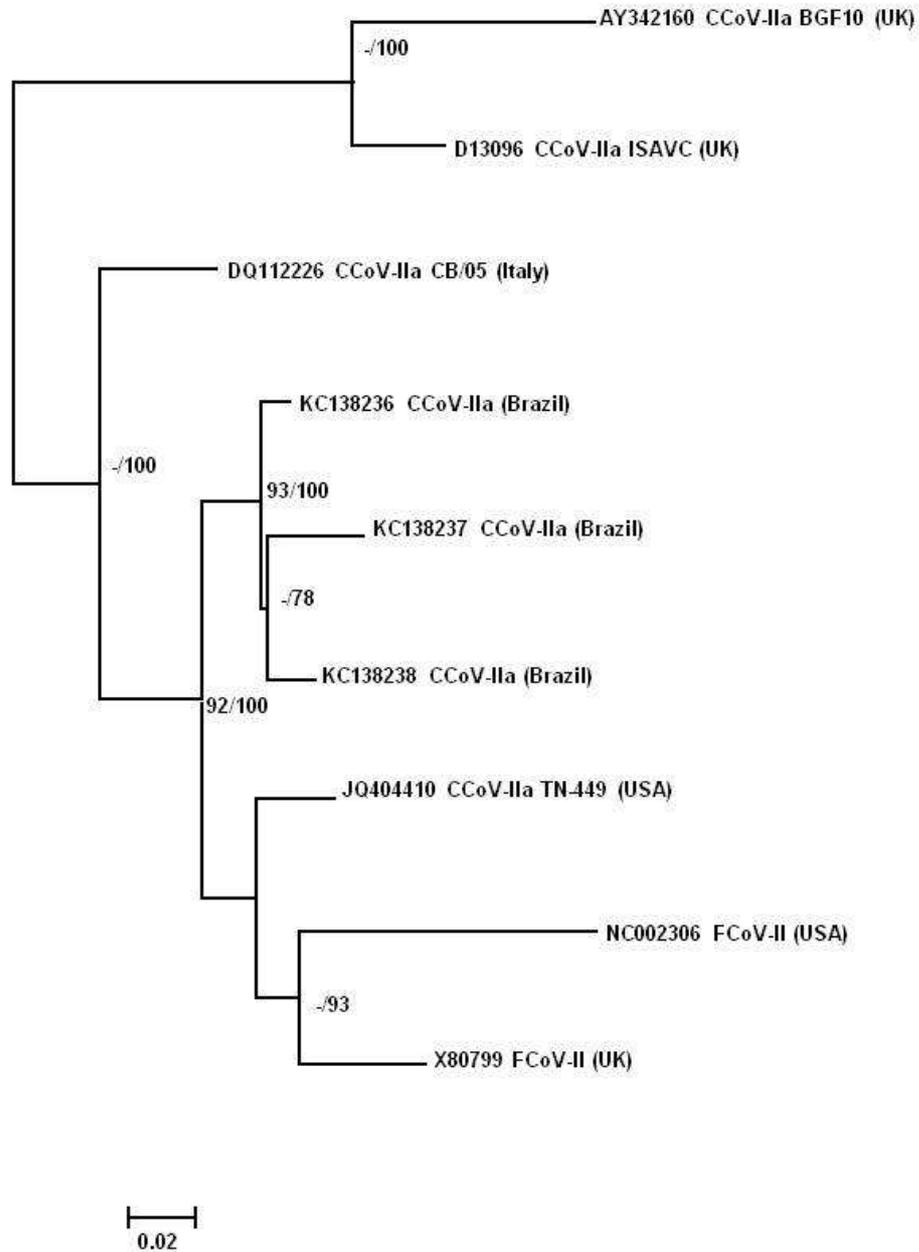


Figure 3. ML tree showing the relationships between 9 CCoV strains based on a 938 bp fragment of the S gene (5' end plus 3' end combined dataset) and on the TIM3+G model. Nodal support values (<0.7 posterior probability or <70% bootstrap not shown) are indicated for ML and BI methods, respectively. (–) indicates values <70%.

In the partial sequencing of the M gene, Brazilian samples, compared with reference samples, had amino acid mutations in some residues, as shown in Table 3.

Table 3. Amino acid differences between Brazilian and reference samples of the partial M gene.

Samples//aa position	123	127	187	212	223	243	246
D13096 CCoV-IIa (UK)	Thr	Ile	Cys	Val	Lys	Tyr	Asp
AY342160 CCoV-IIa (UK)	Ile	Ile	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Asp
DQ112226 CCoV-IIa (Italy)	Ile	Ile	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Asp
EU924790 CCoV-IIb (Italy)	Ile	Ile	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Asp
GU300127 (Brazil)	Ile	Val	Tyr	Ser	Gln		
JX442376 (Dog 2) (Brazil)	Ile	Val	Tyr	Ser	Gln	Asn	Glu
JX442377 (Dog 4) (Brazil)	Ile	Val	Tyr	Ser	Lys	Asn	Glu
JX442378 (Dog 5) (Brazil)	Ile	Val	Tyr	Ser	Lys	Asn	Glu
NC002306 FCoV-II (USA)	Val	Ala	Tyr	Ser	Gln		
Recombitek TM		Ile	Tyr	Ser	Lys		

Inside the parentheses is the identification the number of dog and the country of origin. RecombitekTM is a commercial vaccine.

As to the 5' end region of the S gene, there were amino acid mutations in some residues, as shown in Table 4.

Table 4. Amino acid differences between Brazilian and reference samples of the partial S gene the 5'end region.

Samples//aa	5	20	21	34	38	54	72	78	125
DQ112226 CCoV-IIa (Italy)	Leu	Thr	Thr	Asp	Asn	Val	Ala	Glu	Asn
JQ404410 (CCoV-IIa) (USA)	Val	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Gln	Asp
KC138238 (Dog 2) (Brazil)	Glu	Thr	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ala	Glu	Asp
KC138237 (Dog 4) (Brazil)	Val	Thr	Thr	Pro	Tyr	Val	Arg	Glu	Asp
KC138236 (Dog 5) (Brazil)	Val	Met	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Glu	Asp
NC002306 FCoV-II (USA)	Val	Thr	Thr	Ala	Asn	Val	Ala	Gln	Asp

The number in parentheses is the identification of the dog in the present work and its country of origin.

4. Discussion

Coronavirus infection is a ubiquitous endemic disease with high morbidity and mortality in puppies (Zappulli et al., 2008), and it is extremely contagious, especially in kennels and shelters; in addition, its prevalence is significantly higher than in dogs housed separately (Carmichael and Binn, 1981). Genome recombinations of different coronavirus species is an important way to prevent host immunity, which may occur due to the close relationship with domestic species (Herrewegh et al., 1998). CCoV can be found in coinfections with bacteria, parasites, or other viruses such as the canine adenovirus (CAV) or canine parvovirus (CPV) (Pratelli et al. 2001). Coinfections may be confirmed by the data provided in the present study, as occurred with dogs 2 and 4, whose PCR was positive for CCoV and CPV. Zicola et al. (2012) reported coinfection with CPV-2c in an outbreak of coronavirus infection among French and Belgian dogs, which had symptoms that were characteristic of both infections, leading to their deaths. In Greece and Ireland, coinfections by CCoV-II/CPV-2a and CCoV-I/CPV-2b were

described for puppies aged up to three months (Ntafis et al., 2010; McElligott et al., 2011). In western European countries, 28 out of 156 dogs had coinfection by these two agents (Decaro et al., 2009). Dogs that presented with intestinal lesions at necropsy, which are characteristic of CPV, were actually positive for CCoV (Evermann et al., 2005). The same happened in our study, in which dog 5 died from CPV-characteristic symptoms; however, the PCR only detected CCoV. This highlights the importance of a differential diagnosis between these two viral diseases. Deaths caused by pantropic CCoV were first observed in Italy (Buonavoglia et al., 2006), Greece (Ntafis et al., 2011), France, and Belgium (Zicola et al., 2012). In Latin America, this was the first report of pantropic CCoV in puppies, with or without association with CPV. The feces and several organs (e.g., lungs, spleen, kidneys, pancreas, heart, liver, intestine, and brain) of these animals were positive for CCoV, corroborating the data published by Buonavoglia et al. (2006), Zappulli et al. (2008), Ntafis et al. (2011), Decaro et al. (2012), and Zicola et al. (2012). The clinical symptoms of these dogs were similar to those found by Buonavoglia et al. (2006) and Zappulli et al. (2008); however, these authors reported neurological symptoms that were not observed in our dogs. On the postmortem examination, gross lesions showed edema and congestion in the intestine, lungs and kidneys and enlarged mesenteric lymph nodes, which were similar to, but not so severe as, those found by Zappulli et al. (2008) and Ntafis et al. (2011), who observed areas with lung consolidation and emphysema, abdominal cavity with bloody fluid, multifocal infarctions in the renal cortex, friable liver with enlarged volume, and venous congestion in the cerebral dura mater. The microscopic lesions in the organs detected by Zappulli et al. (2008) and Decaro and Buonavoglia (2011) were also observed in our study. An important finding was bone marrow depletion and necrosis, which was confirmed in the three dogs coinfecting by CCoV-IIa and CPV-2c, and also

observed in dog 5, which was positive only for CCoV-IIa. These lesions are common in cases of CPV-2 (Appel and Parrish, 1987), causing the death of the animals, as immunological protection is severely compromised by lymphocyte depletion. These lesions of bone marrow are not usually described in infections by pantropic CCoV, but they were observed in all dogs in our study. The pantropic CCoV-II was confirmed by the presence of gross lesions in the internal organs of the dead dogs, as well as by the detection of viral RNA in those tissues, including brains.

The phylogenetic analysis of circulating subtypes affecting dogs in southern Brazil showed that they are similar to those found in other countries. Nonetheless, the Brazilian samples tend to group into a single clade, suggesting a common ancestral. However, studies focusing on pantropic CCoV in greater depth are necessary to confirm whether these samples are a monophyletic group.

The mutation detected by Buonavoglia et al. (2006) in amino acid 125 of the 5'end region of the S gene (D125N), in two Italian reference strains, was not observed in our analysis, suggesting that this mutation might not influence viral pathogenicity. This finding is in line with that of other studies that suggest that there is no genetic signature capable of detecting pantropic strains (Decaro et al., 2012). Note that, as far as amino acid 127 of the M gene is concerned, dogs in the present study were infected by a field virus, since, according to the molecular analysis, the samples show a variation in amino acids that is not compatible with the vaccine strain (I127V). With the development of pantropic CCoV, and due to the increase in their virulence (subtype IIa), detection, identification and monitoring of these new agents in the canine population is of utmost importance in clinical veterinary practice.

5. Conclusion

The results of this study demonstrated that the CCoV-IIa, named as pantropic, was the main subtype detected in bodies of puppies, which came to death with clinical suspicion of CPV-2, suggesting the inclusion of differential diagnosis between these two agents. At necropsy, the lesions found in the digestive tract, highly suggestive of infection by CPV-2, were both found in infected dogs only with CCoV-IIa, as those with CPV-2 co-infection and CCoV-IIa. By sequencing, it was confirmed the subtype CCoV-IIa and the antigenic variant CPV-2c, this being the first reported the detection of pantropic CCoV-IIa in puppies dogs in Brazil. Phylogenetic analysis of CCoV-IIa, the canine population in southern Brazil, shows that they are grouped in one clade, suggesting a common ancestor, evidencing a similarity with samples from other countries.

Acknowledgments

We are thankful to Simbios Biotecnologia Ltda. for kindly supplying the DNA extraction kits. We thank the veterinarians who collected samples from the dogs and the undergraduate and graduate students of the Laboratory of Virology for their collaboration in this work. Financial support was provided by CNPq, FAPERGS, and Propesq/UFRGS.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Appel, M.J.G., Parrish, C.R., 1987. Canine parvovirus type 2. In: Appel, M.J.G. (Ed.), *Virus Infections of Carnivores*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 69–92.
- Bandai, C., Ishiguro, S., Masuya, N., Hohdatsu, T., Mochizuki, M., 1999. Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 731–736.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E., Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Buonavoglia, C., Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Castagnaro, M., Tempesta, M., 2006. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 492–494.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025.

- Carmichael, L.E., Binn, L.N., 1981. New enteric viruses in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25, 1–37.
- Carstens, E.B., 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* 155, 133–146.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2008. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet. Microbiol.* 132, 221–234.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2011. Canine Coronavirus: Not Only an Enteric Pathogen. *Vet. Clin. N. Am-Small.* 41, 1121–1132.
- Decaro, N., Camero, M., Greco, G., Zizzo, N., Elia, G., Campolo, M., Pratelli, A., Buonavoglia, C., 2004. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 27, 177–181.
- Decaro, N., Campolo, M., Elia, G., Buonavoglia, D., Colaianni, M.L., Lorusso, A., Mari, V., Buonavoglia, C., 2007a. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. *Res. Vet. Sci.* 83, 269–273.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007b. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25, 1161–1166.
- Decaro, N., Mari, V., Campolo, M., Lorusso, A., Camero, M., Elia, G., Martella, V., Cordioli, P., Enjuanes, L., Buonavoglia, C., 2009. Recombinant canine coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *J. Virol.* 83, 1532–1537.
- Decaro, N., Mari, V., Elia, G., Addie, D.D., Camero, M., Lucente, M.S., Martella, V., Buonavoglia, C., 2010. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 41–47.

Decaro, N., Mari, V., Reitzenstein, M., Lucente, M.S., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., King, V.L., Di Bello, A., Varello, K., Zhang, S., Caramelli, M., Buonavoglia, C., 2012. A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05. *Vet. Microbiol.* 159, 239–244.

Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., D'Aloja, D., Buonavoglia, C., 2006. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 53, 468–472.

Evermann, J.F., Abbott, J.R., Han, S., 2005. Canine coronavirus associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 610–614.

Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634–3643.

Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276–282.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.

Herrewegh, A.A.P.M., Smeenk, I., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., Groot, R.J., 1998. Feline Coronavirus Type II Strains 79-1683 and 79-1146 Originate from a Double Recombination between Feline Coronavirus Type I and Canine Coronavirus. *J. Virol.* 72, 4508–4514.

- Hu, R.L., Huang, G., Qiu, W., Zhong, Z.H., Xia, X.Z., Yin, Z., 2001. Detection and Differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction. *Vet. Res. Comm.* 25, 77–84.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- McElligott, S., Collins, P.J., Sleator, R.D., Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., O’Shea, H., 2011. Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. *Arch. Virol.* 156, 495–503.
- Naylor, M.J., Harrison, G.A., Monckton, R.P., Mcorist, S., Lehrbach, P.R., Deane, E.M., 2001. Identification of Canine Coronavirus Strains from Feces by S Gene Nested PCR and Molecular Characterization of a New Australian Isolate. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1036–1041.
- Ntafis, V., Mari, V., Danika, S., Fragkiadaki, E., Buonavoglia, C., 2010. An outbreak of canine coronavirus in a Greek kennel. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 320–323.
- Ntafis, V., Mari, V., Decaro, N., Papanastassopoulou, M., Papaioannou, N., Mpatziou, R., Buonavoglia, C., Xylouri, E., 2011. Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains. *Vet. Microbiol.* 151, 238–244.
- Nylander, J.A.A., 2002. **MrModeltest**, v.1.0b. Program distributed by the author. <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Pratelli, A., Decaro, N., Tinelli, A., Martella, V., Elia, G., Tempesta, M., Cirone, F., Buonavoglia, C., 2004. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in fecal samples of dogs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1797–1799.

- Pratelli, A., Martella, V., Elia, G., Tempesta, M., Guarda, F., Capucchio, M.T., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2001. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health.* 48, 385–392.
- Rimmelzwaan, G.F., Groen, J., Egberink, H., Borst, G.H., Uytde Haag, F.G., Osterhaus, A.D., 1991. The use of enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 26, 25–40.
- Schulz, B.S., Strauch, C., Mueller, R.S., Eichhorn, W., Hartmann, K., 2008. Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy. *J. Small Anim. Pract.* 49, 84–88.
- Tennant, B.J., Gaskell, R.M., Jones, R.C., Gaskell, C.J., 1993. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet. Rec.* 132, 7–11.
- Tennant, B.J., Gaskell, R.M., Kelly, D.F., Carter, S.D., Gaskell, C.J., 1991. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res. Vet. Sci.* 51, 11–18.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371–373.
- Yesilbag, K., Yilmaz, Z., Torun, S., Pratelli, A., 2004. Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 51, 353–355.

Zappulli, V., Caliari, D., Cavicchioli, L., Tinelli, A., Castagnaro, M., 2008. Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. *Res. Vet. Sci.* 84, 278–282.

Zicola, A., Jolly, S., Mathijs, E., Ziant, D., Decaro, N., Mari, V., Thiry, E., 2012. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J. Small Anim. Pract.* 53, 297–300.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest associated with the present paper.

4. CONCLUSÕES

Capítulo 1 – Parvovírus canino

1. Das 144 amostras de fezes de cães com e sem sintomas de gastroenterite hemorrágica, 42 foram positivas para CPV-2 por PCR, mostrando que o CPV-2 ocorre em grande frequência na população canina do Brasil.
2. Das 42 amostras positivas para CPV-2, trinta possuíam sinais clínicos de gastroenterite hemorrágica, mostrando que uma parte das infecções é subclínica.
3. Pelo sequenciamento parcial do gene VP2, dos 42 animais positivos para CPV-2, 33 foram caracterizados para CPV-2c, oito para CPV-2b e um para CPV-2a, mostrando que o CPV-2c foi a variante antigênica predominante na população canina do Brasil.
4. A filogenia das amostras de CPV-2 demonstrou que elas eram similares às encontradas em outros países, não indicando uma origem geográfica comum, sendo caracterizadas como cosmopolitas.

Capítulo 2 – Coronavírus canino

1. Foi realizada a detecção do CCoV-II e CPV-2 por PCR a partir de amostras de órgãos e fezes de cinco filhotes que vieram a óbito com sinais de GEH.
2. Três cães foram positivos para CCoV-II e CPV-2, um foi positivo apenas para CCoV-II e um só para CPV-2, dois tiveram co-infecção por esses dois agentes e outro foi negativo para todos os vírus pesquisados, mostrando que ambos os vírus podem estar em co-infecções.
3. O CCoV-II foi identificado em diversos órgãos dos três cães positivos para esse vírus, mostrando características do subtipo pantrópico.
4. O sequenciamento parcial dos produtos de amplificação identificou a variante antigênica CPV-2c e o subtipo CCoV-IIa, sendo esta a primeira descrição desse subtipo em cães no Brasil.
5. A análise filogenética do CCoV-IIa, na população canina no sul do Brasil, mostra que eles se agrupam em um mesmo clado, sugerindo um ancestral em comum, evidenciando uma similaridade com amostras de outros países.

REFERÊNCIAS

- AGUNGPRIYONO, D.R.; UCHIDA, K.; TABARU, H.; YAMAGUCHI, R.; TATEYAMA, S. Subacute massive necrotizing myocarditis by canine parvovirus type 2 infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 77-80, 1999.
- APPEL, M.J.G.; COOPER, B.J.; GREISEN, H.; SCOTT, F.W.; CARMICHAEL, L.E. Canine viral enteritis. I. Status report on corona and parvo-like viral enteritides. **Cornell Veterinary**, v. 69, p. 123-133, 1979.
- APPEL, M.J.G.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus type 2. In: **Virus Infections of Carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V., cap.7, p. 69-92, 1987.
- BANDAI, C., ISHIGURO, S., MASUYA, N., HOHDATSU, T., MOCHIZUKI, M. Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v. 61, p. 731-736, 1999.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRANDÃO, P.E.; LOVATO, L.T.; SLHESSARENKO, R.D. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, 2.ed. da UFSM, 2012, 1008 p.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, n. 82, p. 3021-3025, 2001.
- BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, E.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CASTAGNARO, M.; TEMPESTA, M. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 492-494, 2006.
- BURROWS, C.F.; BATT, R.M.; SHERDING, R.G. Afecções do intestino delgado. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária Moléstias do cão e do gato**. 4. ed. São Paulo: Manole, v. 2, cap.104, p. 1618-1705, 1997.
- CARMAN, P.S.; POVEY, R.C. Pathogenesis of canine parvovirus in dogs: histopathology and antigen identification in tissues. **Research in Veterinary Science**, v. 38, p. 141-150, 1985.
- CARMICHAEL, L.E. An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine series B**, v. 52, n. 7-8, p. 303-311, 2005.
- CARMICHAEL, L.E.; BINN, L.N.; New enteric viruses in the dog. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 25, p. 1-37, 1981.

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

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

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

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

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 221–234, 2008.

DECARO, N.; TINELLI, A.; PRATELLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. First two confirmed cases of malignant catarrhal fever in Italy. **New Microbiology**, v. 26, p. 339-344, 2003.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; DI TRANI, L.; TARSITANO, E.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 19-28, 2005.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; BUONAVOGLIA, D.; BELLACICCO, A.L.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. **Journal of Virological Methods**, v. 138, p. 10-16, 2006a.

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 Veterinary Medicine**, v. 53, p. 468-472, 2006b.

DECARO, N., CAMPOLO, M., ELIA, G., BUONAVOGLIA, D., COLAIANNI, M.L., LORUSSO, A., MARI, V., BUONAVOGLIA, C. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. **Research Veterinary Science**, v. 83, p. 269–273, 2007a.

DECARO, N., DESARIO, C., ELIA, G., CAMPOLO, M., LORUSSO, A., MARI, V., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups

after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. **Vaccine**, v. 25, p. 1161–1166, 2007b.

DECARO, N., DESARIO, C., ELIA, G., MARTELLA, V., MARI, V., LAVAZZ, A., NARDI, M., BUONAVOGLIA, C. Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiology**, v. 31, p. 125–130, 2008a.

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

DECARO N, MARI V, CAMPOLO M, LORUSSO A, CAMERO M, ELIA G, MARTELLA V, CORDIOLI P, ENJUANES L, BUONAVOGLIA C. Recombinant canine coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. **Journal of Virology**, v. 83, n. 3, p. 1532–1537, 2009.

DECARO N., MARI V., ELIA, G., ADDIE, D.D., CAMERO, M., LUCENTE, M.S., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 41-47, 2010.

DECARO N., DESARIO, C., BILLI, M., MARI V., ELIA, G., CAVALLI, A., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. **Veterinary Journal**, v. 187, p. 195-199, 2011.

DESARIO, C., DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test of virus? **Journal of Virological Methods**, v. 126, p. 179-185, 2005.

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

DOLJA, V.V.; CARRINGTON, J.C. Evolution of positive-strand RNA viruses. **Seminars in Virology**, v. 3, p. 315-326, 1992.

DURIGON, E.L.; ÂNGELO, M.J.O.; JEREZ, J.A. et. al. Comparação entre as reações de hemaglutinação (HA), isolamento do vírus em cultura de células (CC), imunoeletrosmoforese (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), para o diagnóstico etiológico da parvovirose canina. **Revista de Microbiologia**, v. 18, p. 205-210, 1987.

EAST, M.L.; MOESTL, K.; BENETKA, V.; PITRA, C.; HONER, O.P.; WACHTER, B.; HOFER, H. Coronavirus infection of spotted hyenas in the Serengeti ecosystem. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n.1-2, p. 1-9, 2004.

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

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

EVERMANN, J.F., ABBOTT, J.R., HAN, S. Canine coronavirus associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 610-614, 2005.

GAGNON, A.N.; POVEY, R.C. A possible parvovirus associated with an epidemic gastroenterites of dogs in Canada. **Veterinary Records**, v. 104, p. 263-264, 1979.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica**. 2.ed. Editora da UFRGS, cap. 2, p. 49-79, 2006.

GORDON, J.C.; ANGRICK, E.J. Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 7, p. 1464-1467, 1986.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

GREEN, J.S.; BRUSS, M.L.; EVERMANN, J.F.; BERGSTROM, P.K. Serologic response of captive coyotes (*Canis latrans* Say) to canine parvovirus and accompanying profiles of canine coronavirus titers. **Journal of Wild life Diseases**, v. 20, n. 1, p. 6-11, 1984.

GREENWOOD, N.M.; CHALMERS, W.S.K.; BAXENDALE, W; THOMPSON, H. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains. **Veterinary Research**, v. 136, p. 63-67, 1995.

GUIRAO, M.P.; **Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de Coronavírus canino (CCoV) e o papel de cães como reservatórios para rotavírus**. 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

HAGIWARA, M.K.; JULY, J.R.; BACCARO, M.R. et al. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, p. 47-49, 1980.

HASS, R.; JOHANN, J.M.; CAETANO, C.F.; FISCHER, G.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T.; HÜBNER, S.O. Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 270-274, 2008.

HOLMES, K.V.; LAI, M.M.C.; *Coronaviridae: The viruses and their replication*. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; **Virology**, 3.ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 1075-1093, 1996.

HOMEM, V.S.F.; MENDES, Y.G.; LINHARES, A.C. Gastroenterite canina-Agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, p. 531- 536, 1999.

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

HORZINEK M. C. Vaccination Protocols for Companion Animals: The Veterinarian's Perspective. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, p. 129-132, 2010.

HOSKINS, J.D. Update on canine parvoviral enteritis. **Veterinary Medicine**. v. 92, n. 8, p. 694-709, 1997.

HOSKINS, J.D. Doenças Virais Caninas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 5.ed, v. 1, p. 442 - 444, 2004.

KAPIL, S.; COOPER, E.; LAMM, C.; MURRAY, B.; REZABEK, G.; JOHNSTON III, L.; CAMPBELL, G.; JOHNSON, B. Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 4044-4047, 2007.

KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4.ed. New York: Lippincott Williams e Wilkins, 2001.

KOCATURK, M.; MARTINEZ, S.; ERALP, O.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.; YILMAZ, Z. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, p. 478-483, 2010.

LAI, M.M.; HOLMES, K.V.; *Coronaviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; **Fields Virology**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, p.1163-1185, 2001.

LARSON, L., SCHULTZ, R.D. Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? **Veterinary Therapy**, v. 9 n. 2, p. 94-101, 2008.

LENGHAUS, C.; STUDDERT, M.J. Relationships of canine panleucopenia (enterites) and myocarditis parvoviruses to feline panleucopenia virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 152-53, 1980.

LOPEZ DE TURIZO, J.; CORTES, E.; RANZ, A. et al. Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2445-2456, 1991.

LOVATO, L.T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, 1.ed. da UFSM, 2007, 888 p.

MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I.A.; THOMPSON, H.P.; CORNWELL, H.J.C. Canine parvovirus enteritis 1: Clínica, haematological and pathological features of experimental infection. **Veterinary Record**, v. 115, p. 201-210, 1984a.

MACARTNEY, L.; MCCANDLISH, I. A.; THOMPSON, H.P.; CORNWELL, H.J.C. Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. **Veterinary Record**, v. 115, p. 453-460, 1984b.

MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; DECARO, N.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; BOZZO, G.; TARSITANO, E.; BUONAVOGLIA, C. Immunogenicity of an Intranasally Administered Modified Live Canine Parvovirus Type 2b Vaccine in Pups with Maternally Derived Antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n.12, p. 1243-1245, 2005.

MARULAPPA, S.Y.; KAPIL, S. Simple tests for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 1, p. 127-131, 2009.

MCCANDLISH, I.A.P. In: DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**, São Paulo, 1.ed. Roca, 2001, 1075 p.

MCELLIGOTT, S.; COLLINS, P.J.; SLEATOR, R.D.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; O'SHEA, H. Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. **Archives of Virology**, v. 156, p. 495-503, 2011.

McMASTER, G.K.; TRATSCHIN, J.D.; SIEGL, G. Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. **Journal of Virology**, v. 38, n. 1, p. 368-371, 1981.

MOCHIZUKI, M.; HARASAWA R.; NAKATANI H.. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 38, p. 1-10, 1993.

MOOJEN, V.; GONÇALVES, I.; PIZZOL, M. Parvovirose canina: Diagnóstico laboratorial realizado no período de 1980 a 1989, na Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 20, p. 209-223, 1992.

MORAIS, M.P.; COSTA, P.R. Parvoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, 2.ed. da UFSM, 2012, 1008 p.

MOSCA, X. **Detecção de coronavírus e parvovírus caninos em amostras fecais de cães por métodos moleculares**. 2003. 162 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDENT, M.J. Parvoviridae. In: _____ *Veterinary Virology*, 3.ed. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 21, p. 343-356.

NAKAMURA, K.; IKEDA, Y.; MIYAZAWA, T.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MOCHIZUKI, M. Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses. **Research in Veterinary Science**, n. 71, p. 219-222, 2001.

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

NELSON, R.; COUTO, C. G. Distúrbios do trato intestinal. In: **Medicina interna de pequenos animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 33, p. 417-447.

OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SONNE, L.; PAVARINI, S.P.; SANTOS, A.S.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 131-136, 2009.

OTTO, C.M.; JACKSON, C.B.; ROGELL, E.J.; PRIOR, R.B.; AMMONS, W.S. Recombinant Bactericidal/Permeability- Increasing Protein (rBPI21) for Treatment of Parvovirus Enteritis: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 355-360, 2001.

PARRISH, C.R. The emergence and evolution of canine parvovirus – an example of recent host range mutation. **Seminars in Virology**, v. 5, p. 121-132, 1994.

PARRISH, C.R. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 29-40, 1999.

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

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

POLLOCK, R.V.H.; CARMICHAEL, L.E. Canine viral enteritis. In: GREENE, C.E. **Infections diseases of the dog and cat**. WB Saunders Company, 1990, p. 268-287.

POLLOCK, R.V.H.; COYNE, M.J. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 3, p. 555-569, 1993.

PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; GRECO, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Development of nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 80, p. 11-15, 1999.

PRATELLI, A., BUONAVOGLIA, D., MARTELLA, V., TEMPESTA, M., LAVAZZA, A., BUONAVOGLIA, C. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 81, p. 91-94, 2000.

PRATELLI, A.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 8, p. 612-615, 2001a.

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

PRATELLI, A.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; PALMIERI, A.; CIRONE, F.; TINELLI, A.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. **Journal of Virological Methods**, v. 102, p. 67-71, 2002.

PRATELLI, A., DECARO, N., TINELLI, A., MARTELLA, V., ELIA, G., TEMPESTA, M., CIRONE, F., BUONAVOGLIA, C. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in fecal samples of dogs with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1797-1799, 2004.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RIMMELZWAAN, G.F., GROEN, J., EGBERINK, H., BORST, G.H., UYTDE HAAG, F.G., OSTERHAUS, A.D. The use of enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 26, p. 25-40, 1991.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, 1989, 223p.

SANCHEZ-MORGADO, J.M., POYNTER, S., MORRIS, T.H., Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain. **Virus Research**, v. 104, p. 27-31, 2004.

SCHULZ, B.S., STRAUCH, C., MUELLER, R.S., EICHHORN, W., HARTMANN, K. Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute

haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 84–88, 2008.

SENDA, M., HIRAYAMA, N., YAMAMOTO, H., KURATA, K. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 1986.

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

SPIBEY, N.; GREENWOOD, N.M.; SUTTON, D.; CHALMERS, W.S.K.; TARPEY, I. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 48–55, 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.

STROMBECK, D.R; GUILFORD, W.G. **Small Animal Gastroenterology**. 2.ed. Wolfe Publishing Limited, USA, p. 327-330. 1991.

STROTTMANN, D.M.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L.C.; BARCELOS, L.J.G.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERON, D. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 400-405, 2008.

SVARA, T.; JUNTES, P.; POGACNICK, M.; GOMBAC, M.; HOSTNIK, P. Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of dogs with canine parvovirus. **Slovenian Veterinary Research**, v. 40, p. 81-89, 2003.

TAMS, Tood R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. Editora ROCA, 2005, p. 199-200.

TENNANT, B.J., GASKELL, R.M., KELLY, D.F., CARTER, S.D., GASKELL, C.J. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. **Research in Veterinary Science**, v. 51, p. 11-18, 1991.

TENNANT, B.J., GASKELL, R.M., JONES, R.C., GASKELL, C.J. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. **Veterinary Record**, v. 132, p. 7–11, 1993.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, 2.ed. Roca, 2004, 556p.

TRUYEN, U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 47-50, 1999.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 9-13, 2006.

TRUYEN U.; PARRISH C.R. Canine and feline host range of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. **Journal of Virology**, v. 66, p. 5399-5408, 1992.

TRUYEN, U.; EVERMAN, J.F.; VIELER, F.; PARRISH, C.R. Evolution of canine parvovirus involved in loss and gain of feline host range. **Virology**, v. 215, p. 186-189, 1996.

VIEIRA, M.J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A.L.; DECARO, N.; DESARIO, C.; MULLER, A.; CARVALHEIRA, J.; BUONAVOGLIA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 488–491, 2008.

WANG, Y.; MA, G.; LU, C. et al. Detection of canine coronaviruses genotype I and II in raised *Canidae* animals in China. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 19, p. 35–39, 2006.

YESILBAG, K., YILMAZ, Z., TORUN, S., PRATELLI, A. Canine coronavirus infection in Turkish dog population. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, p. 353–355, 2004.

ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; CAVICCHIOLI, L.; TINELLI, A.; CASTAGNARO, M. Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 278–282, 2008.

ZARNKE, R.L.; EVERMANN, J.; VER HOEF, J.M.; MCNAY, M.E.; BOERTJE, R.D.; GARDNER, C.L.; ADAMS, L.G. Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, n. 4, p. 740-745, 2001.