

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS PATOLÓGICOS E AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA EM CÃES  
COM PARVOVIROSE CANINA

EDUARDO CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE  
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ACHADOS PATOLÓGICOS E AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA EM CÃES  
COM PARVOVIROSE CANINA

EDUARDO CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias na área de  
concentração em Cirurgia, Morfologia  
e Patologia animal, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.  
Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE  
2007

Eduardo Conceição de Oliveira

Achados Patológicos e Avaliação Imunoistoquímica em Cães com Parvovirose Canina.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

Profª Dra Dominguita Lühers Graça (UFSM)

Membro da Comissão

Profª Dra Glaucia Denise Kommers (UFSM)

Membro da Comissão

Prof. Dr. André Silva Carrissimi (UFRGS)

Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Um agradecimento especial ao Prof. David Driemeier pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de trabalho, orientação e conhecimentos adquiridos na área de Patologia Veterinária.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Caroline Argenta Pescador pela amizade, constante ajuda durante o mestrado e a oportunidade de trabalharmos juntos em seus projetos. Ao Prof. Luís Gustavo Corbellini pela ajuda com a análise estatística deste trabalho.

Por fim, aos estagiários, mestrandos, doutorandos e aos funcionários do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, agradeço pela ajuda, amizade e pelo aprendizado adquirido em conjunto.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMO .....	8
<i>ABSTRACT</i> .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	10
2.1 PARVOVÍRUS .....	12
2.2 PARVOVÍRUS CANINO.....	14
2.2.1 Histórico e origem.....	14
2.2.2 Parvovirose canina .....	15
2.2.3 Epidemiologia .....	16
2.2.4 Patogenia .....	18
2.2.5 Sinais clínicos .....	19
2.2.6 Alterações hematológicas e bioquímicas .....	21
2.2.7 Prevenção .....	21
2.2.8 Achados Patológicos .....	22
2.2.9 Patologias associadas à parvovirose canina .....	26
2.2.10 Métodos complementares de diagnóstico .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS.....	30
3.2 PROCEDIMENTOS DE NECROPSIA.....	30
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
3.4 IMUNOISTOQUÍMICA.....	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1 DADOS GERAIS .....	34
4.2 ACHADOS MACROSCÓPICOS.....	35
4.3 RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS .....	43
4.4 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS.....	44
4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....	49
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONCLUSÕES .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação e frequência dos cães sem raça definida e com raça definida observadas nas 96 necropsias de caninos com parvovirose canina.	35
Tabela 2 – Frequência das lesões sugestivas de parvovirose canina em cada órgão analisado dos cães necropsiados no SPV-UFRGS. ....	35
Tabela 3 – Frequência das lesões histológicas em cada órgão analisado nos 96 cães com parvovirose canina necropsiados no SPV-UFRGS.....	40
Tabela 4 – Frequência de detecção de CPV-2 em diferentes órgãos através do teste imunistoquímico realizado nos 96 caninos que apresentaram lesões sugestivas de parvovirose canina.....	44
Tabela 5 – Resultado comparativo do teste imunistoquímico realizado em cortes de intestino com e sem autólise <sup>1</sup> .....	50
Tabela 6 – Razão de chances ( <i>Odds ratio</i> ) de casos positivos por órgão na imunistoquímica. ....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Patogenia e distribuição do CPV-2. Adaptação de Hoskins (1998). In: Greene, C.E. (Ed.) Infectious diseases of the dog and cat.....	19
Figura 2 – Distribuição por faixa etária de 78 cães necropsiados com parvovirose canina que apresentaram a informação da idade. ....	34
Figura 3 – Canino, macho, SRD com infecção por CPV-2. Intestino delgado com hiperemia da serosa e linfonodos mesentéricos com coloração vermelha. ...	36
Figura 4 – Canino, macho, SRD com infecção por CPV-2. Hiperemia acentuada na serosa do intestino delgado (A) e grande quantidade de fibrina aderida à mucosa intestinal hiperêmica (B). ....	37
Figura 5 – Canino, fêmea, Beagle com infecção por CPV-2. Conteúdo hemorrágico na luz do intestino delgado.....	37
Figura 6 – Canino, Fêmea, Rottweiler com infecção por CPV-2. Hiperemia intestinal acentuada (H) e aumento e depressão de placas de Peyer (setas)..	38
Figura 7 – Canino, fêmea, SRD com infecção por CPV-2. Baço com áreas claras e escuras na superfície. ....	39
Figura 8 – Canino, macho, Poodle com infecção por CPV-2. Atrofia acentuada do timo com perda da diferenciação entre córtex e medular. Coloração de hematoxilina e eosina – 200X. ....	41
Figura 9 – Canino, macho, SRD acometido por parvovirose canina. Enterite necrótica acentuada com fusão das vilosidades e atrofia de vilosidades. Coloração de hematoxilina e eosina – 200X. ....	42
Figura 10 – Canino, macho, Pit Bull com infecção por CPV-2. Rarefação de centros foliculares em um folículo linfóide da placa de Peyer. Coloração de hematoxilina e eosina – 400X. ....	43
Figura 11 – Canino, SRD, macho com infecção por CPV-2. Marcação de CPV-2 no intestino delgado pela técnica de imunistoquímica (IHQ). Método da streptavidina-biotina-peroxidase - 200X. ....	45
Figura 12 – Canino, SRD, macho com infecção por CPV-2. Marcação de CPV-2 na base das vilosidades, demonstrando positividade no epitélio das criptas e células epiteliais descamadas. IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 400X.....	46
Figura 13 – Canino, Poodle, macho com infecção por CPV-2. Imunistoquímica positiva em segmento intestinal com autólise (A) e o correspondente controle negativo com ausência de marcações (B). Método da streptavidina-biotina-peroxidase - 200X.....	46
Figura 14 – Canino, Poodle, macho com infecção por CPV-2. Grande quantidade de células positivas para CPV-2 no dorso da língua, principalmente em células basais do epitélio escamoso estratificado. IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 400X. ....	47
Figura 15 – Canino, SRD, fêmea com infecção por CPV-2. Tonsila com marcação positiva no epitélio escamoso estratificado e raras células linfóides no tecido linfóide da tonsila (A). IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 200X. ....	48
Figura 16 – Canino, Boxer, macho com infecção por CPV-2. Baço com marcação positiva no centro folicular. IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 400X. ....	49

## RESUMO

Um total de 96 cães com lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose canina foram necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de março de 2005 a novembro de 2006. Tecidos destes caninos foram analisados através de histologia e imunoistoquímica. Aumento das placas de Peyer do intestino delgado e hiperemia da mucosa intestinal foram os achados macroscópicos mais observados. O intestino revelou enterite necrótica em 77% dos cães analisados. Entretanto, 17,7% das alterações histológicas do intestino delgado ficaram prejudicadas pela autólise, dificultando o diagnóstico. O teste de imunoistoquímica foi realizado em cortes de intestino delgado, linfonodo mesentérico, timo, baço, tonsila, língua e medula óssea em todos os 96 casos selecionados e foi positivo em 91,6% dos cães necropsiados. O intestino delgado obteve melhor resultado, obtendo-se marcações em 77% (74/96) dos casos. A análise final do exame paramétrico de Fisher demonstrou uma fraca associação entre autólise intestinal e resultado positivo da imunoistoquímica onde as chances de um intestino delgado autolisado apresentar resultado positivo na imunoistoquímica é 0,33 vezes menor (OR= 0,33; 95%IC: 0,10-1,17) quando comparada a um intestino delgado não autolisado.

## **ABSTRACT**

*A total of 96 dogs with gross lesions suggestive of canine parvovirus infection were selected and necropsied in the Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, between march 2005 to november 2006. The main gross lesions were enlargement of the Peyer's patches in the small intestine and hyperemia in the intestinal mucosa. Microscopically, the small intestine showed necrotizing enteritis in 77% of the dogs examined. However, in 17,7% of the histological lesions in the small intestine were damaged by autolysis making it difficult to obtain an appropriate diagnosis. The immunohistochemistry test was performed in tissues of small intestine, mesenteric lymph nodes, thymus, spleen, tonsils, tongue and bone marrow in all the 96 selected cases. Parvovirus antigen was detected in 91,6% of the dogs necropsied. The best result of the IHC test was seen in samples of small intestine which was positive in 77% of the cases. The statistical analysis (Fisher test) showed a weak association between intestinal autolysis and positive result of the IHC test. The chance of the autolysed intestine showing a positive result in the immunohistochemistry test was 0,33 less (OR=0,33; 95% CI:0,10-1,17) when compared with an small intestine not autolysed.*

## 1. INTRODUÇÃO

Enterite consiste na inflamação do intestino por diferentes causas, podendo atingir todas as partes do trato intestinal ou somente atingir o intestino delgado (; HUNT; KING, 2000). Quando acomete todo o trato digestivo inferior é denominada de gastroenterite (JONES; HUNT; KING, 2000). Como consequência, o principal sinal da enterite é o surgimento de diarreia que se caracteriza pela maior quantidade de líquido nas fezes, aumento no número de defecações e eliminação de maior volume de fezes (BATTERSBY; HARVEY, 2006).

As enterites constituem uma importante parcela entre as doenças que acometem os caninos, sendo os cães mais jovens os mais atingidos (BATTERSBY; HARVEY, 2006). Inúmeros agentes estão associados a esta doença, como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos (HALL; GERMAN, 2005). No final dos anos setenta, o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) ganhou destaque como agente etiológico de enterites em cães jovens, ocasionando altas taxas de morbidade e mortalidade (CARMICHAEL; APPEL, 1980). O CPV-2 é responsável pela ocorrência de duas formas clínicas, a enterite necrótica e a miocardite (CARMICHAEL; APPEL, 1980; MULVEY et al., 1980). Os sinais encontrados na forma entérica e na forma cardíaca da parvovirose canina estão relacionados à necessidade do CPV-2 em atingir células com alta taxa de mitose para multiplicar-se, provocando intensa enterite necrótica, necrose de tecidos linfóides e miocardite (APPEL et al., 1978, HAYES; RUSSEL; BABIUK, 1979).

Inúmeros estudos foram desenvolvidos no final dos anos setenta e início dos anos oitenta envolvendo os achados patológicos provocados pelo CPV-2, desta forma fornecendo dados para o diagnóstico *post-mortem* (NELSON et al., 1979; PLETCHER et al., 1979; MEUNIER et al., 1985a). O diagnóstico microscópico da enterite por CPV-2 é baseado na identificação das lesões de enterite necrótica e de rarefação linfóide em diferentes órgãos (APPEL et al., 1979). Entretanto, em alguns casos a análise histológica não pode ser realizada devido à presença de lesões inespecíficas ou pela autólise avançada. Isto gerou a necessidade de buscar uma técnica alternativa de diagnóstico que pudesse auxiliar a microscopia, concluindo assim o diagnóstico. Diversas técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas com o objetivo de identificar o CPV-2 em amostras de tecidos de cães. No Setor de Patologia Veterinária (SPV) da UFRGS a técnica de imunistoquímica em material incluído em parafina está sendo

utilizada, possibilitando a identificação de agentes infecciosos em tecidos, entre eles o CPV-2.

No Brasil, o CPV-2 foi identificado pela primeira vez em 1979 em um cão com gastroenterite hemorrágica (HAGIWARA et al., 1980). Na Faculdade de Veterinária da UFRGS, o primeiro diagnóstico de parvovirose canina, utilizando-se a imunofluorescência direta, ocorreu em agosto de 1980 em um canino de 35 dias de idade (MOOJEN et al., 1992). Desde então, alguns artigos têm sido publicados no Brasil referentes ao assunto envolvendo métodos de diagnóstico, relato de casos, soroprevalência e a identificação das cepas de CPV-2 na população com parvovirose canina (PEREIRA et al., 2000, HEADLEY; SAITO, 2003; COSTA et al., 2005; DEZENGRINI et al., 2007). Em um recente estudo de soroprevalência envolvendo 817 cães na Cidade de Santa Maria – RS, anticorpos de CPV-2 foram observados em 68,7% dos animais, sendo o agente mais prevalente na população canina avaliada (DEZENGRINI; WEIBLEN; FLORES, 2007).

As doenças virais de cães possuem grande importância dentre os diagnósticos realizados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Onde no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2004, 70,6% (229/324) dos diagnósticos envolvendo doenças virais foram atribuídos à parvovirose canina, justificando a importância do estudo desta enfermidade pelo SPV-UFRGS.

Tendo em vista o grande número de cães enviados ao SPV-UFRGS com parvovirose canina, o presente estudo visa caracterizar os achados de necropsia, histopatológicos e imunoistoquímicos de cães infectados por este agente. Adicionalmente, durante a rotina do SPV observou-se que em alguns cães com autólise ou achados inespecíficos, as lesões microscópicas características da parvovirose canina não podem ser identificadas. O intestino delgado na histologia é o principal órgão para o diagnóstico da parvovirose canina. Porém, a grande concentração de bactérias e de enzimas ocasiona uma autólise precoce, dificultando o diagnóstico histológico em alguns casos (STRAFUSS, 1988). Além disso, as lesões frequentemente não são disseminadas por toda a mucosa e fragmentos coletados podem não representar exatamente as alterações a serem pesquisadas. Sendo assim surgiu à necessidade de desenvolver no setor a técnica de imunoistoquímica como um método auxiliar no diagnóstico, especialmente naqueles casos em que as lesões histológicas observadas pela microscopia óptica ficaram prejudicadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Parvovírus

A família *Parvoviridae* é formada por duas subfamílias, a subfamília *Parvovirinae* e a *Densovirinae* (COETZER; TUSTIN, 2004). Os vírus da subfamília *Densovirinae* infectam insetos (JONES et al., 2000). A subfamília *Parvovirinae* é representada por três gêneros *Parvovirus*, *Erythrovirus* e *Dependovirus* (vírus associado a um adenovírus para poder replicar) (JONES ; HUNT; KING, 2000).

Os parvovírus são conhecidos patógenos de pássaros, cães, roedores, suínos, bovinos, doninhas (mustelídeo da América do Norte), gatos e humanos (TIMONEY et al., 1988; HUEFFER; PARRISH, 2003; YOUNG; BROWN, 2004). Entre as citadas, a parvovirose felina foi a mais conhecida e estudada das parvovirose até o final dos anos setenta, sendo a primeira doença viral específica de gatos a ser associada à presença de um vírus (KAHN, 1978).

Em 1928, o vírus da panleucopenia felina (FPV) foi o primeiro agente viral de gatos a ser associado com grave enterite viral levando a alta taxa de morbidade e mortalidade (KHAN, 1978; SHERDING, 1994). A patogenia do FPV está associada ao tropismo viral em atingir células com alta taxa de replicação (PARRISH; KAWAOKA, 2005). Desta forma, as células epiteliais intestinais, linfóides e da medula óssea, que possuem altas taxas de mitoses, são infectadas e necrosam pela presença do parvovírus, provocando uma enterite necrótica e panleucopenia (CARLSON; SCOTT, 1977; CARLSON; SCOTT; DUNCAN, 1978; KAHN, 1978). Outro tipo de lesão ocorre em fetos felinos e em neonatos, onde a infecção provocada pelo FPV provoca hipoplasia cerebelar (KILHAM; MARGOLIS; COLBY, 1971; PODELL, 1994). O vírus atinge as células da camada granular do cerebelo e células de Purkinje, que estão em alta taxa de replicação celular, e são destruídas impedindo o desenvolvimento do cerebelo (POLLOCK; POSTORINO, 1994). Este ficará hipoplásico pela reduzida camada granular e menor quantidade de células de Purkinje (STORTS, 1998). A infecção uterina com o FPV também pode ocasionar abortos e natimortalidade (KHAN, 1978).

Um outro parvovírus conhecido entre os animais domésticos é o parvovírus canino tipo 1 (CPV-1) ou *minute parvovirus of canines* (MVC) (JONES; HUNT; KING, 2000). Este parvovírus foi isolado primeiramente em 1967 nas fezes de caninos e é

antigenicamente diferente do parvovírus canino tipo 2 (BINN et al., 1970; CARMICHAEL et al., 1994). O MVC ocasiona pneumonia intersticial, enterite mononuclear discreta, miocardite e reabsorção embrionária (CARMICHAEL; SCHLAFER; HASHIMOTO, 1994).

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é atualmente um importante agente de enterites em cães jovens. O vírus causa graves lesões entéricas pela ocorrência de necrose do epitélio intestinal e linfopenia como resultado da intensa necrose de tecidos linfóides (CARMICHAEL; APPEL, 1980).

O parvovírus suíno (PPV) é uma causa comum de falhas reprodutivas em suínos. Sua ocorrência está associada a inúmeros problemas reprodutivos: abortos, mumificações fetais, morte embrionária, infertilidade e natimortalidade (BOLT et al., 1997; WILHELM et al., 2006). Microscopicamente, são encontradas miocardites, meningoencefalites e nefrites nos fetos abortados e neonatos (VAN LEENGOED et al., 1983). Sua seqüência genética é semelhante em 57% dos aminoácidos do CPV-2 (SIMPSON et al., 2002).

Em bovinos, o parvovírus bovino (BPV) causa enterite em bezerros, com uma diarreia transitória e de baixa gravidade, porém em alguns casos pode provocar enterites fatais (JONES; HUNT; KING, 2000). O BPV também foi isolado em casos de conjuntivites, abortos e em animais com alterações respiratórias (TIMONEY et al., 1988). Diferentes tipos de parvovírus bovino foram identificados (BPV-1, BPV-2 e BPV-4) (STORZ et al., 1978).

O parvovírus que acomete seres humanos é denominado de parvovírus humano B19 (HPVV B19) (YOUNG; BROWN, 2004). A lesão mais conhecida provocada pelo HPVV B19 é o eritema infeccioso, sendo mais observado em crianças (FILHO; AZULAY, 2006). O eritema infeccioso causa lesões cutâneas eritematosas e eritematopapulosas não pruriginosas em diferentes partes do corpo e com rápida recuperação (FILHO; AZULAY, 2006). Este vírus também causa artrite nos adultos, anemia severa em fetos, anemias transitórias em adultos e anemia crônica em pacientes imunocomprometidos (YOUNG; BROWN, 2004; FILHO; AZULAY, 2006).

Diferentes parvovírus em animais são identificados em outras espécies, por exemplo: o parvovírus que causa enterite em martas, parvovírus em ratos (causa hepatite, hipoplasia cerebelar e encefalopatia hemorrágica) e o vírus diminuto de camundongos que causa nanismo e hipoplasia cerebelar (JONES; HUNT; KING, 2000).

## 2.2 Parvovírus canino

### 2.2.1 Histórico e origem

A parvovirose canina (CPV-2) foi identificada pela primeira vez em agosto de 1978 por pesquisadores do *Cornell Research Laboratory for Diseases of Dogs* (APPEL et al., 1978). Este laboratório foi requisitado por veterinários e criadores pela ocorrência de inúmeros casos de gastroenterites que se apresentaram em diferentes locais dos Estados Unidos da América (EUA) (APPEL et al., 1978). Cães com menos de 5 meses de idade foram os mais acometidos apresentando graves quadros de diarreia, com alta taxa de morbidade e mortalidade (APPEL et al., 1978). Suspeitas iniciais indicavam o coronavírus canino, porém através da microscopia eletrônica do material fecal destes caninos, revelou-se a presença de pequenos vírus que freqüentemente formavam agregados, sendo morfológicamente compatíveis com um vírus do gênero parvovírus (APPEL et al., 1978). Quase que simultaneamente mortes também foram identificadas no Canadá, Austrália e na Inglaterra associadas a enterites por parvovírus (WALKER et al., 1980; CARMICHAEL, 2005).

Após esta identificação inicial, estudos foram realizados para determinar a presença do CPV-2 no período anterior a 1978 (TRUYEN et al., 1995). Com base em estudos retrospectivos, determinou-se que o CPV-2 surgiu na Europa no início dos anos setenta e rapidamente se espalhou pelo mundo, em um período de um a dois anos (KOPTOPOULOS et al., 1986). No Brasil, o parvovírus canino foi identificado pela primeira vez em 1979 (HAGIWARA et al., 1980).

Juntamente com os relatos de enterites pelo parvovírus canino, casos de mortes súbitas associado à presença de miocardites em caninos de menos de 8 semanas foram observados nos EUA e no Canadá (HAYES; RUSSEL; BABIUK, 1979; JEZYK; HASKINS; JONES, 1979). Sendo logo comprovada a presença do CPV-2 também como agente causador de miocardite (HAYES; RUSSEL; BABIUK, 1979; JEZYK; HASKINS; JONES, 1979). As ocorrências simultâneas de miocardites mononucleares com achados de enterite foram ambas associadas ao CPV-2 (CARPENTER et al., 1980).

A primeira cepa identificada em 1978 foi classificada como CPV-2 (parvovírus canino tipo 2) (APPEL et al., 1978). Durante os anos de 1980 e 1981 um novo tipo antigênico foi observado, o parvovírus canino tipo 2a (CPV-2a). Com o surgimento da

nova cepa, tanto cães vacinados como não vacinados foram acometidos pela parvovirose (CARMICHAEL, 2005). Comparativamente com os sinais observados com a cepa original, a nova cepa causou enterites hemorrágicas mais graves, onde muitos animais entravam precocemente em choque e morriam após os primeiros sinais (CARMICHAEL, 2005). Outra variante antigênica emergiu em 1984 nos EUA, sendo nomeado de parvovírus canino tipo 2b (CPV-2b) (PARRISH et al., 1988). Atualmente a maioria dos trabalhos que são publicados sobre o parvovírus canino, envolve a capacidade de mutação e evolução do parvovírus (BUONAVOGLIA et al., 2001; MARTELLA et al., 2005). Seguindo esta idéia, nova cepa foi identificada na Itália, Vietnã e Espanha (MARTELLA et al., 2004; NAKAMURA et al., 2004; DECARO et al., 2006a; DECARO et al., 2006b). Este parvovírus mutante, o parvovírus tipo 2 Glu-426, que também foi denominado de CPV-2c, consiste na substituição de apenas um aminoácido, do aminoácido Asp-426 pelo Glu-426 (NAKAMURA et al., 2004).

Durante anos a origem do parvovírus canino tem sido discutida. Uma possibilidade inicial é que o CPV-2 tenha surgido de uma mutação do parvovírus felino (vírus da panleucopenia felina) (PARRISH, 1995). A evolução do CPV-2 a partir do FPV é reforçada pela similaridade genética entre os dois vírus, cerca de 99% do DNA é igual (HUEFFER; PARRISH, 2003). A diferença genética entre o parvovírus felino, a primeira cepa do parvovírus canino e as variantes do parvovírus (CPV-2a e CPV-2b) é de poucos aminoácidos na proteína VP<sub>2</sub> (MARTELLA et al., 2005). A ampla utilização de vacinas vivas do FPV para a prevenção da panleucopenia felina possibilitou o surgimento da teoria que FPV tenha mutado e originado o parvovírus canino (TRATSCHIN et al., 1982). Entretanto, esta teoria foi abandonada através de estudo genético envolvendo o parvovírus canino e o parvovírus felino (TRUYEN et al., 1998). Atualmente as idéias que o CPV-2 tenha surgido não diretamente do FPV, mas de um parvovírus ancestral muito semelhante ao FPV ou que tenha surgido a partir de um parvovírus de carnívoros são as teorias mais aceitas (CARMICHAEL, 2005).

### **2.2.2 Parvovirose canina**

O parvovírus canino pertence à família *Parvoviridae* e juntamente com FPV foi classificado como pertencente ao subgrupo parvovírus felino (PARRISH, 1995). O CPV-2 é um pequeno vírus com cerca de 20 a 25 nm (parvo = pequeno em latim), apresentando cadeia simples de DNA, de simetria icosaédrica e não envelopado

(SWANGO, 1997; JONES; HUNT; KING, 2000). 2000). O CPV-2 é formado por 60 cópias de proteínas virais do tipo VP<sub>1</sub> e VP<sub>2</sub>, e em alguns casos com proteínas VP<sub>3</sub> e VP<sub>4</sub> (HUEFFER; PARRISH, 2003; PARRISH; KAWAOKA, 2005).

Para sua replicação, o CPV-2 tem a necessidade de parasitar células com maiores taxas de replicação celular, ou seja, em fase de mitose (PARRISH, 1995). Desta forma, pode-se entender o tropismo do CPV-2 por células das criptas intestinais e células precursoras linfóides que possuem uma maior taxa de divisão celular (MCCANDLISH et al., 1981). Quando na forma cardíaca, os cardiomiócitos são infectados pelo CPV-2 por estarem em constante taxa de mitose durante o desenvolvimento do coração (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980).

Assim como os demais parvovírus, o CPV-2 é extremamente estável no ambiente, resiste em meios ácidos e alcalinos (pH de 3-9), podendo sobreviver por meses a anos e até mesmo a condições ambientais adversas de temperatura e umidade (HOSKINS, 1998). Também é um vírus de difícil eliminação por desinfetantes e solventes lipídicos (SWANGO, 1997). Porém são eliminados pelo formaldeído, glutaraldeído e hipoclorito de sódio (água sanitária) (TIMONEY et al., 1988).

### **2.2.3 Epidemiologia**

A parvovirose canina é uma doença viral altamente contagiosa causada pela presença do CPV-2 no ambiente que foi contaminado com material fecal (HOSKINS, 1997). Como facilitadores da transmissão, há participação de vetores do parvovírus canino como o homem, roedores e insetos (HOSKINS, 1997).

A parvovirose canina pode ser observada em qualquer raça de cães, sexo e idade (APPEL et al., 1978; BRUNNER; SWANGO, 1985). Porém, o parvovírus canino acomete mais cães de 6 semanas a 6 meses de idade (HOSKINS, 1998). Esta maior predisposição está relacionada a múltiplos fatores: grande número de células em divisão celular nesta faixa etária, presença de parasitas intestinais e de um incompleto desenvolvimento do sistema imunológico (BRUNNER; SWANGO, 1985). A parvovirose canina também atinge cães no período perinatal, sendo encontrada em animais com menos de 2 semanas (LENGHAUS; STUDDERT, 1982). Vários fatores já foram correlacionados com o aumento da suscetibilidade do CPV-2 em cães. A associação com outra doença, nutrição, temperatura ambiental e condições sanitárias inadequadas foram os fatores mais observados (BRUNNER; SWANGO, 1985).

Adicionalmente, médicos veterinários e criadores de cães com base em estudos epidemiológicos, têm observado que determinadas raças de cães apresentam sinais clínicos mais graves e maior taxa de mortalidade que outras (BRUNNER; SWANGO, 1985). Um estudo retrospectivo envolvendo 228 cães de raça com parvovirose canina revelou que as raças Rottweiler e Dobermann, foram as mais acometidas (GLICKMAN et al., 1985). Contudo, outras raças, como Labrador Retriever, Husky Siberiano e Greyhound também tiveram sua sensibilidade mencionada (BRUNNER; SWANGO, 1985; SWANGO, 1997).

Em infecções naturais, o CPV-2 tem sido identificado, além dos cães domésticos também em cães do mato, guaxinins, coiotes, raposas e lobos (EVERMANN et al., 1980; MANN et al., 1980; NETTLES et al., 1980; STEINEL et al., 2001; FRÖLICH et al., 2005). A infecção experimental foi obtida também em furões e doninhas, entretanto estas infecções são autolimitantes (HOSKINS, 1998). A cepa original (CPV-2) não possui a capacidade de infectar os gatos, porém os novos tipos (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c) ocasionam a doença em gatos domésticos e felinos selvagens (MOCHIZUKI et al., 1996; NAKAMURA et al., 2001; EVERMANN; ABBOTT; HAN, 2002). Estudo retrospectivo em gatos domésticos com panleucopenia felina determinou que menos de 5% dos animais acometidos apresentavam infecção pelo CPV-2 (TRUYEN; PLATZER; PARRISH, 1996). Estas infecções interespecies demonstram a evolução viral, como resultado o CPV-2 ganhou a capacidade de infectar e multiplicar-se em células de felinos (SHACKELTON et al., 2005).

A cepa original (CPV-2) foi quase que completamente substituída pelos novos tipos antigênicos, porém a proporção entre CPV-2a e CVP-2b variam entre diferentes países (YBAÑEZ et al., 1995; CHANG; CHAN; PAN, 1996, GREENWOOD et al., 1996; YILMAZ; PRATELLI; TORUN, 2005). Na Espanha, é encontrada distribuição similar, entre CPV-2a e CVP-2b, em amostras obtidas durante a década de noventa (YBAÑEZ et al., 1995). A mesma investigação dos tipos de parvovírus canino foi realizada na Alemanha, sendo o tipo antigênico mais encontrado o CPV-2a (72,8%), seguido pelo CPV-2b (26%) e apenas 1,2% pelo CPV-2 (TRUYEN; PLATZER; PARRISH, 1996). Na Itália, avaliações genéticas demonstraram que 89 a 92% dos cães avaliados apresentaram o CPV-2a e os outros casos de cães com parvovirose canina o CPV-2b, desta forma não mais sendo diagnosticada a cepa original (SAGAZIO et al., 1998; BATTILANI et al., 2002). Tais distribuições diferem das encontradas nos EUA, Canadá e no Brasil, pois o CPV-2b foi o parvovírus canino mais encontrado (PARRISH

et al., 1991; PEREIRA et al., 2000). Um estudo mais recente, realizado no Brasil, apontou que o CPV-2b foi identificado em 97,5% e o CPV-2a em 2,5% dos cães com parvovirose canina no Estado do Rio de Janeiro (COSTA et al., 2005).

Estas mudanças antigênicas que ocorreram a partir da cepa original do parvovírus canino (CPV-2) são atribuídas a adaptações genéticas do parvovírus para replicar e espalhar-se mais eficientemente (HOSKINS, 1997). Em comparação com a cepa original (CPV-2), os tipos atuais se ligam mais eficientemente aos receptores do parvovírus canino nas células com alta taxa de mitose (HUEFFER; PARRISH, 2003).

#### **2.2.4 Patogenia**

O parvovírus canino atinge células com alta taxa de replicação celular (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). Na célula, o CPV-2 liga-se aos receptores (*canine transferrin receptor – TfR*) que estão em grande quantidade nas células com alta taxa de mitose (PARRISH, 1995). Assim como os outros parvovírus, o CPV-2 realiza sua replicação no núcleo da célula parasitada somente quando esta se encontra na fase S do ciclo de divisão celular, utilizando a DNA polimerase do seu hospedeiro para a síntese do seu DNA (HULLINGER et al., 1998; JONES; HUNT; KING, 2000). O parvovírus canino é um agente viral citocida, provocando a lise da célula infectada (JONES; HUNT; KING, 2000). Desta forma, a necrose em órgãos linfóides e no epitélio intestinal dos cães está associada à predileção do CPV-2 em atingir células com alta taxa de mitose em função da reposição constante de células nestes locais (PARRISH, 1995).

A transmissão da parvovirose canina ocorre através da via fecal-oral (SWANGO, 1997). Com a utilização de estudos experimentais foi possível determinar a distribuição do CPV-2 através de isolamento viral, onde se estabeleceu que após a entrada do vírus pela cavidade oral, o parvovírus realiza a sua primeira replicação na orofaringe, tonsilas e linfonodos mesentéricos (MEUNIER et al., 1985a). A viremia é observada entre 24 e 48 horas após a infecção, atingindo seu pico no quarto dia (POLLOCK, 1984; MEUNIER et al., 1985a, CARMAN; POVEY, 1985a). Após a viremia, o CPV-2 é isolado após o terceiro dia de infecção no timo, intestino delgado e em diferentes órgãos (MEUNIER et al., 1985a). Entre o quarto e quinto dias pós-inoculação, o CPV-2 foi encontrado em grande quantidade nas criptas intestinais e em diferentes órgãos (MEUNIER et al., 1985a). Outro estudo experimental que utilizou a

imunoistoquímica para detecção do CPV-2 encontrou o timo como o primeiro local de replicação viral após um dia de inoculação oral e posteriormente com replicação em outros órgãos linfóides (baço, linfonodos e intestino associado com órgãos linfóides) no segundo dia após inoculação (MACARTNEY et al., 1984a). A identificação viral nas fezes através do isolamento é primeiramente observada após o quarto dia de infecção, não sendo mais isolado após o nono dia de inoculação (MEUNIER et al., 1985b; CARMAN; POVEY, 1985a).

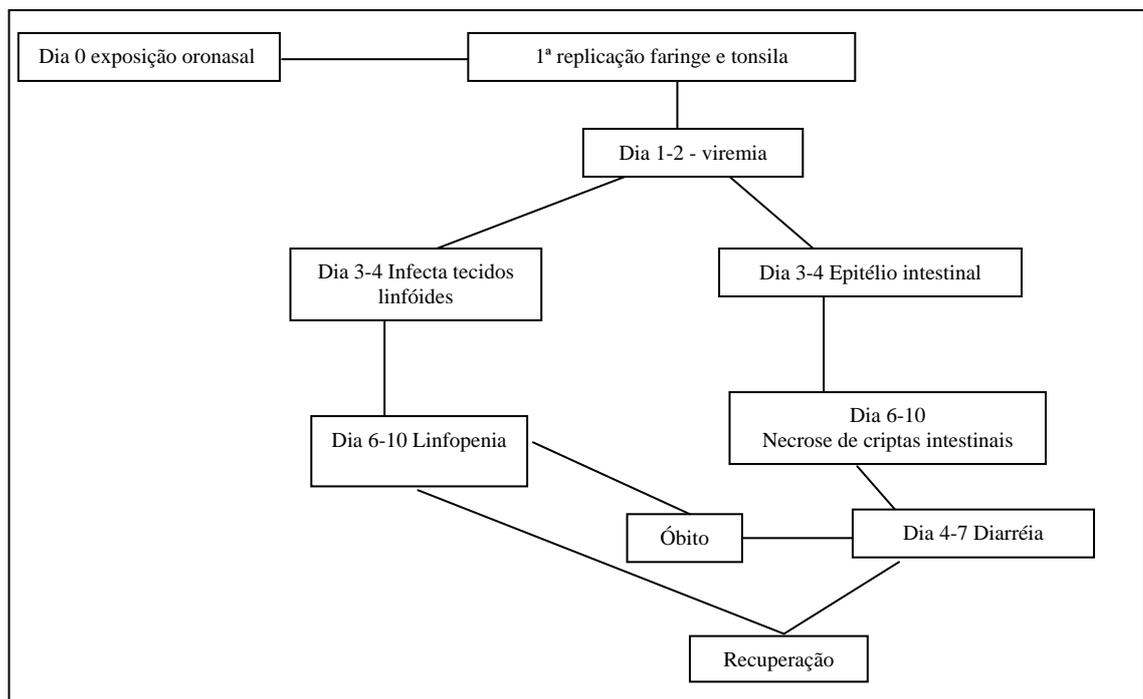


Figura 1 – Patogênese e distribuição do CPV-2. Adaptação de Hoskins (1998). In: Greene, C.E. (Ed.) Infectious diseases of the dog and cat.

### 2.2.5 Sinais clínicos

A maioria das infecções pelo parvovírus é subclínica nos cães (POLLOCK, 1984). Porém, na presença de sinais clínicos, duas importantes formas de infecção são descritas pelo CPV-2: a gastroenterite e a miocardite (BATTERSBY; HARVEY, 2006). O primeiro tipo de infecção identificado foi a gastroenterite pelo CPV-2, que se caracteriza por um rápido aparecimento de diarreia, associada com vômitos, anorexia, apatia e letargia (MEUNIER et al, 1981; SWANGO, 1997). Os vômitos normalmente são intensos e de difícil controle por medicações, apresentando-se de coloração clara e

de consistência mucóide (EUGSTER; BENDELE; JONES, 1978). A diarreia pode se apresentar de diferentes formas, onde são identificadas fezes de cor amarela, hemorrágica ou com estrias de sangue (APPEL et al, 1978; MCCANDLISH et al., 1981). Normalmente é identificada uma diarreia de odor desagradável e em alguns casos esta diarreia pode ser em “arco” (diarreia projetada) (APPEL et al, 1979). Com a progressão da diarreia e vômito é observada uma acentuada desidratação, apresentando-se o cão com olhos fundos e com perda da elasticidade cutânea (TIMONEY et al., 1988; DECARO et al., 2005a).

Alterações na temperatura retal são identificadas. É observado hipertemia pelo processo inflamatório viral e/ou processo bacteriano secundário, assim como uma hipotermia quando o canino se apresenta em estado de choque (POLLOCK, 1982). Outros sinais clínicos que poderão ser observados são: mucosas oral e oculares pálidas e diminuição da condição corporal (APPEL et al., 1979; HARCOURT; SPURLING; PICK, 1980). Em caninos com uma gastroenterite leve, a recuperação pode ocorrer em 24 a 48 horas mesmo sem algum tipo de tratamento (SWANGO, 1997). Nos casos mais graves, principalmente nos cães com diarreia hemorrágica, a recuperação é mais prolongada (3 a 5 dias) e em alguns casos a morte pode ocorrer em menos de 24 horas (SWANGO, 1997).

A miocardite pelo parvovírus canino afeta principalmente cães de 3 a 8 semanas de idade (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980). Esta lesão no miocárdio pelo CPV-2 também foi observada em cães com mais de 9 semanas de idade (MULVEY et al., 1980). Normalmente os caninos acometidos apresentam morte súbita, entretanto certos cães manifestam um breve episódio de agitação, choro ou dispnéia durante poucas horas antes da morte (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980; CARPENTER et al., 1980; HOSKINS, 1997). Com a utilização de eletrocardiograma, arritmias ventriculares são detectadas (CARPENTER et al., 1980; ROBINSON; WILCOX; FLOWER,). Sinais digestivos podem ser observados associados à forma cardíaca, podendo o cão apresentar sinais iniciais de náusea, anorexia, vômito e diarreia precedendo a uma morte súbita pela miocardite (MULVEY et al., 1980; ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980; HOSKINS, 1997). Outros sinais observados foram febre, convulsões e secreções orais e nasais nos casos de miocardite pelo CPV-2 (MULVEY et al., 1980).

### **2.2.6 Alterações hematológicas e bioquímicas**

Anormalidades hematológicas graves são encontradas. O achado mais característico é uma leucopenia associada a uma grave linfopenia, como consequência da necrose de diferentes centros linfóides (MASON; GILLET; MUGGENBURG, 1987; SWANGO, 1997). Como consequência da perda sangüínea intestinal, uma severa anemia é observada em alguns casos (JACOBS et al., 1980). Em estudos experimentais com cães inoculados com CPV-2, leucocitose e neutrofilia foram identificadas somente nos primeiros dias de infecção, até os 5 dias após inoculação (CARMAN; POVEY, 1985a). No período de recuperação, os caninos também apresentaram leucocitose com desvio à esquerda como consequência da regeneração dos tecidos linfóides (JACOBS et al., 1980; CARMAN; POVEY, 1985a).

Alterações bioquímicas mais comumente observadas são: hipoalbuminemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, hiponatremia, hipocalcemia e azotemia pré-renal como consequência de uma hipovolemia (JACOBS et al., 1980).

### **2.2.7 Prevenção**

Na prevenção da parvovirose canina, inúmeras vacinas (vivas e inativadas) foram desenvolvidas e diferentes programas de vacinações têm sido recomendados (SWANGO, 1997). Com a utilização da vacinação, controlou-se parcialmente o problema transformando uma pandemia inicial em uma endemia bem controlada (TRUYEN, 2006). Além da proteção durante vários meses, o programa de vacinação da parvovirose canina trouxe benefícios também para os cães recém-nascidos, pois as mães vacinadas repassam anticorpos maternos pelo colostro, diminuindo assim o número de casos no período de 2 meses de idade com a imunidade passiva (TIMONEY et al., 1988). Porém, a variação do nível e duração destes anticorpos, ocasionam a dúvida de qual momento de realizar a vacinação. A vacina quando aplicada acaba anulando os anticorpos maternos, ou se for aplicada tardiamente (depois de 2 meses) os cães com baixo nível de anticorpos maternos transferidos ficam desprotegidos até o início da estimulação da imunidade com a vacinação (WANER et al., 1996; TRUYEN, 2006). As vacinas utilizadas na prevenção da parvovirose canina são produzidas a partir da cepa

original (CPV-2), sendo sua eficácia comprovada para a prevenção das cepas CPV-2a e CPV-2b (GREENWOOD et al., 1995, YULE et al., 1997). Novas vacinas foram licenciadas na Europa com os novos tipos (CPV-2a e CPV-2b), que resultarão numa proteção mais específica reduzindo o número de casos (TRUYEN, 2006).

Atualmente na Europa, a eficácia da vacina para a prevenção da parvovirose canina tem sido discutida pelo aumento de número de casos (ATKINSON, 2006, SKETCHLEY, 2006). Foi sugerido que o aumento na incidência de casos de parvovirose canina possa estar relacionado com uma menor utilização de programas de vacinações, a menor duração da vacina ou ligada ao surgimento de novos tipos de CPV-2 (ATKINSON, 2006, SKETCHLEY, 2006).

## **2.2.8 Achados Patológicos**

### **Alterações macroscópicas**

A alteração externa mais comumente observada durante a necropsia em caninos acometidos por CPV-2 é a visualização de mucosas pálidas (oral e oculares) como resultado da perda sangüínea no intestino delgado (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). Como sinal de desidratação, olhos fundos são identificados em cães que apresentaram uma grave perda hídrica como consequência de vômitos e diarreia (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). A diminuição da condição corporal, normalmente acentuada, é identificada como consequência da anorexia e dos graves sinais gastrointestinais, vômitos e diarreia (HARCOURT; SPURLING; PICK, 1980). A presença de conteúdo fecal na região posterior, principalmente na região perineal, pode ser observada como um indício de diarreia (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993).

No exame interno da cavidade abdominal, um achado comum e característico é observado no baço. Apresentando-se aumentado e com sua superfície com diferentes colorações, intercalando áreas claras e escuras (MACARTNEY et al., 1984b). Inúmeras alterações são encontradas na serosa e mucosa do intestino delgado. A serosa se apresenta levemente rugosa devido a uma efusão fibrinosa superficial (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). Hiperemia da serosa do intestino é identificada em diferentes graus e em padrão segmentar ou difuso (KRUININGEN, 1998). As lesões na serosa do intestino delgado são mais observadas no jejuno e íleo, sendo que em casos mais acentuados podem ser identificadas também no duodeno (MEUNIER et al., 1981).

Na abertura do intestino delgado, a alteração na mucosa de grande importância para o diagnóstico é visualização das placas de Peyer que estão aumentadas e aprofundadas (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). O conteúdo na luz intestinal pode encontrar-se hemorrágico, com coloração amarelada e associada a estrias de sangue ou somente de coloração amarelada (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980). A mucosa do intestino delgado apresenta-se com hiperemia focal ou em extensas áreas de hiperemia, associada em alguns casos com material fibrinoso aderido à mucosa (PLETCHER et al., 1979; ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980). A visualização de uma mucosa sem alterações já foi identificada em um caso de enterite por CPV-2 (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980). Os linfonodos mesentéricos estão aumentados e por vezes de coloração avermelhada (HARCOUT; SPURLING; PICK, 1980; MEUNIER et al., 1985a).

Na avaliação da cavidade torácica, os principais órgãos a serem observados são o timo e coração. O timo se apresenta diminuído de volume, podendo estar atrofiado de grau leve a acentuado, estando nos casos mais severos somente com finos feixes de tecido tímico (NELSON et al., 1979; MEUNIER et al., 1985b).

As tonsilas poderão estar aumentadas e de coloração mais avermelhada (HEADLEY; SAITO, 2003). A medula óssea do fêmur pode estar com consistência mais liquefeita ou encontrar-se sem alterações macroscópicas (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980).

Na avaliação macroscópica cardíaca, cães com miocardite por CPV-2, apresentam áreas pálidas no miocárdio (JEZYK; HASKINS; JONES, 1979). Outros achados macroscópicos observados em cães com miocardite por parvovirose canina foram: dilatação cardíaca, hidropericárdio, efusão pleural, ascite, pulmões aumentados de volume e hepatomegalia (JEZYK; HASKINS; JONES, 1979). A dilatação cardíaca normalmente é generalizada, sendo mais marcante no átrio esquerdo (CARPENTER et al., 1980). A presença de edema em brônquios, traquéia e na superfície de corte pulmonar foram identificadas e relacionadas como consequência de alterações circulatórias da miocardite por CPV-2 (CARPENTER et al., 1980).

### **Alterações microscópicas**

No intestino delgado, a presença do parvovírus canino ocasiona uma grave enterite necrótica (NELSON et al., 1979). Consiste na identificação de necrose de

células epiteliais que formam as vilosidades intestinais, provocando a fusão das mesmas com perda da diferenciação entre a lâmina própria e o epitélio intestinal (NELSON et al., 1979; MEUNIER et al., 1981; MEUNIER et al., 1985b). Em casos acentuados de enterite necrótica pelo CPV-2, atrofia de vilosidades intestinais são identificadas (ROBINSON; HASKINS; JONES, 1980). Na comparação entre segmentos intestinais, lesões mais graves foram identificadas no jejuno e íleo (NELSON et al., 1979). Em um estudo experimental, necrose mais acentuada foi observada em segmentos intestinais onde se apresentavam placas de Peyer (CARMAN; POVEY, 1985b). Muitas das criptas intestinais contêm restos celulares como resultado da necrose de células epiteliais que se acumulam formando um material granular eosinofílico (NELSON et al., 1979; HARCOURT; SPURLING; PICK, 1980). O infiltrado no epitélio intestinal necrosado pode ser mononuclear ou neutrofílico (NELSON et al., 1979; COOPER et al., 1979). A enterite necrótica é acompanhada por congestão de vasos da submucosa e da camada muscular do intestino delgado (PLETCHER et al., 1979). Folículos linfóides que formam placas de Peyer estão comumente acometidos por necrose (CARMAN; POVEY, 1985a). A presença de necrose de linfócitos resulta numa rarefação de folículos, sendo frequentemente identificada pela rarefação de centros foliculares (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980; MEUNIER et al., 1981).

Na avaliação microscópica esplênica, é observada rarefação de folículos linfóides, podendo ter desde necrose de centros foliculares até a destruição destes folículos pela necrose provocada pelo vírus (PLETCHER et al., 1979). Lesões semelhantes ao baço são observadas em linfonodos. Os linfonodos mesentéricos são comumente analisados, sendo observada depleção linfóide de centros foliculares com perda de folículos linfóides como resultado da necrose provocada pelo CPV-2 (MEUNIER et al., 1985a; PLETCHER et al., 1979). Pela reabsorção do sangue perdido no intestino, poderão ser identificadas hemácias e eritrofagocitose em linfonodos mesentéricos (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). No timo é identificada rarefação linfóide, principalmente no córtex; pela necrose acentuada do tecido linfóide perde-se a distinção entre córtex e medula (MEUNIER et al., 1985a). A tonsila também é um órgão acometido pelas alterações linfóides provocadas pelo CPV-2. Achados de necrose de centros foliculares, perda de folículos e hiperplasia de alguns folículos são relatados (HEADLEY; SAITO, 2003). Na medula óssea, precursores mielóides sofrem degeneração e necrose com conseqüente diminuição no número de células linfóides

(BOOSINGER et al., 1982). Alterações degenerativas também foram identificadas em megacariócitos (BOOSINGER et al., 1982).

A microscopia cardíaca pode revelar uma miocardite que se caracteriza por degeneração, necrose de cardiomiócitos associados a infiltrado de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e focos de hemorragia (JEZYK; HASKINS; JONES, 1979; HAYES; RUSSEL; BAIUK, 1979; MEUNIER et al., 1984). Miocardite multifocal acentuada com calcificação e áreas de fibrose também foi associada à ação do CPV-2 (AGUNGPRİYONO et al., 1999).

A presença de corpúsculos de inclusão intranucleares é identificada em células epiteliais intestinais, em células linfóides e no miocárdio de cães com parvovirose canina, porém este achado é considerado raro (APPEL et al., 1978; COOPER et al., 1979; MACARTNEY et al., 1984b). Os corpúsculos intranucleares presentes na parvovirose canina são formados por proteínas virais e agregados de vírions (HULLINGER et al., 1998). O corpúsculo de inclusão do CPV-2 é mais comumente identificado no período de incubação, sendo observado em menor número em cães quando os sinais da parvovirose canina se apresentam acentuados (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). Foi investigada a presença de corpúsculos intranucleares no núcleo de células basais do epitélio estratificado da língua de gatos e cães com parvovirose canina, estando este achado também relacionado à alta taxa de mitose deste epitélio (MATSUI et al., 1993; FAVROT et al., 2000). Os corpúsculos intranucleares também foram observados no endotélio vascular, pulmão, rins, fígado e córtex da adrenal (CARPENTER et al., 1980; LENGHAUS; STUDDERT, 1982).

A infecção do CPV-2 em neurônios encefálicos foi investigada, porém nenhuma marcação viral foi obtida pela técnica de imunistoquímica (URL; SCHMIDT, 2005). Este estudo foi baseado na identificação do CPV-2 infectando neurônios de felinos (URL; SCHMIDT, 2003). Lesão cerebral de leucoencefalomalacia foi encontrada em um cão que apresentou miocardite por CPV-2, onde também não foi identificado o CPV-2 no cérebro, sendo os achados encontrados associados à hipóxia e isquemia em decorrência das lesões cardíacas (AGUNGPRİYONO et al., 1999). Entretanto, outro estudo identificou alta concentração de DNA viral no cérebro, cerebelo e bulbo, sugerindo uma possível replicação do CPV-2 também em neurônios do sistema nervoso central (DECARO et al., 2006d).

### 2.2.9 Patologias associadas à parvovirose canina

Outras patologias poderão ser observadas em cães com parvovirose. No trato digestivo, a identificação de parasitas intestinais ou a presença de intussuscepção são descritas, e quando presentes, certamente agravam o quadro clínico do animal e aumentam o risco de óbito (MASON; GILLET; MUGGENBURG, 1987; RALLIS et al., 2000). A intussuscepção ocorre pela hipermotilidade da enterite, resultando no deslocamento de um segmento do intestino sobre outro (MASON; GILLET; MUGGENBURG, 1987; RALLIS et al., 2000). Infecções por protozoários também poderão estar associadas à infecção por CPV-2, como uma infecção por *Giardia* sp. (BRUNNER; SWANGO, 1985).

Uma infecção fúngica concomitante pode ser observada em cães com parvovirose canina como a associação com *Candida albicans* (ANDERSON; PIDGEON, 1987). Esta presença fúngica é ocasionada pela imunodeficiência (leucopenia) do cão e a utilização de antimicrobianos que acabam alterando a flora gastrointestinal e favorecem a proliferação de fungos (ANDERSON; PIDGEON, 1987).

Co-infecções com parvovírus canino e coronavírus canino (CCV) têm sido observadas, sendo identificadas em 5 a 10% das enterites (APPEL et al., 1978; AMO; APREA; PETRUCCELLI, al., 1999; SAKULWIRA et al., 2003). Infecção grave e fatal por CCV após uma infecção por CPV-2 também foi observada, podendo a coronavirose ter se manifestado com maior intensidade pela menor imunidade desencadeada pela linfopenia provocada pelo CPV-2 (PRATELLI et al., 1999). Um estudo experimental com cães infectados com CCV e CPV-2 observou maior mortalidade no grupo que recebeu os dois tipos virais, sendo sugerido que após uma infecção do CCV ocorre uma intensa regeneração do epitélio intestinal, favorecendo a replicação do CPV-2 que necessita células em mitose (APPEL, 1988). Infecções duplas com CCV e CPV-2 também foram diagnosticadas em coiotes (EVERMANN et al., 1980). Enterite por parvovírus canino em associação a uma encefalite provocada pelo vírus da cinomose canina foi diagnosticada em um cão de quatro meses de idade (HEADLEY; SAITO, 2003).

Alterações pulmonares são identificadas como consequência de uma insuficiência cardíaca congestiva (miocardite por parvovirose) ou associada a

pneumonias bacterianas secundárias (TURK et al., 1990). As pneumonias bacterianas encontradas na infecção por CPV-2 podem ser ocasionadas pela queda da imunidade dos cães em decorrência da linfopenia ou como resultado da entrada de bactérias pelo intestino delgado necrótico (TURK et al., 1990).

Enterites necróticas provocadas pelo parvovírus canino em associação à proliferação de *Clostridium perfringens* provoca um agravamento das lesões entéricas (TURK et al., 1992). Assim como a infecção provocada pelo *Clostridium perfringens*, outras infecções bacterianas secundárias ficam favorecidas pela necrose da mucosa intestinal e pela linfopenia encontrada na parvovirose canina (TURK et al., 1992).

Septicemias também foram diagnosticadas em cães com parvovirose canina, pela presença de bactérias intestinais (KREEGER et al., 1984; TURK et al., 1990). Foi sugerido que a bacteremia tenha origem a partir da necrose do epitélio intestinal, funcionando como uma porta de entrada de bactérias intestinais e também favorecida pela baixa imunidade (KREEGER; JERAJ; MANNING, 1984). Outro estudo descreveu a presença de bacteriúria em 25,6% dos cães analisados que estavam com parvovirose canina, onde segundo os pesquisadores a origem da infecção bacteriana pode estar relacionada à contaminação cutânea perigenital, queda da imunidade (linfopenia) e a bacteremia (KOUTINAS et al., 1998).

### **2.2.10 Métodos complementares de diagnóstico**

Desde a primeira identificação do CPV-2 em 1978, diferentes testes têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da parvovirose canina. As utilizações destes testes são importantes na obtenção de um diagnóstico clínico ou patológico mais específico, principalmente diante de sinais clínicos inespecíficos que não diferenciam a parvovirose canina de doenças como a cinomose canina e a coronavirose.

Para o diagnóstico da parvovirose canina, testes como ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assays*, imunocromatografia e hemaglutinação foram rotineiramente utilizadas com o uso do conteúdo fecal, porém são técnicas laboratoriais com menor sensibilidade (WALKER et al., 1980; DESARIO et al., 2005). Em contrapartida, o isolamento viral tem sido um teste mais sensível que os anteriores, porém necessita de um maior trabalho laboratorial e leva mais tempo para ter o resultado final, cerca de 5 a 10 dias de incubação (MOCHIZUKI et al., 1993). Além de necessitar de exames laboratoriais adicionais (imunofluorescência e hemaglutinação), desta forma é uma

técnica menos atrativa para um diagnóstico *ante-mortem* (MOCHIZUKI et al., 1993). Estudos em casos naturais e experimentais para o diagnóstico da parvovirose canina, demonstraram que a hemaglutinação e o isolamento viral são capazes de fornecer um diagnóstico positivo somente em poucos dias após a infecção, fornecendo em alguns testes falsos negativos (DECARO et al., 2005b). A comparação do teste de ELISA com o diagnóstico realizado por imunofluorescência para a detecção de anticorpos de CPV-2 demonstrou forte correlação na comparação dos resultados (WANER et al., 2003). Entretanto, as presenças de resultados falsos positivos poderão ocorrer pela incapacidade dos testes de ELISA, imunofluorescência e hemaglutinação em diferenciar cepas vacinais de uma infecção (SAGAZIO et al., 1998).

O DNA viral do CPV-2 tem sido utilizado para o diagnóstico da parvovirose canina e para a diferenciação entre as cepas de CPV-2 com o diagnóstico por PCR - *polymerase chain reaction* (UWATOKO et al., 1995; PEREIRA et al., 2000; SAKULWIRA et al., 2003). Mais recentemente foi implantada a técnica de *real-time* PCR, realizando a identificação e quantificação do CPV-2 nas fezes ou órgãos, sendo considerada uma técnica mais específica, sensível e de menor tempo de diagnóstico que o PCR convencional (DECARO et al., 2005b; DECARO et al., 2006b). A comparação da imunocromatografia, isolamento viral, hemaglutinação, PCR e *real-time* PCR como técnicas de diagnóstico do CPV-2, demonstrou maior sensibilidade das técnicas envolvendo DNA (PCR e *real-time* PCR) que os outros testes convencionais (DESARIO et al., 2005). Esta maior sensibilidade também foi encontrada em outro estudo, onde o PCR foi mais sensível que a microscopia eletrônica (SCHUNCK; KRAFT; TRUYEN, 1995). Novas técnicas de PCR têm sido utilizadas para o diagnóstico da parvovirose canina, assim como na diferenciação das cepas vacinais dos diferentes tipos de CPV-2 (2a, 2b e 2c) que estão presentes nas infecções atuais (DECARO et al., 2006c). Além da sensibilidade e especificidade do PCR, a utilização desta técnica ajudará na diferenciação da infecção de uma vacinação recente (DECARO et al., 2006c). Desta forma, soluciona o problema apresentado pelos proprietários quando os cães são vacinados para parvovirose e logo após apresentam uma enterite por CPV-2 ou de outra causa, onde estes poderiam associar a doença como causa direta à vacina (DECARO et al., 2006c).

Complementando o diagnóstico das lesões macroscópicas e histológicas características da parvovirose canina, ou na impossibilidade de definir uma etiologia

pelas lesões apresentadas, têm sido utilizadas diferentes técnicas na identificação do CPV-2 em tecidos.

A primeira técnica amplamente utilizada no diagnóstico *ante-mortem* e *post-mortem*, foi à microscopia eletrônica para identificação viral em tecidos e fezes, sendo de grande importância desde a identificação inicial do CPV-2 em 1978, definindo a presença do parvovírus como novo agente causador de enterites em cães (APPEL et al., 1979; ELSE, 1979).

A hibridização *in situ* também tem sido usada na identificação do DNA do CPV-2 em cortes histológicos, sendo considerada uma técnica com alta sensibilidade e de rápido diagnóstico (WALDVOGEL et al., 1992; NHO et al., 1997). Estudo comparativo entre a hibridização *in situ* e a técnica de imunistoquímica (IHQ) demonstrou uma maior sensibilidade da hibridização *in situ* para a detecção do CPV-2 (WALDVOGEL et al., 1992).

A identificação viral em tecidos do parvovírus pela técnica de imunistoquímica tem sido amplamente utilizada na medicina humana como também em animais domésticos (TAKAHASHI et al., 1995; CARMAN; POVEY, 1985a; JÖNSSON et al., 1988). A imunistoquímica tem sido utilizada como método de diagnóstico complementar da parvovirose canina, assim como em muitos casos funciona como método de diagnóstico definitivo quando as lesões macroscópicas e microscópicas não sugerem nenhum agente viral (CARMAN; POVEY, 1985a; PRATELLI et al., 1999, SVARA et al., 2003).

A imunofluorescência em cortes histológicos também é utilizada na identificação do CPV-2 (NELSON et al., 1979; MEUNIER et al., 1985a, MOOJEN et al., 1992). Em comparação com a técnica de imunistoquímica, a imunofluorescência necessita de uma maior quantidade de equipamentos, um criostato e um microscópio de fluorescência (MACARTNEY; MACARTNEY, 1986). Na comparação da imunistoquímica com a imunofluorescência, melhor definição da marcação viral foi obtida com a técnica de imunistoquímica, possibilitando uma diferenciação da localização do antígeno viral, intranuclear ou intracitoplasmático (MACARTNEY; MACARTNEY, 1986).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Procedimentos Gerais**

Este trabalho iniciado em março de 2005 e com término em novembro de 2006, teve como objetivo descrever os achados patológicos e dados epidemiológicos de cães com parvovirose canina necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Os cães utilizados no estudo morreram após infecção natural pelo CPV-2. Foram utilizados caninos provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS), clínicas veterinárias da região de Porto Alegre e cães encaminhados por proprietários desta região.

#### **3.2 Procedimentos de Necropsia**

Na necropsia os animais que apresentaram achados macroscópicos caracterizados por baço com áreas claras intercaladas por áreas escuras, hiperemia do intestino delgado, aumento das placas de Peyer, linfonodos mesentéricos aumentados e atrofia de timo foram selecionados. As lesões macroscópicas sugestivas de parvovirose canina foram identificadas e analisadas. Fragmentos de intestino delgado, timo, baço, linfonodo mesentérico, tonsila, medula óssea, língua, coração e pulmão foram coletados e fixados em formalina a 10% entre 24 a 48 horas (MACARTNEY; MACARTNEY, 1986). Amostras de sangue foram coletadas através da punção intracardíaca do ventrículo direito, e encaminhadas para cultivo bacteriano aeróbio no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Dados referentes à idade, sexo e raça dos caninos foram registrados.

#### **3.3 Análise histológica**

Amostras dos órgãos coletados durante a necropsia, após fixação em formalina a 10%, foram processadas rotineiramente para a análise histológica e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET et al., 1992). As lesões microscópicas

apresentadas pelos cães com achados patológicos de parvovirose canina foram identificadas e registradas.

### 3.4 Imunoistoquímica

O exame imunoistoquímico foi realizado em cortes de intestino delgado (preferencialmente segmento do íleo juntamente com a placa de Peyer), linfonodo mesentérico, timo, baço, tonsila, língua e medula óssea em todos os 96 casos selecionados. O exame de imunoistoquímica foi realizado em somente um corte de cada órgão.

Inicialmente foi realizada a padronização da técnica de imunoistoquímica, método de diagnóstico até então não estabelecido para esta doença no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. A padronização teve por objetivo estabelecer o melhor método de visualização do parvovírus canino nas amostras a serem testadas. Para o estabelecimento da padronização foram utilizados casos de infecções naturais por parvovírus canino diagnosticados previamente pelo SPV-UFRGS através das lesões histológicas características desta infecção.

Cortes histológicos seriados de fragmentos de intestino delgado de 4µm de espessura foram aplicados sobre lâminas recobertas com solução de gelatina 0,3% e fixados a 60°C durante 24 horas.

Após a remoção da parafina mediante imersão em xilol, foi feita reidratação dos cortes com graduações de álcool. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio a 3% durante 20 minutos, à temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram lavadas com água destilada e submetidas ao procedimento de recuperação antigênica.

Na recuperação antigênica do antígeno de parvovírus canino, foram testados dois tipos de recuperações enzimáticas. A primeira substância testada foi a tripsina (Gibco-Invitrogen) em conjunto com a utilização de calor por microondas. A outra substância testada foi a protease XIV (Sigma-Aldrich). Os cortes histológicos foram tratados com tripsina 0,1% (1mg/ml) em PBS (pH 7,4) por 15 minutos a 37°C em câmara úmida. Após lavagem com PBS foram colocadas em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) durante dois minutos em forno de microondas doméstico a 1600 w (potência máxima). A protease XIV foi utilizada a 0,05% em PBS (pH 7,4) e incubada por 15 minutos a 37°C em câmara úmida.

Após submeter os cortes à ação enzimática, realizou-se o bloqueio de reações inespecíficas, utilizando-se leite desnatado a 5%. O reagente para bloqueio foi diluído em água destilada. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas histológicas foram lavadas em água destilada para aplicar o anticorpo primário.

Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário produzido em camundongo anti-parvovírus canino e felino (Serotec–MCA 2064) sendo testadas as seguintes diluições 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:1500 diluído em PBS. O anticorpo foi incubado sobre o tecido por 14 a 16 horas (*overnight*) a 4°C. Após foi realizada lavagem com água destilada, sendo os cortes incubados durante 20 minutos com anticorpo secundário biotinalado e posteriormente com a solução de streptavidina conjugada com peroxidase por 20 minutos a temperatura ambiente. A revelação da marcação foi obtida através da utilização do cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB-Dako) por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente. Antes de aplicar nos cortes, 0.6ml de DAB foi misturado com 0,4ml de solução de PBS (PROPHET et al., 1992) e 25µl de peróxido de hidrogênio. Solução de hematoxilina (PROPHET et al., 1992) foi empregada como contracorante, por aproximadamente 1 minuto. Controles negativos foram utilizados com a substituição do anticorpo primário pela solução de PBS. Como controle positivo foi utilizado corte histológico de intestino delgado com enterite necrótica e resultado imunoistoquímico de infecção por parvovírus canino.

Protocolo imunoistoquímico utilizado no estudo para o diagnóstico de CPV-2:

1. Xilol I e II por 20 minutos cada;
2. Álcool 100% 2min;
3. Álcool 96% 2min;
4. Álcool 80% 2min;
5. Álcool 70% 2min;
6. Água destilada;
7. Peróxido de Hidrogênio 3% diluído em água destilada por 20 minutos (temperatura ambiente);
8. Lavar com água destilada;
9. Recuperação antigênica: Protease XIV 0,05% (Sigma) diluída em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente;
10. Lavar em água destilada;
11. Bloqueio de reações inespecíficas: leite desnatado 5% (diluir em PBS ou água destilada) por 15 minutos em temperatura ambiente;
12. Lavar em água destilada;
13. Anticorpo primário anti-parvovírus (MCA 2064 *mouse anti -parvovirus feline and canine*, Serotec): 1/1000 diluído em PBS; overnight durante 14 a 16 horas (4°C em refrigeração). Usar 100ul/lâmina;

14. Lavar com água destilada;
15. Gotas amarelas (anticorpo secundário biotinalado-Dako) 20 minutos temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
16. Lavar com água destilada;
17. Gotas vermelhas (streptavidina-Dako) por 20 minutos em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte);
18. Lavar com água destilada;
19. Cobrir com DAB-Dako (0.6ml de DAB + 0.4ml PBS + 25 microlitros H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Deixar por 5-10 minutos em temperatura ambiente;
20. Lavar em água destilada;
21. Contracorar com hematoxilina (um minuto);
22. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100% por 2 minutos cada;
23. Xilol III e IV por 15 minutos cada um, depois montar a lâmina.

### 3.5 Análise estatística

Para verificar a associação entre a autólise do intestino delgado e o resultado no exame imunoistoquímico do intestino delgado foi realizado o teste exato de Fisher.

A razão de chances de positividade por órgãos foi calculada para verificar o quanto um órgão é superior na performance da imunoistoquímica. A seguinte fórmula para o cálculo da razão de chances foi utilizada:

$$\frac{p*(1-q)}{q*(1-p)}$$

$p$ =freqüência do primeiro grupo (IHQ positiva)  
 $q$ =freqüência do segundo grupo (IHQ negativa)

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dados Gerais

Durante o período de março de 2005 a novembro de 2006 foram necropsiados 1002 cães pelo SPV-UFRGS. Destes caninos, 103 caninos apresentaram achados macroscópicos e histológicos sugestivos de parvovirose canina. Para realização deste estudo foram utilizados 96 caninos. A idade dos cães (n=78) variou de 30 dias a 11 meses (média=3,32 ± 1,9) (figura 2). Em 80,77% (63/78) dos cães necropsiados a idade foi menor que 5 meses de idade.

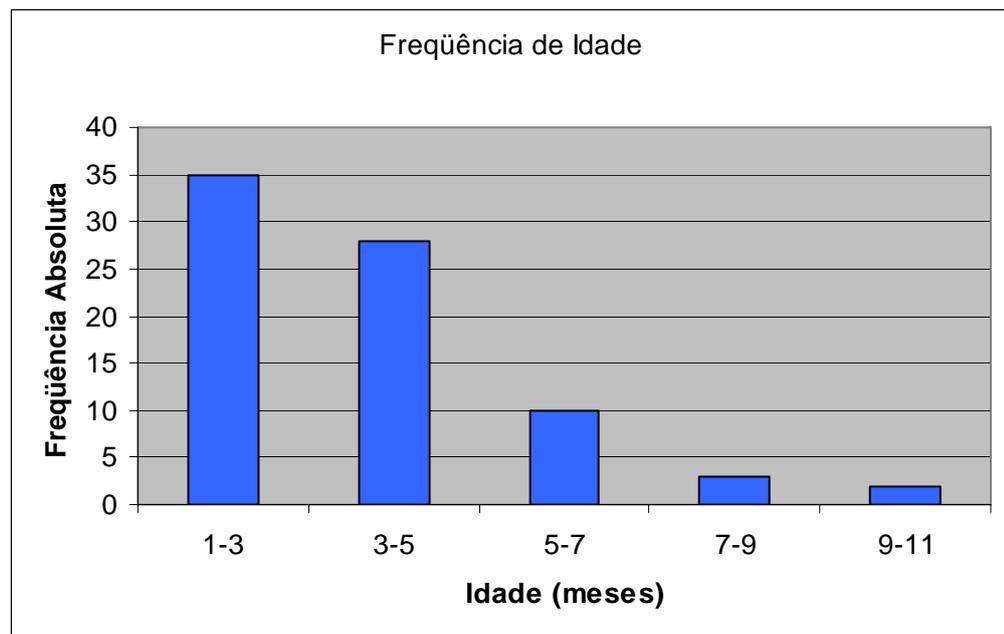


Figura 2 – Distribuição por faixa etária de 78 cães necropsiados com parvovirose canina que apresentaram a informação da idade.

Dos cães necropsiados, 31,25% (30/96) eram SRD (sem raça definida). A raça mais identificada em 12,5% (12/96) dos casos foi a Poodle, seguida pela Rottweiler com 10,44% (10/96) das necropsias. A distribuição por raça dos cães com parvovirose canina está apresentada na tabela 1. A distribuição por sexo demonstrou no presente estudo que 54% (52/96) eram fêmeas e 46% (44/96) eram machos.

Tabela 1 – Identificação e frequência dos cães sem raça definida e com raça definida observadas nas 96 necropsias de caninos com parvovirose canina.

Raça	Número de animais	Frequência (%)
Sem raça definida	30	31,25
Poodle	12	12,50
Rottweiler	10	10,44
Shitzu	6	6,25
Dachshund	5	5,22
Labrador	5	5,22
Yorkshire	4	4,16
Beagle	2	2,08
Boxer	2	2,08
Chow-Chow	2	2,08
Lhasa Apso	2	2,08
Pug	2	2,08
Mastin	2	2,08
Pinscher	2	2,08
Maltês	1	1,04
Akita	1	1,04
American Staffordshire Terrier	1	1,04
Buldogue Campeiro	1	1,04
Bull Terrier	1	1,04
Cocker	1	1,04
Pequinês	1	1,04
Pit Bull	1	1,04
Sharpei	1	1,04
Weimaraner	1	1,04
Total	96	100

#### 4.2 Achados macroscópicos

A análise macroscópica dos cães evidenciou que as lesões mais observadas foram o aumento de placas de Peyer e a hiperemia do intestino delgado (tabela 2).

Tabela 2 – Frequência das lesões sugestivas de parvovirose canina em cada órgão analisado dos cães necropsiados no SPV-UFRGS.

Órgão	(%)	Macroscopia
Intestino delgado	83/96 (86,4)	Aumento da placa de Peyer
	82/96 (85,4)	Hiperemia da serosa e mucosa
Linfonodo mesentérico	79/96 (82,3)	Aumentado
Timo	62/94 (65,9)	Atrofia
Baço	56/96 (58,3)	Áreas claras intercaladas por áreas escuras
Coração	15/96 (15,6)	Coloração pálida

No intestino delgado, em grande parte dos casos analisados a hiperemia da serosa atingia tanto o jejuno quanto ao íleo (figura 3), sendo raramente identificada no duodeno. Na serosa do intestino delgado, também ficou evidente o aspecto rugoso, sendo também observadas áreas pálidas circulares no bordo antimesentérico que na abertura correspondiam à presença de placas de Peyer. A hiperemia da mucosa não se apresentou como um achado constante, não sendo observada em todos os casos ou encontrada em somente em alguns segmentos (figura 4 e 6). Alguns cães apresentavam material fibrinoso aderido à mucosa (figura 4), sendo este achado observado em 8,3% (8/96) das necropsias. Dos 96 cães necropsiados com achados patológicos sugestivos de uma infecção por parvovirose canina, 87,5% (84/96) apresentaram diarreia. A observação de conteúdo hemorrágico na luz do intestino delgado (figura 5), cólon ou reto foi identificada em 50% (48/96) dos cães.

As alterações de placas de Peyer caracterizavam-se por aumento discreto a acentuado destes centros linfóides associado em muitos casos com uma depressão destes locais (figura 6).



Figura 3 – Canino, macho, SRD com infecção por CPV-2. Intestino delgado com hiperemia da serosa e linfonodos mesentéricos com coloração vermelha.

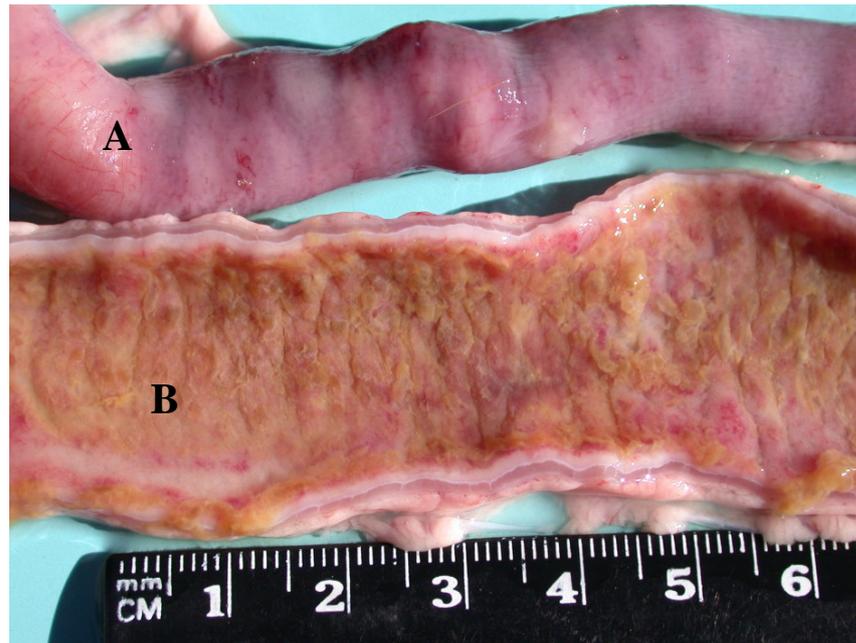


Figura 4 – Canino, macho, SRD com infecção por CPV-2. Hiperemia acentuada na serosa do intestino delgado (A) e grande quantidade de fibrina aderida à mucosa intestinal hiperêmica (B).



Figura 5 – Canino, fêmea, Beagle com infecção por CPV-2. Conteúdo hemorrágico na luz do intestino delgado.

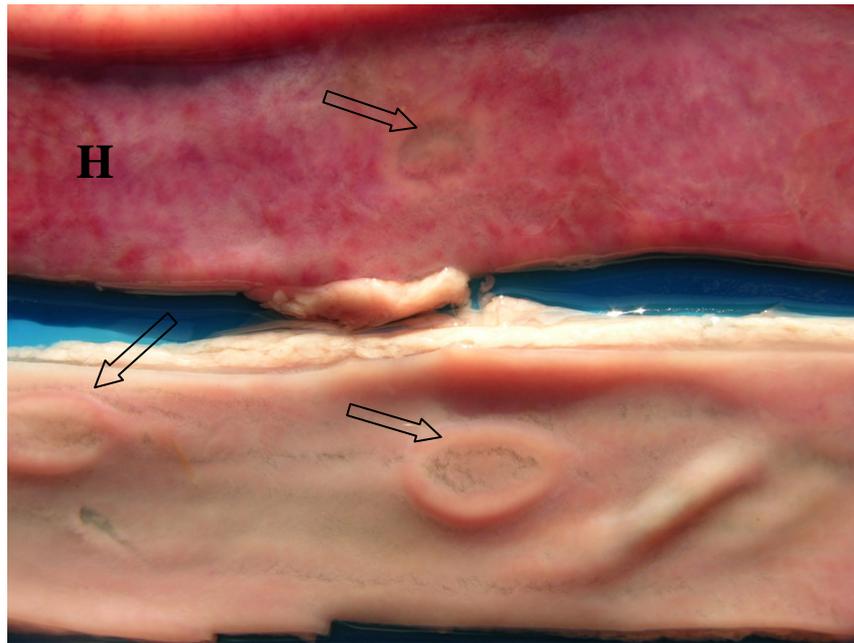


Figura 6 – Canino, Fêmea, Rottweiler com infecção por CPV-2. Hiperemia intestinal acentuada (H) e aumento e depressão de placas de Peyer (setas).

O aumento de linfonodos mesentéricos foi um achado comumente observado (tabela 2), sendo a coloração avermelhada visualizada em 23,9% (23/96) dos casos (figura 3).

No baço, a alteração macroscópica mais encontrada foi a visualização de áreas pálidas intercaladas por áreas escura (tabela 2), que era caracterizado por áreas claras intercaladas com áreas mais escuras em sua superfície (figura 7). Além deste achado, o baço também se apresentou aumentado em 58,3% (56/96) dos casos analisados.



Figura 7 – Canino, fêmea, SRD com infecção por CPV-2. Baço com áreas claras e escuras na superfície.

A atrofia tímica foi o achado macroscópico mais observado no timo durante as necropsias (tabela 2). Atrofias tímicas de diferentes intensidades foram visualizadas, porém a atrofia acentuada teve um predomínio sobre as demais. Outros achados observados no timo foram: a visualização de petéquias, presença de uma cor mais avermelhada e um aumento discreto deste órgão.

Na avaliação macroscópica do coração, foi evidenciada coloração pálida na superfície epicárdica em 15,62% (15/96) dos animais, entretanto não foi identificado nenhum aumento de câmaras cardíacas ou outra alteração. A análise pulmonar dos cães necropsiados identificou a presença de enfisema agudo nas bordas, áreas avermelhadas de diferentes intensidades e edema na superfície de corte pulmonar.

### Achados microscópicos

As lesões microscópicas sugestivas de parvovirose canina foram observadas em um grande número na tonsila, timo e baço (tabela 3).

Tabela 3 – Frequência das lesões histológicas em cada órgão analisado nos 96 cães com parvovirose canina necropsiados no SPV-UFRGS.

Órgão	Frequência (%)	Lesão
Tonsila	91/92 (98,9)	Rarefação linfóide
Timo	91/94 (96,8)	Rarefação linfóide
Baço	92/96 (95,8)	Rarefação linfóide
Medula óssea	72/91 (79,1)	Rarefação linfóide
Intestino delgado	71/96 (73,9)	Necrose do epitélio
	58/84 (69,0)	Rarefação de placa de Peyer
Linfonodo mesentérico	61/96 (63,5)	Rarefação linfóide
Pulmão	28/96 (29,1)	Pneumonia intersticial
Coração	0/96 (0)	Ausência de lesões

As lesões histológicas observadas nas tonsilas foram caracterizadas pela perda de linfócitos dos centros germinativos foliculares, e em casos mais acentuados, ocorreu a perda de grande número de folículos linfóides. Principalmente em folículos linfóides, foram visualizadas células linfóides em processo de necrose, identificando-se picnose e cariorrexis de linfócitos. Hiperplasia de folículos linfóides foi identificada em 13,8% (13/94) das tonsilas analisadas.

No timo, a análise histológica revelou atrofia acentuada do tecido linfóide em grande parte dos animais (tabela 3), com perda de linfócitos do córtex que em muitos casos resultou na perda da distinção entre córtex e medular (figura 8). Em certos casos a atrofia tímica estava associada a edema nos septos interlobulares, focos de hemorragia e congestão. Na ausência de atrofia do timo, raras células linfóides em processo de necrose foram identificadas.

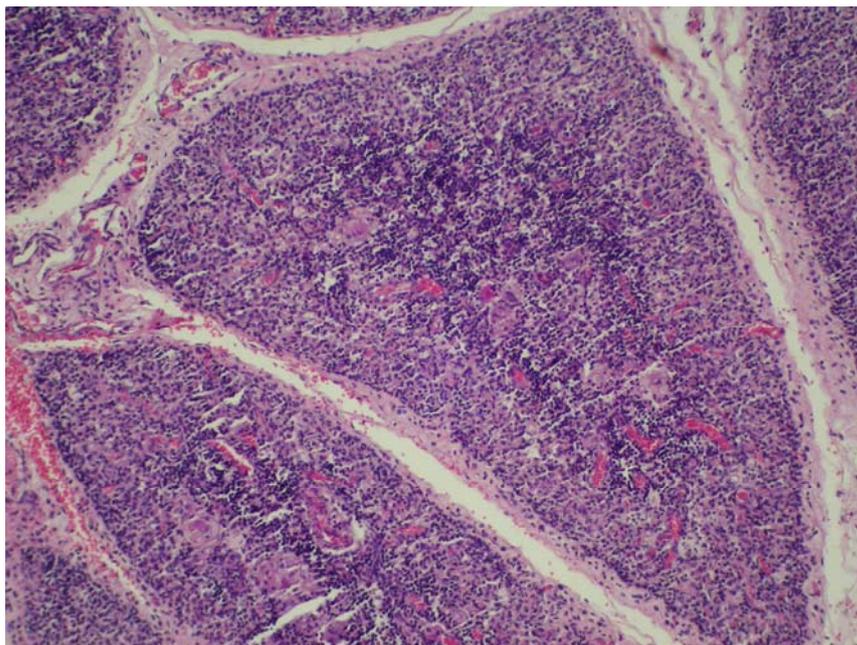


Figura 8 – Canino, macho, Poodle com infecção por CPV-2. Atrofia acentuada do timo com perda da diferenciação entre córtex e medular. Coloração de hematoxilina e eosina – 200X.

No baço, rarefações acentuadas de folículos linfóides esplênicos foram comumente identificadas (tabela 3). Foram observadas diminuições no número de células no interior de folículos linfóides e, em boa parte dos casos, com perda de um grande número de folículos linfóides. Congestão do baço também foi identificada em alguns animais.

Lesões microscópicas em linfonodos mesentéricos se caracterizaram por rarefações de folículos linfóides com a visualização de células linfóides necróticas, diminuição do número de células nos centros de folículos e em casos mais acentuados com perda da estrutura folicular. Em alguns animais somente foi observada hiperplasia de folículos linfóides. Na microscopia de linfonodos mesentéricos também se identificou a presença de hemácias e eritrofagocitose.

No intestino delgado, a enterite necrótica apresentou-se em grau acentuado na grande maioria dos casos (figura 9). Como resultado desta necrose, foi observada a fusão das vilosidades intestinais, perdendo a diferenciação entre o epitélio intestinal e a lâmina própria, além da visualização do encurtamento das vilosidades. Enterite mononuclear não acompanhada de necrose de vilosidades intestinais foram observadas. A presença de infiltrado inflamatório misto foi mais identificada, sendo também observado um infiltrado inflamatório purulento e em outros casos um infiltrado

mononuclear. Bactérias quando presentes se localizavam no ápice das vilosidades, estando associadas com grande quantidade de fibrina e neutrófilos. Pela necrose de criptas intestinais, células epiteliais descamadas, picnose e cariorrexia foram identificadas. A identificação de corpúsculos intranucleares foi investigada no epitélio intestinal, sendo identificada em 2% dos casos (2/96). Estes corpúsculos se apresentaram de difícil localização, sendo visualizados em poucas células na base das criptas intestinais. Em 17,7% (17/96) dos animais, a microscopia do intestino delgado revelou a presença de autólise que impossibilitou a identificação das lesões. Nestes cães que apresentaram segmentos intestinais em processo de autólise, os demais órgãos analisados não apresentaram alterações autolíticas.

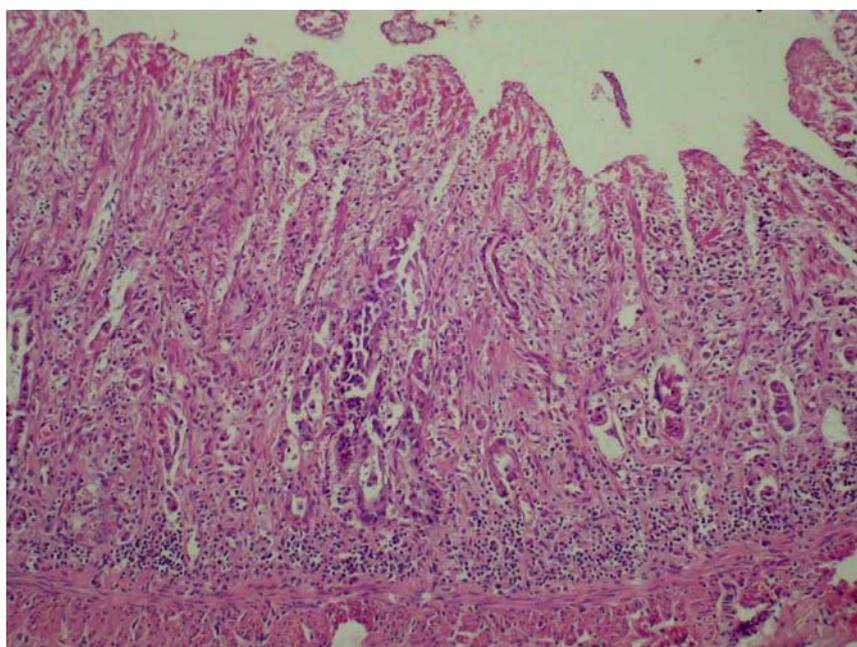


Figura 9 – Canino, macho, SRD acometido por parvovirose canina. Enterite necrótica acentuada com fusão das vilosidades e atrofia de vilosidades. Coloração de hematoxilina e eosina – 200X.

Em placas de Peyer, as lesões nos folículos se caracterizaram pela diminuição no número de células linfóides (figura 10), sendo que em boa parte dos cães foi observada diminuição no número de células no centro dos folículos (rarefação de centro folicular). Em alguns casos analisados, a visualização de rarefação folicular nas placas de Peyer foi acompanhada pela necrose de células linfóides com a presença de cariorrexia e picnose.

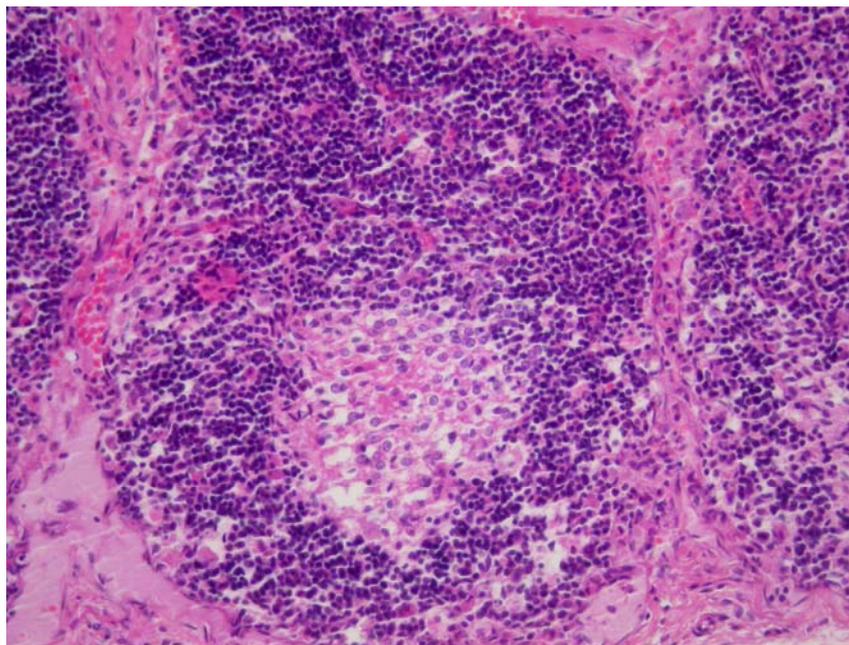


Figura 10 – Canino, macho, Pit Bull com infecção por CPV-2. Rarefação de centros foliculares em um folículo linfóide da placa de Peyer. Coloração de hematoxilina e eosina – 400X.

Na medula óssea, ocorreu a diminuição de células linfóides com rarefação linfóide moderada a acentuada. Também se identificou comumente na medula óssea um preenchimento de espaços por sangue. A microscopia do miocárdio dos cães não revelou alterações histológicas. A avaliação histopatológica pulmonar revelou a presença de pneumonia intersticial em 29,1% (28/96) dos animais necropsiados. Processos inflamatórios leves a acentuados foram observados com a presença de células mononucleares e neutrófilos. Adicionalmente, também foram identificados edema alveolar, congestão, hemorragias focais leves e enfisema pulmonar agudo.

### 4.3 Resultados bacteriológicos

Foram realizadas 15 coletas de sangue para a realização de cultivo bacteriano aeróbio. Crescimento bacteriano foi obtido em 53,3% (8/15) dos cultivos realizados. A bactéria mais encontrada foi a *Escherichia coli* (4/8), seguida pelo isolamento de *Staphylococcus aureus* (3/8), *Streptococcus* sp. (2/8) e *Actinomyces* sp. (2/8).

#### 4.4 Resultados imunoistoquímicos

A recuperação antigênica realizada com tripsina e calor por microondas não propiciou a identificação do CPV-2 nos cortes analisados. Marcações positivas foram obtidas somente com a recuperação antigênica com protease XIV por 15 minutos. Na determinação da diluição do anticorpo monoclonal anti-parvovírus, foram obtidos resultados positivos nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000. A diluição do anticorpo em 1:1500, obteve marcação, porém ocorreu perda da qualidade na identificação do parvovírus canino nos cortes analisados. Desta forma, as imunoistoquímicas foram feitas com a diluição do anticorpo em 1:1000.

Dos 96 cães testados pela imunoistoquímica, 91,6% (88/96) tiveram resultados positivos para CPV-2. Entre os órgãos analisados o intestino delgado obteve marcações positivas em 77% (74/96) dos cães, sendo identificado como o melhor órgão para a realização da imunoistoquímica. Os resultados da imunoistoquímica sobre o total de órgãos analisados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Frequência de detecção de CPV-2 em diferentes órgãos através do teste imunoistoquímico realizado nos 96 caninos que apresentaram lesões sugestivas de parvovirose canina.

Órgãos	IHQ +	Total
Intestino delgado	77,1%	96
Tonsila epitelial	70,6%	92
Língua	68,9%	45
Linfonodo mesentérico	62,5%	96
Tonsila linfóide	52,2%	92
Medula óssea	51,6%	91
Placas de Peyer	45,2%	84
Timo	44,7%	94
Baço	43,7%	96

No intestino delgado, a marcação positiva foi observada com maior frequência nas células da base das criptas intestinais e em células descamadas do epitélio intestinal (figura 11). Em muitos segmentos intestinais testados, as marcações foram facilmente visualizadas, devido à presença moderada ou acentuada do antígeno de CPV-2 (figura 12). O diagnóstico imunoistoquímico de parvovirose canina também foi realizado em segmentos intestinais que apresentaram autólise avançada e impossibilitaram a

observação das lesões *ante-mortem* pela microscopia. Dos cães que apresentaram autólise intestinal, 58,82% (10/17) foram positivos para CPV-2 no intestino delgado (figura 13). O antígeno de CPV-2 foi encontrado em células em processo de autólise da base das criptas e em estruturas amorfas na mucosa do intestino delgado. Dos 7 casos com autólise intestinal em que o diagnóstico imunohistoquímico foi negativo, a realização da imunohistoquímica em outros órgãos demonstrou marcação positiva em 5 animais. Nestes cães a identificação viral foi obtida em linfonodos mesentéricos (5/7), no tecido linfóide da tonsila (3/7), no epitélio escamoso estratificado da tonsila (2/7), medula óssea (2/7) e no timo (1/7). Em folículos de placas de Peyer, raras células positivas para CPV-2 foram identificadas no centro germinativo.

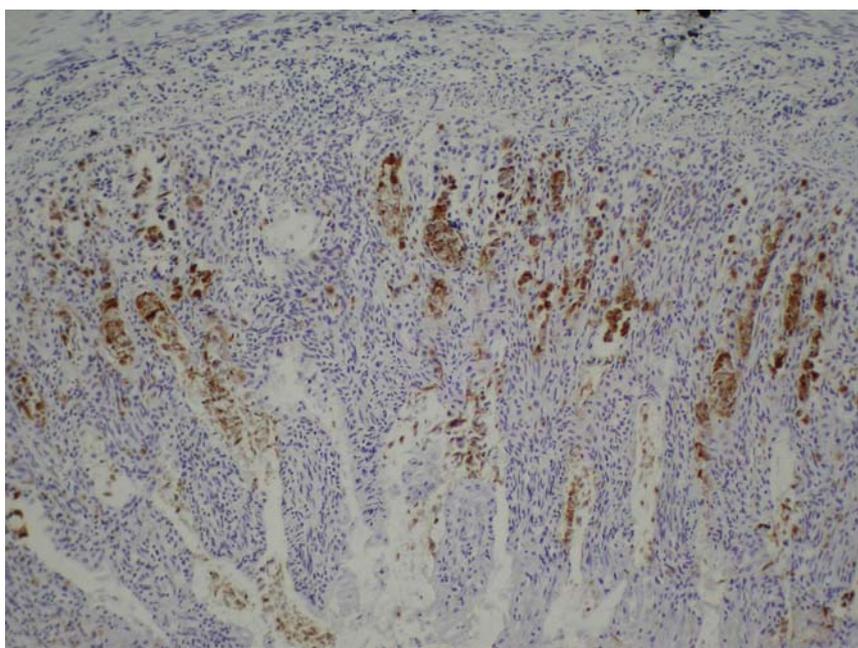


Figura 11 – Canino, SRD, macho com infecção por CPV-2. Marcação de CPV-2 no intestino delgado pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). Método da streptavidina-biotina-peroxidase - 200X.

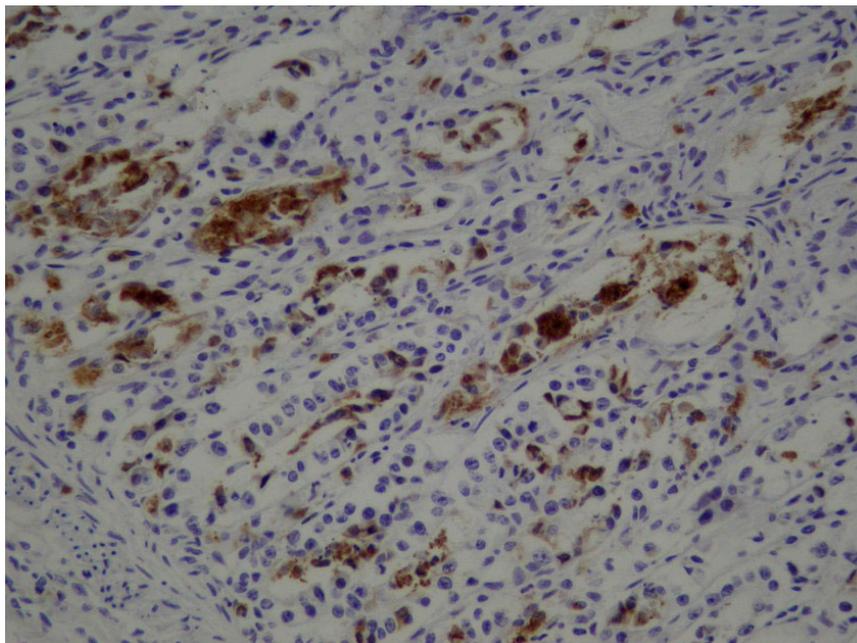


Figura 12 – Canino, SRD, macho com infecção por CPV-2. Marcação de CPV-2 na base das vilosidades, demonstrando positividade no epitélio das criptas e células epiteliais descamadas. IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 400X.

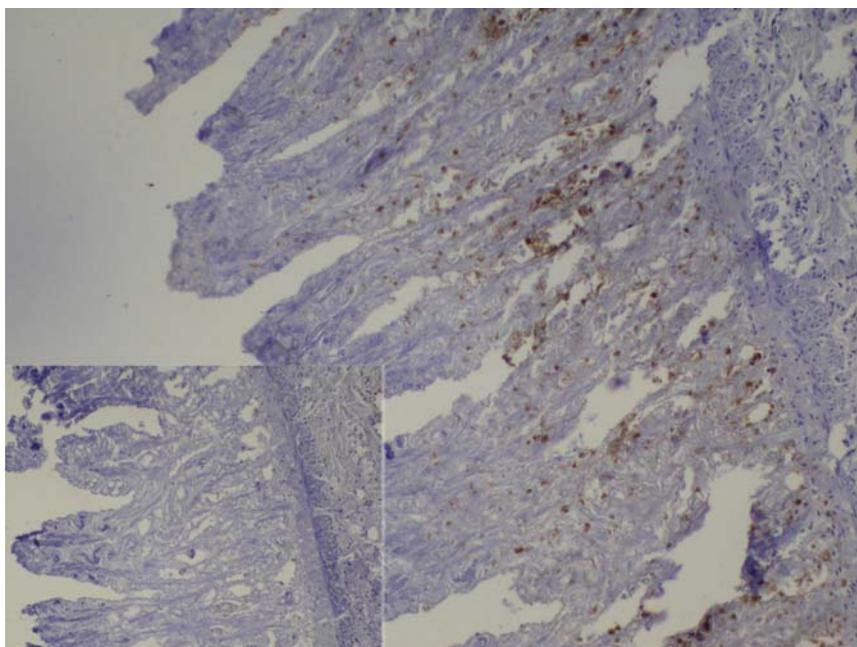


Figura 13 – Canino, Poodle, macho com infecção por CPV-2. Imunoistoquímica positiva em segmento intestinal com autólise (A) e o correspondente controle negativo com ausência de marcações (B). Método da streptavidina-biotina-peroxidase - 200X.

Nos epitélios escamosos estratificados da língua e da tonsila, marcações de diferentes graus foram encontradas. As células mais atingidas pelo CPV-2 foram as células basais do epitélio estratificado da língua e da tonsila (figuras 14 e 15). Um número maior de células positivas foi obtido na parte dorsal da língua do que em células basais da parte ventral da língua.

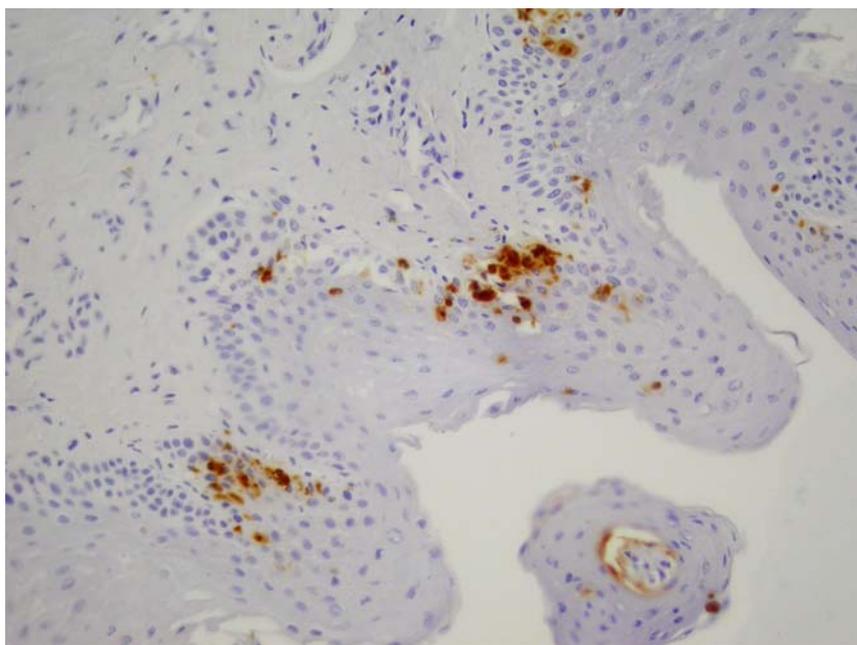


Figura 14 – Canino, Poodle, macho com infecção por CPV-2. Grande quantidade de células positivas para CPV-2 no dorso da língua, principalmente em células basais do epitélio escamoso estratificado. IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 400X.

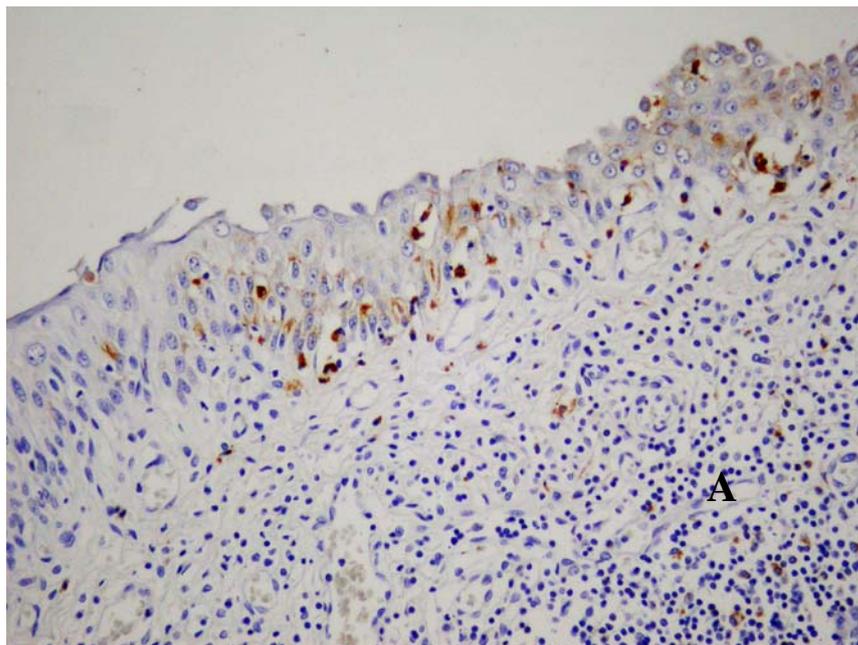


Figura 15 – Canino, SRD, fêmea com infecção por CPV-2. Tonsila com marcação positiva no epitélio escamoso estratificado e raras células linfóides no tecido linfóide da tonsila (A). IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 200X.

A imunoistoquímica realizada em linfonodos mesentéricos propiciou a identificação de CPV-2 em linfócitos de centros foliculares e raramente em células parafoliculares. Em boa parte dos linfonodos analisados, as marcações se apresentavam em um pequeno número de células. As identificações positivas obtidas na tonsila se concentraram mais em células foliculares e em menor quantidade em células parafoliculares. Devido à presença de hemácias e a ocorrência de eritrofagocitose, marcações inespecíficas (*background*) foram observadas.

No baço a marcação foi predominante em folículos linfóides (polpa branca) sobre a polpa vermelha (figura 16), onde as marcações neste órgão se ocorreram em pequeno número de células marcadas na maioria dos corte histológicos. Em alguns casos a identificação viral foi dificultada pela grande quantidade de hemácias em cortes histológicos com congestão. Estas hemácias se apresentam coradas pelo DAB (*background*), permanecendo com coloração semelhante das células linfóides positivas para CPV-2.

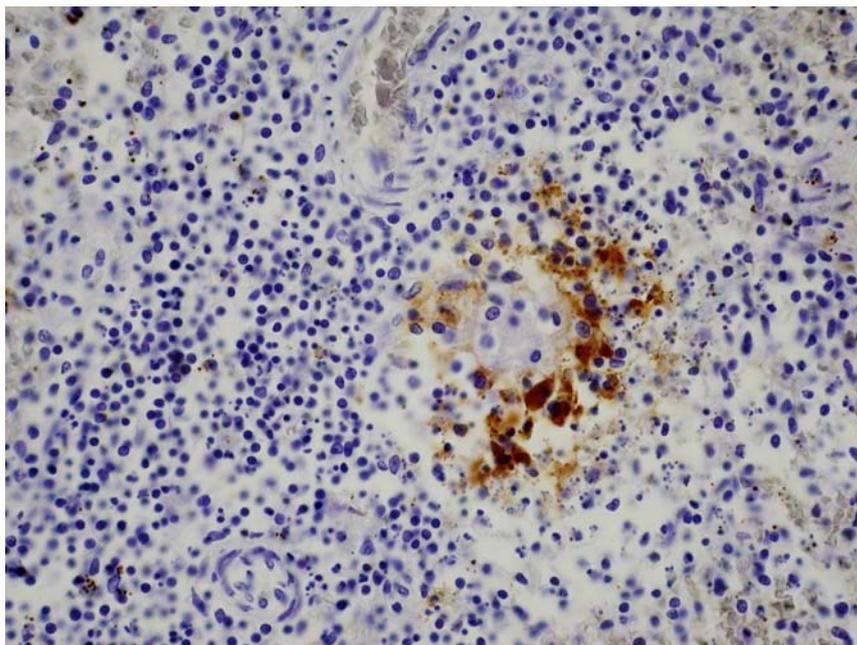


Figura 16 – Canino, Boxer, macho com infecção por CPV-2. Baço com marcação positiva no centro folicular. IHQ, método da streptavidina-biotina-peroxidase - 400X.

Na imunoistoquímica do timo, foi obtido um baixo número de cortes histológicos positivos para CPV-2, além de apresentar-se com uma baixa quantidade de células marcadas na maioria dos cortes histológicos avaliados. A região que obteve um número maior de células marcadas foi a camada cortical. As marcações obtidas na medula óssea foram em baixo número e, quando presente, raras células linfóides apresentaram marcações de CPV-2. Da mesma forma que o baço e o linfonodo mesentérico, a presença de hemácias na medula óssea dificultou a visualização das marcações virais em determinados casos.

Em todos os órgãos submetidos à técnica de imunoistoquímica, a identificação do antígeno de CPV-2 foi visualizada tanto no núcleo como no citoplasma das células acometidas.

#### **4.5 Resultados da análise estatística.**

A frequência de positivos no intestino delgado autolisado foi de 59%, enquanto que nos tecidos não autolisados foi de 81% (Tabela 5). Houve uma fraca associação entre presença de autólise e positividade na técnica de imunoistoquímica, havendo menor chance de resultado positivo na imunoistoquímica em tecidos autolisados ( $p=0.06$ ; OR= 0,33, tabela 5).

Tabela 5 – Resultado comparativo do teste imunoistoquímico realizado em cortes de intestino com e sem autólise<sup>1</sup>.

Autólise	Imunoistoquímica do intestino		Total	Frequência
	Positivo	Negativo		
Presença	10	7	17	59%
Ausência	64	15	79	81%
Total	74	22	96	

<sup>1</sup> Teste exato de Fischer,  $p = 0.06$ ; OR = 0,33 (IC 95%, 0,10 – 1,17).

Dos tecidos submetidos ao teste de imunoistoquímica, verificou-se que o intestino delgado, apesar da autólise em parte dos segmentos intestinais, foi o melhor órgão para a realização deste teste. A razão de chances (*Odds ratio*) de obter-se um resultado positivo de parvovírus canino foi de 11,31, quando submetido este tecido a imunoistoquímica de CPV-2 (Tabela 6). Em relação aos demais órgãos, por exemplo, o intestino delgado apresentou uma razão de chances 95% maior que a razão de chances calculada para a tonsila, órgão de maior frequência de positivos após o intestino delgado.

Tabela 6 – Razão de chances (*Odds ratio*) de casos positivos por órgão na imunoistoquímica.

Órgão	Positivo	Negativo	Total	Frequência	<i>Odds ratio</i>
Intestino delgado	74	22	96	77%	11,31
Tonsila	65	27	92	71%	5,80
Língua	31	14	45	69%	4,90
Linfonodo mesentérico	60	36	96	63%	2,78
Tonsila	48	44	92	52%	1,19
Medula óssea	47	44	91	52%	1,14
Placa de Peyer	38	46	84	45%	0,68
Timo	42	52	94	45%	0,65
Baço	42	54	96	44%	0,60

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a idade média e o intervalo das idades dos cães, também foram encontrados em outros estudos de caninos necropsiados com parvovirose canina (PLETCHER et al., 1979; HARCOURT; SPURLING; PICK, 1980). A observação de que 80,77% dos cães tinham menos de 5 meses de idade está relacionada a uma maior predisposição destes caninos em infectar-se com o CPV-2, como resultado da falta de imunidade maternal, vacinal ou adquirida (MCCANDLISH et al., 1981). Na observação das raças necropsiadas no estudo, constatou-se que cães Rottweiler são encontrados como a segunda raça mais acometida. Este achado pode estar relacionado com a predisposição racial do Rottweiler em ser atingido pela parvovirose canina (GLICKMAN et al., 1985). Entretanto, a observação de um número maior de Poodles não está descrita na literatura como raça predisposta a uma infecção por CPV-2 (GLICKMAN et al., 1985; BRUNNER; SWNAGO, 1985). Desta forma, outros fatores podem ter contribuído para a ocorrência, como fator ambiental (4 Poodles foram vendidos em feiras de filhotes) ou relacionado à grande população desta raça entre os cães. O sexo mais acometido nestes estudos foi o feminino 54% (52/96), porém nenhuma predisposição por sexo pode ser relacionada com os casos de parvovirose canina (HOSKINS, 1997).

Entre os achados macroscópicos apresentados na necropsia, o aumento e em alguns momentos uma depressão de placas de Peyer acompanhada da hiperemia intestinal, foram as alterações mais observadas na infecção pelo CPV-2. Baseando-se neste resultado, estas alterações poderão ser utilizadas como as mais características no exame *post-mortem* auxiliando no diagnóstico.

As alterações microscópicas encontradas em diferentes órgãos linfóides analisados e no epitélio intestinal são iguais às descritas em outros estudos (EUGSTER; BENDELE; JONES, 1978; PLETCHER et al., 1979; COOPER et al., 1979; CARMAN; POVEY, 1985a). Com base nestes achados, as cepas atuais presentes no Brasil (CPV-2a e CPV-2b) ocasionam as mesmas lesões descritas nos inúmeros relatos de parvovirose canina com a cepa original. As lesões necróticas, muitas vezes acentuadas, observadas pela ação do CPV-2, demonstraram mais uma vez a preferência por tipos celulares com alta taxa de mitose, como os centros germinativos de folículos linfóides, células de criptas intestinais e células linfóides da medula óssea. A microscopia de diferentes

órgãos demonstrou que os achados mais constantemente observados foram encontrados na tonsila, timo e baço como resultados da necrose linfóide nestes órgãos. Este resultado demonstra a importância destes órgãos no diagnóstico microscópico da parvovirose canina. No intestino delgado, a enterite necrótica foi identificada em um grande número de cães. Porém, a autólise presente em 17,7% dos intestinos delgados avaliados impossibilitou a visualização de prováveis lesões sugestivas de parvovirose canina em um maior número de animais. Estas alterações autolíticas foram ocasionadas pela realização de necropsias em cães com o tempo de morte de 3 a 4 dias, sob refrigeração. A microscopia do intestino delgado apresentou alguns casos com enterite mononuclear não acompanhada de necrose do epitélio. Este achado pode ser relacionado à presença de lesões segmentares no intestino delgado, onde um corte histológico pode não conter lesões sugestivas de parvovirose canina. Desta forma, a coleta de vários segmentos de intestino delgado durante a necropsia pode diminuir a ocorrência deste achado não característico da infecção por CPV-2. Nesses casos, a presença de parvovirose canina foi confirmada por achados característicos em outros órgãos, sendo as infecções por CPV-2 confirmadas, posteriormente, também pela imunoistoquímica. No presente estudo, a identificação de corpúsculos de inclusão não foi um achado constantemente observado, sendo também relatado em trabalhos anteriores a sua baixa identificação (COOPER et al., 1979; MACARTNEY et al., 1984a). Com base neste resultado a identificação de corpúsculos intranucleares foi considerada de pouca importância no diagnóstico da parvovirose canina diante de outras lesões mais comuns e de fácil identificação. Em alguns órgãos linfóides lesões histológicas características da parvovirose canina não foram observadas; em certos casos não se identificaram rarefações de tecidos linfóides em todos os órgãos, onde órgãos comumente analisados (medula óssea e linfonodo mesentérico) obtiveram uma menor frequência de lesões compatíveis. Desta forma se tornou importante a avaliação histológica de um número maior de órgãos para a identificação das lesões sugestivas de parvovirose canina.

A análise microscópica do coração não revelou alterações no miocárdio descartando a presença de miocardite por CPV-2. A ausência de lesões cardíacas pode estar relacionada à passagem de anticorpos anti-parvovírus transmitidos pela mãe através do colostro, impossibilitando o desenvolvimento de miocardite em cães com poucas semanas de idade (SAGAZIO et al., 1998). Diante deste resultado, as áreas pálidas encontradas no miocárdio foram consideradas como achados normais de cães jovens (VAN VLEET; FERRANS, 1998). A identificação de pneumonias intersticiais e

septicemias pode estar relacionada à entrada de bactérias pela mucosa intestinal lesada e também favorecidas pela queda da imunidade observada em cães com CPV-2 (KREEGER; JERAJ; MANNING, 1984; TURK et al., 1990). Uma outra possibilidade é a ocorrência de pneumonia de aspiração do conteúdo gástrico como consequência de vômitos presentes na parvovirose canina (DUNGWORTH, 1993). Resultados bacteriológicos negativos encontrados não descartam uma septicemia, pois a utilização de antimicrobianos no tratamento dos cães pode resultar em falsos negativos.

Analisando os resultados obtidos na recuperação antigênica, foi observada a incapacidade do método pelo calor por microondas associado à utilização da tripsina em obter a marcação do CPV-2. Este método pode ser ineficaz em certas recuperações antigênicas, necessitando de outros métodos enzimáticos (BARR et al., 1991; RAMOS-VARA; BEISSENHERZ, 2000). Segundo Ramos-Vara, Beissenherz (2000), avaliando as recuperações antigênicas para CPV-2 determinaram que a recuperação antigênica com proteinase K resultou em melhores marcações e com a utilização de calor foram obtidas marcações inconstantes. Baseando-se nesta observação e pelas boas marcações obtidas em nosso estudo, fica evidente que a proteinase K e protease são eficazes na recuperação antigênica de CPV-2. Ainda, a utilização da proteinase K possui a vantagem de necessitar de menor tempo que a protease, sendo utilizada por somente 5 minutos (RAMOS-VARA; BEISSENHERZ, 2000).

Embora houvesse lesões microscópicas sugestivas de parvovirose canina, a marcação imunoistoquímica de CPV-2 não foi obtida em todos os casos. Este resultado pode ser explicado por ser a imunoistoquímica uma técnica com boa especificidade, porém relativamente de menor sensibilidade (VAN MAANEN et al., 2004). Em um estudo comparativo de duas técnicas, a utilização da imunoistoquímica no diagnóstico da parvovirose canina obteve menor sensibilidade que a hibridização *in situ* (WALDVOGEL et al., 1992). Outra possibilidade é que as lesões sugestivas de parvovirose canina não foram ocasionadas pelo CPV-2, mas associadas a uma infecção pelo coronavírus canino (CCV). Esta possibilidade é baseada nos achados de Evermann et al. (2005), nas quais dois cães apresentaram enterite necrótica e depleção linfóide, porém o diagnóstico imunoistoquímico foi negativo para CPV-2 e positivo para CCV.

O intestino delgado foi o órgão com o melhor resultado imunoistoquímico, apresentando um maior número de casos positivos, além disso, resultou em um maior número de células marcadas. Estes resultados podem ser explicados pela maior quantidade de vírus no intestino delgado no momento da necropsia, pois este órgão

recebe o CPV-2 após a viremia, sendo um dos últimos órgãos a receber este vírus. Em estudos experimentais, o CPV-2 foi detectado no epitélio intestinal, utilizando imunistoquímica ou imunofluorescência, somente no quinto ou sexto dia de infecção, chegando ao pico máximo no sétimo dia, porém com uma rápida diminuição de células infectadas no oitavo ou nono dia de infecção (MEUNIER et al., 1985a; CARMAN; POVEY, 1985a). Entretanto, melhor resultado imunistoquímico poderia ser obtido se não ocorresse autólise em parte dos intestinos delgados analisados.

O resultado obtido no intestino delgado difere dos encontrados em tecidos linfóides (linfonodo mesentérico, tonsila, baço, placas de Peyer, medula óssea e timo), onde um menor número de órgãos foram positivos, e quando positivos se apresentam com baixa quantidade de células marcadas. Com base na visualização microscópica dos tecidos linfóides e nos resultados imunistoquímicos, ficou evidente a rápida passagem do vírus nestes locais causando necrose de células linfóides resultando em rarefação linfóide e em uma menor marcação do CPV-2. Resultados semelhantes também foram encontrados por Meunier et al. (1985a), com menores quantidades de células positivas encontradas após o sexto dia de infecção em placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e timo. Em outros estudos que também utilizaram a imunistoquímica para o diagnóstico do CPV-2, esta técnica foi eficaz na identificação do vírus nas criptas intestinais, porém ineficaz na marcação em células foliculares das placas de Peyer (JÖNSSON et al., 1988; SVARA et al., 2003). Entretanto, a utilização de órgãos linfóides na imunistoquímica foi determinante para o diagnóstico de CPV-2 nos caninos que se apresentaram autólise intestinal e o diagnóstico imunistoquímico foi negativo no intestino delgado.

A autólise presente no epitélio intestinal dificultou a confirmação imunistoquímica do CPV-2, porém em alguns casos ainda foi possível o diagnóstico. A autólise também dificulta a marcação de outros agentes infecciosos ou a análise de neoplasia pela imunistoquímica, como em processos autolíticos encontrados em abortos por *Neospora caninum* (HATTEL et al., 1998; BARRA, 2006). Diante da autólise intestinal e um resultado imunistoquímico negativo neste órgão, a realização da imunistoquímica em órgãos linfóides e nos epitélios estratificados da língua e da tonsila poderão auxiliar o diagnóstico por terem menores graus de autólise (MATSUI et al., 1993). Além disto, os epitélios escamosos estratificados da língua e da tonsila podem ter, em alguns casos, melhores resultados imunistoquímicos que os tecidos linfóides. Da mesma forma que o epitélio intestinal e os tecidos linfóides, o epitélio estratificado da língua e da tonsila são locais ideais para a multiplicação do CPV-2,

devido à alta taxa de mitose (BAUDER et al., 2000). Em um estudo envolvendo cães e gatos com parvovirose, bons resultados foram obtidos no epitélio da língua através do diagnóstico imunohistoquímico, na qual 100% dos cães e 94,4% dos gatos analisados tiveram marcações positivas (BAUDER et al., 2000). Entretanto, a alta porcentagem positiva encontrada neste estudo, deve ser analisada com cautela pelo baixo número de cães analisados, somente 8 animais. Com relação ao local de identificação viral na língua, Bauder et al. (2000) obtiveram resultado que se assemelha a este estudo, com um maior número de células marcadas na parte dorsal da língua. Resultado que pode ser explicado por este local ter maior taxa de reposição celular do que a parte ventral da língua, com isto favorecendo uma infecção pelo CPV-2 (BAUDER et al., 2000). Com a identificação viral na tonsila e na língua, ficou evidente que o CPV-2 se manteve na orofaringe com o decorrer da infecção, ou seja, nos locais onde ocorrem as primeiras replicações do CPV-2. A permanência do vírus nestes locais pode ser favorecida pela manutenção da integridade epitelial mesmo com a multiplicação e a necrose de células basais destes epitélios.

## 6. CONCLUSÕES

Macroscopicamente, a hiperemia intestinal e o aumento de placas de Peyer foram os achados mais encontrados, desta forma, auxiliam o diagnóstico de parvovirose canina.

No presente trabalho as lesões microscópicas na tonsila, timo e baço foram consideradas como importantes órgãos na identificação dos achados patológicos provocados pelo CPV-2.

A visualização de enterite necrótica em um maior número de casos foi prejudicada pela autólise presente em 17,7% dos casos.

O intestino delgado foi considerado o melhor órgão na identificação do CPV-2 pela técnica de imunistoquímica.

Os epitélios escamosos estratificados da língua e da tonsila poderão ser utilizados no diagnóstico imunistoquímico de CPV-2. Por apresentarem boa taxa de positividade e melhor conservação tecidual no período *post-mortem*, sua utilização poderá ser importante em casos de autólise intestinal.

Os órgãos linfóides apresentaram resultados inferiores aos apresentados em órgãos epiteliais na imunistoquímica como resultado da necrose tecidual e a rápida passagem do CPV-2 por estes tecidos. Porém, diante de um diagnóstico negativo no intestino delgado a utilização destes poderá confirmar uma infecção por CPV-2.

A imunistoquímica pode ser um importante método auxiliar na comprovação da parvovirose canina em casos de autólise intestinal ou diante de lesões microscópicas inconclusivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUNGPRIYONO, D.R., UCHIDA, K., TABARU, H., et al. Subacute massive necrotizing myocarditis by canine parvovirus type 2 infections with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. **Vet. Pathol.**, v. 36, p. 77-80, 1999.
- AMO, A.N., APREA, A.N., PETRUCELLI, M.A. Detection of viral particles in feces of young dogs and their relationship with clinical signs. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 237-41, 1999.
- ANDERSON, P.G., PIDGEON, G. Candidiasis in a dog with parvoviral enteritis. **J. Am. Anim Hospital Assoc.**, v. 23, p. 27-30, 1987.
- APPEL, M.J.G. COOPER, B.J., GREISEN, H., et al. Canine viral enteritis. I. Status report on corona – and parvo-like viral enteritides. **Cornell Vet.**, v. 69, p. 123-133, 1979.
- APPEL, M.J.G. Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection? **Vet. Med.**, v. 83, p. 360-366, 1988.
- APPEL, M.J.G., COOPER, B.J., GREISEN, H., et al. Status report: canine viral enteritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 173, p. 1516-1517, 1978.
- ATKINSON, M. Efficacy of vaccination against canine parvovirus. **Vet. Rec.**, v. 159, p. 428, 2006.
- BARKER, I.K., DREUMEL, A.A.V., PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F. (Ed.) **Pathology of domestic animals**. 4<sup>th</sup> San Diego: Academic Press, 1993. cap. 1, p. 198-199.
- BARR, B.C., CONRAD, P.A., DUBEY, J.P., et al. Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 3, p. 39-46, 1991.
- BARRA, M.B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Rev. AMRIGS**, v. 50, p. 173-184, 2006.
- BATTERSBY, I., HARVEY, A. Diferencial diagnosis and treatment of acute diarrhea in the dog and cat. **In Pract.**, v. 28, p. 480-488, 2006.
- BATTILANI, M., CIULLI, S., TISATO, E., et al. Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. **Virus Res.**, v. 83, p. 149-157, 2002.
- BAUDER, B., SUCHY, A., GABLER, C., et al. Apoptosis in feline panleukopenia and canine parvovirus enteritis. **J. Vet. Med. B**, v. 47, p. 775-784, 2000.

- BINN, L.N., LAZR, B.C., EDDY, G.A., et al. Recovery and characterization of a minute virus of canines. **Infect. Immun.**, v. 1, p. 503-508, 1970.
- BOLT, D.M., HÄNI, H., MÜLLER, E., et al. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. **J. Comp. Path.**, v. 117, p. 107-118, 1997.
- BOOSINGER, T.R., REBAR, A.H., DENICOLA, D.B., et al. Bone marrow alterations associated with canine parvoviral enteritis. **Vet. Pathol.**, v. 19, p. 558-561, 1982.
- BRUNNER, C.J., SWANGO, L.J. Canine parvovirus infection: effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.**, v. 12, p. 979-988, 1985.
- BUONAVOGLIA, C., MARTELLA, V., PRATELLI, A., et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 3021-3025, 2001.
- CARLSON, J.H., SCOTT, F.W. Feline panleukopenia II. The relationship of intestinal mucosal cell proliferation rates to viral infection and development of lesions. **Vet. Pathol.**, v. 14, p. 173-181, 1977.
- CARLSON, J.H., SCOTT, F.W., DUNCAN, J.R. Feline panleukopenia. III. Development of lesions in the lymphoid tissues. **Vet. Pathol.**, v. 15, p. 383-392, 1978.
- CARMAN, P.S., POVEY, R.C. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: histopathology and antigen identification in tissues. **Res. Vet. Sci.**, v. 38, p. 141-150, 1985a.
- CARMAN, P.S., POVEY, R.C. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. **Res. Vet. Sci.**, v. 38, p. 134-140, 1985b.
- CARMICHAEL, L.E. An annotated historical account of canine parvovirus. **J. Vet. Med. B.**, v. 52, p. 303-311, 2005.
- CARMICHAEL, L.E., APPEL, M.J. Canine viral enteritis. In: KIRK, R.W. (Ed.) **Current veterinary therapy small animal practice**. 7<sup>th</sup> Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. p. 1293-1298.
- CARMICHAEL, L.E., SCHLAFER, D.H., HASHIMOTO, A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, p. 165-174, 1994.

- CARPENTER, J.L., ROBERTS, R.M., HARPSTER, N.K., et al. Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a litter of pups. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 176, p. 1269-1273, 1980.
- CHANG, W.L., CHANG, A.C.H., PAN, M.J. Antigenic types of canine parvoviruses prevailing in Taiwan. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 447, 1996.
- COETZER, J.A.W., TUSTIN, R.C. In: Parvoviridae. **Infections Diseases of Livestock**. 2<sup>th</sup>. vol. 2. New York: Oxford, 2004. p. 805.
- COOPER, B.J., CARMICHAEL, L.E., APPEL, M.J.G., et al. Canine viral enteritis. II. Morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection. **Cornell Vet.**, v. 69, p. 134-144, 1979.
- COSTA, A.P., LEITE, J.P.G., LABARTHE, N.V., et al. Genomic typing of canine parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, p. 735-743, 2005.
- DECARO, N., DESARIO, C., CAMPOLO, M., et al. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 133-138, 2005a.
- DECARO, N., ELIA, G., MARTELLA, V., et al. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. **J. Virol. Methods**, v. 133, p. 92-99, 2006a.
- DECARO, N., ELIA, G., MARTELLA, V., et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 19-28, 2005b.
- DECARO, N., MARTELLA, V., DESARIO, C., et al. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. **J. Vet. Med. B**, v. 43, p. 468-472, 2006b.
- DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., et al. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. **J. Virol. Methods**, v. 138, p. 10-16, 2006c.
- DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., et al. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. **Vet. Microbiol.**, 2006d. (article in press)
- DESARIO, C., DECARO, N., CAMPOLO, M., et al. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? **J. Virol. 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. **Cienc. Rural**, v. 37, p. 183-189, 2007.
- DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: JUBB, K.V.F. (Ed.) **Pathology of domestic animals**. 4<sup>th</sup> San Diego: Academic Press, 1993. cap. 6, p. 610.
- ELSE, R.W. Fatal haemorrhagic enteritis in a puppy associated with a parvovirus infection. **Vet. Rec.**, v. 106, p. 14-15, 1979.
- EUGSTER, A.K., BENDELE, R.A., JONES, L.P. Parvovirus infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 173, p. 1340-1341, 1978.
- EVERMANN, J.F., ABBOTT, J.R., HAN, S. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infections. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 610-614, 2005.
- EVERMANN, J.F., FOREYT, W., MAAG-MILLER, L., et al. Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infections in a captive coyote population. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 177, p. 784-786, 1980.
- EVERMANN, J.F., MCKEIRNAN, A.J., GORHAM, J.R. Interspecies virus transmission. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.**, v. 24, p. 390-395, 2002.
- FAVROT, C., OLIVRY, T., DUNSTON, S.M., et al. Parvovirus infection of keratinocytes as a cause of canine erythema multiforme. **Vet. Pathol.**, v. 37, p. 647-649, 2000.
- FILHO, B. A., AZULAY, D.R. Doenças virais de interesse dermatológico. In: AZULAY, R.D. (Ed.) **Dermatologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 19, p. 281.
- FROLICH, K., STREICH, W.J., FICKEL, J., et al. Epizootiologic investigations of parvovirus infections in free-ranging carnivores from Germany. **J. Wildl. Dis.**, v. 41, p. 231-235, 2005.
- GLICKMANN, L.T., DOMANSKI, L.M., PATRONECK, G.J., et al. Bred-related risk factors for canine parvovirus enteritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 187, p. 589-594, 1985.
- GREENWOOD, N.M., CHALMERS, W.S.K., BAXENDALE, W., et al. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and efficacy against field strains. **Vet. Rec.**, v. 136, p. 63-67, 1995.

- GREENWOOD, N.M., CHALMERS, W.S.K., BAXENDALE, W., et al. Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 495-496, 1996.
- HAGIWARA, M.K., JULY, J.R., BACCARO, M.R., et al. Enterite hemorrágica cães associada à infecção por um parvovírus. **Arq. Inst. Biol.**, v. 47, p. 47-49, 1980.
- HALL, E., GERMAN, A.J. Diseases of the small intestine. In: ETTINGER, S.J. (Ed.) **Textbook of veterinary internal medicine**. 6<sup>th</sup> Saint Louis: Elsevier Saunders, 2005. cap. 222, p. 1332-1378.
- HARCOURT, R.A., SPURLING, N.W., PICK, C.R. Parvovirus infection in a Beagle colony. **J. Small Anim. Pract.**, v. 21, p. 293-302, 1980.
- HATTEL, A.L., CASTRO, M.D., GUMMO, J.D., et al. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. **Vet. Parasitol.**, v. 74, p. 307-313, 1998.
- HAYES, M.A., RUSSELL, R.G., BABIUK, L.A. Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 174, p. 1197-1203, 1979.
- HEADLEY, S.A., SAITO, T.B. Simultaneous canine distemper encephalitis and canine parvovirus infection with distemper-associated cardiac necrosis in a pup. **Cienc. Rural**, v. 33, p. 1149-1151, 2003.
- HOSKINS, J.D. Canine viral enteritis. In: Greene, C.E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. 2<sup>th</sup>. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 40-45.
- HOSKINS, J.D. Update on canine parvoviral enteritis. **Vet. Med.**, v. 92, p. 694-709, 1997.
- HUEFFER, K., PARRISH, C.R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 392-398, 2003.
- HULLINGER, G.A., HINES, M.E., STYER, E.L., et al. Pseudocyttoplasmatic inclusions in tongue epithelium of dogs with canine parvovirus-2 infections. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 10, p. 108-111, 1998.
- JACOBS, R.M., WEISER, M.G., HALL, R.L., et al. Clinicopathologic features of canine parvoviral enteritis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 16, p. 809-814, 1980.
- JEZYK, P.F., HASKINS, M.E., JONES, C.L. Myocarditis of probable viral origin in pups of weaning age. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 174, p. 1204-1207, 1979.
- JONES, T.C., HUNT, R.D. KING. N.W. In: **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000. cap. 8, p. 266-273.

- JÖNSSON, L., MAGNUSSON, C., BOOK, M., et al. Monoclonal antibodies applied in an immunoperoxidase method for detection of parvovirus in specimens of small intestine from dog and mink. **Acta. Vet. Scand.**, v. 29, p. 263-264, 1988.
- KAHN, D.E. Pathogenesis of feline panleukopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 173, p. 628-630, 1978.
- KILHAM, L., MARGOLIS, G., COLBY, E.D. Cerebellar ataxia and its congenital transmission in cats by feline panleukopenia virus. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 158, p. 888-901, 1971.
- KOFTOPOULOS, G., PAPAPOPOULOS, O., PAPANASTASOPOULOU, M., et al. Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece. **Vet. Rec.**, v. 118, p. 332-333, 1986.
- KOUTINAS, A.F., HELIADIS, N., SARIDOMICHELAKIS, M.N., et al. Asymptomatic bacteriuria in puppies with canine parvovirus infection: a cohort study. **Vet. Microbiol.**, v. 63, p. 109-116, 1998.
- KREEGER, T.J., JERAJ, K.P., MANNING, P.J. Bacteremia concomitant with parvovirus infection in a pup. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 184, p. 196-197, 1984.
- KRUININGEN, H.J.V. Sistema gastrointestinal. In: CARLTON, W.W. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. cap. 1, p. 13-94.
- LENGHAUS, C., STUDDERT, M.J. Generalized parvovirus disease in neonatal pups. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 181, p. 41-45, 1982.
- MACARTNEY, L., MACARTNEY, C.M. Canine parvovirus: development of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. **Res. Vet. Sci.**, v. 40, p. 201-208, 1986.
- MACARTNEY, L., MCCANDLISH, I.A.P., THOMPSON, H., et al. Canine parvovirus enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection. **Vet. Rec.**, v. 115, p. 201-210, 1984b.
- MACARTNEY, L., MCCANDLISH, I.A.P., THOMPSON, H., CORNWELL, H.J.C. Canine parvovirus enteritis 2: pathogenesis. **Vet. Rec.**, v. 115, p. 453-460, 1984a.
- MANN, P.C., BUSH, M., APPEL, M.J.G., et al. Canine parvovirus infection in South American canids. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 177, p. 779-783, 1980.
- MARTELLA, V., CAVALLI, A., PRATELLI, A., et al. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1333-1336, 2004.

- MARTELLA, V., DECARO, N., ELIA, G., et al. Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. **J. Vet. Med. B**, v. 52, p. 312-315, 2005.
- MASON, M.J., GILLETT, N.A., MUGGENBURG, B.A. Clinical, pathological, and epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis in an unvaccinated closed Beagle colony: 1978-1985. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 23, p. 183-192, 1987.
- MATSUI, T., MATSUMOTO, J., KANNO, T., et al. Intranuclear inclusions in the stratified squamous epithelium of the tongue in dogs and cats with parvovirus infection. **Vet. Pathol.**, v. 30, p. 303-305, 1993.
- MCCANDLISH, I.A.P., THOMPSON, H., FISHER, E.W., et al. Canine parvovirus infection. **In Pract.**, v. 3, p. 5-14, 1981.
- MEUNIER, P.C., COOPER, B.J., APPEL, M.J.G., et al. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. **Vet. Pathol.**, v. 22, p. 617-624, 1985b.
- MEUNIER, P.C., COOPER, B.J., APPEL, M.J.G., et al. Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 509-515, 1984.
- MEUNIER, P.C., COOPER, B.J., APPEL, M.J.G., et al. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. **Vet. Pathol.**, v. 22, p. 60-71, 1985a.
- MEUNIER, P.C., GLICKMAN, L.T., APPEL, M.J.G., et al. Canine parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings. **Cornell Vet.**, v. 71, p. 96-110, 1981.
- MOCHIZUKI, M., HORIUCHI, M., HIRAGI, H., et al. Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2101-2105, 1996.
- MOCHIZUKI, M., SAN GABRIEL, M.C., NAKATANI, H., et al. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. **Res. Vet. Sci.**, v. 55, p. 60-63, 1993.
- MOOJEN, V., GONÇALVES, I.P.D., PIZZOL, M.D., et al. Parvovirose canina: diagnóstico laboratorial realizado no período de 1980 a 1989, na Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.20, p.209-223, 1992.

- MULVEY, J.J., BENCH-NIELSEN, S., HASKINS, M.E., et al. Myocarditis induced by parvoviral infection in weanling pups in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 177, p. 695-698, 1980.
- NAKAMURA, K., SAKAMOTO, M., IKEDA, Y., et al. Pathogenic potencial of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 663-668, 2001.
- NAKAMURA, M., TOHYA, Y., MIYAZAWA, T., et al. A novel antigenic variant of *Canine parvovirus* from a Vietnamese dog. **Arch. Virol.**, v. 149, p. 2261-2269, 2004.
- NELSON, D.T., EUSTIS, S.L., MCADARAGH, J.P., et al. Lesions of spontaneous canine viral enteritis. **Vet. Pathol.**, v. 16, p.680-686, 1979.
- NETTLES, V.F., PEARSON, J.E., GUSTAFSON, G.A., et al. Parvovirus infection in translocated raccoons. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 177, p. 787-789, 1980.
- NHO, W., SUR, J., DOSTER, A.R., KIM, S. Detection of canine parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 9, p. 255-260, 1997.
- PARRISH, C.R., AQUADRO, C.F., STRASSHEIN, M.L., et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. **J.Virol.**, v. 65, p. 6544-6552, 1991.
- PARRISH, C.R., KAWAOKA, Y. The origins of news pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 59, p. 553-586, 2005.
- PARRISH, C.R., O'CONNELL, P.H., EVERMANN, J.F., et al. Global spread and replacement of canine parvovirus strains. **J. Gen. Virol.**, v. 69, p. 1111-1116, 1988.
- PARRISH, C.R.. Pathogenesis of the feline panleukopenia virus and canine parvovirus. **Baillieres Clin. Haematol.**, v. 8, p. 57-71, 1995.
- PEREIRA, C.A.D., MONEZI, T.A., MEHNERT, D.U., et al. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Vet. Microbiol.**, v. 75, p. 127-133, 2000.
- PLETCHER, J.M., TOFT, J.D., FREY, R.M., et al. Histopathologic evidence for parvovirus infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 175, p. 825-828, 1979.

- PODELL, M. Rabies and other viral diseases of the nervous system. In: SHERDING, R.G. (Ed.). **The cat-diseases and management**. Philadelphia: Saunders, 1994. p. 511-512.
- POLLOCK, R.V.H. Experimental canine parvovirus infection in dogs. **Cornell Vet.**, p. 72, p. 103-119, 1982.
- POLLOCK, R.V.H. The parvoviruses part II. Canine parvovirus. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.**, v. 6, p. 653-664, 1984.
- POLLOCK, R.V.H., POSTORINO, N.C. Feline panleukopenia and other enteric viral diseases. In: SHERDING, R.G. (Ed.). **The cat-diseases and management**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. cap. 14, p. 479-487.
- PRATELLI, A., TEMPESTADE, M. ROPERTO, F.P., SAGAZIO, P., CARMICHAEL, L., BUONAVOGLIA, C. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 11, p. 550-553, 1999.
- PROPHET, E.B., et al. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 274 p.
- RALLIS, T.S., PAPAZOGLU, L.G., ADAMAMA-MORAITOU, K.K., et al. Acute enteritis or gastroenteritis in young dogs as a predisposing factor for intestinal intussusception: a retrospective study. **J. Vet. Med. A**, v. 47, p. 507-511, 2000.
- RAMOS-VARA, J.A., BEISSENHERZ, M.E. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 307-311, 2000.
- ROBINSON, W.F., WILCOX, G.E., FLOWER, L.P. Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. **Vet. Pathol.**, v. 17, p. 589-599, 1980.
- SAGAZIO, P., TEMPESTA, M., BUONAVOGLIA, D., et al. Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. **J. Virol. Methods**, v. 73, p. 197-200, 1998.
- SAKULWIRA, K., VANAPONGTIPAGORN, P., THEAMBOONLERS, A., et al. Prevalence of canine coronavirus and parvovirus infections in dogs with gastroenteritis in Thailand. **Vet. Med.-Czech.**, v. 48, p. 163-167, 2003.
- SCHUNCK, B., KRAFT, W., TRUYEN, U. A simple touch-down polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. **J. Virol. Methods**, v. 55, p. 427-433, 1995.

- SHACKELTON, L.A., PARRISH, C.R., TRUYEN, U., et al. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 379-384, 2005.
- SHERDING, R.G. Diseases of the intestines. In: \_\_\_\_\_. **The cat-diseases and management**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. cap. 39, p. 1228-1229.
- SIMPSON, A.A., HÉBERT, B., SULLIVAN, G.M., et al. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. **J. Mol. Biol.**, v. 315, p. 1189-1198, 2002.
- SKETCHLEY, P. Efficacy of vaccination against canine parvovirus. **Vet. Rec.**, v. 159, p. 428, 2006.
- STEINEL, A., PARRISH, C.R., BLOOM, E.M., et al. Parvovirus infections in wild carnivores. **J. Wildl. Dis.**, v. 37, p. 594-607, 2001.
- STORTS, R.W. Sistema nervoso central. In: CARLTON, W.W. (Ed.) **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. cap. 8, p. 360-361.
- STORZ, J.S., LEARY, J.J., CARLSON, J.H., et al. Parvoviruses associated with diarrhea in calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 173, p. 624-627., 1978.
- STRAFUSS A.C. **Necropsy: simplified procedures and basic diagnostic methods for practicing veterinarians**. Springfield: Charles C. Thomas, 1988. 244 p.
- SVARA, T., JUNTES, P., POGACNIK, M., et al. Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen the organs of dogs with canine parvovirus. **Slov. Vet. Res.**, v. 40, p. 81-90, 2003.
- SWANGO, L.J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, S.J. et al. (Ed.) **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed., São Paulo: Manole, 1997. cap. 69, p. 573-588.
- TAKAHASHI, M., ITO, M., SAKAMOTO, F., et al. Human parvovirus B19 infection: immunohistochemical and electron microscopic studies of skin lesions. **J. Cutan. Pathol.**, v. 22, p. 168-172, 1995.
- TIMONEY, J.F., GILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W., et al. In: \_\_\_\_\_. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8<sup>th</sup> New York: Cornell University, 1988. p. 501-521.
- TRATSCHIN, J.D., MCMASTER, G.K., KRONAUE, G., et al. Canine parvovirus: relationship to wild-type and vaccine strains of feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 61, p. 33-41, 1982.

- TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus - a need for new vaccines? **Vet. Microbiol.**, v. 117, p. 9-13, 2006.
- TRUYEN, U., GEISLER, K., PARRISH, C.R., et al. No evidence for a role modified live virus vaccines in the emergence of canine parvovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 1153-1158, 1998.
- TRUYEN, U., GRUENBERG, A., CHANG, S., et al. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. **J. Virol.**, v. 69, p. 4702-4710, 1995.
- TRUYEN, U., PLATZER, G., PARRISH, C.R. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 365-366, 1996.
- TURK, J., FALES, W., MILLER, M., et al. Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1980). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 200, p. 991-994, 1992.
- TURK, J., MILLER, M., BROWN, T., et al. Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987-1988). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 196, p. 771-773, 1990.
- URL, A., A., TRUYEN, U., REBEL-BAUDER, B., et al. Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3801-3805, 2003.
- URL, A., SCHMIDT, P. Do canine parvoviruses affect canine neurons? An immunohistochemical study. **Res. Vet. Sci.**, v. 79, p. 57-59, 2005.
- UWATOKO, K., SUNAIRI, M., NAKAJIMA, M., et al. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 43, p. 315-323, 1995.
- VAN LEENGOED, L.A., VOS, J., GRUYS, E., et al. Porcine parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. **Vet. Q.**, v. 5, p. 131-141, 1983.
- VAN MAANEN, C., WOUDA, W., SCHARES, G., et al. A interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. **Vet. Parasitol.**, v. 126, p. 351-364, 2004.
- VAN VLEET, J.F., FERRANS, V.J. Patologia do sistema cardiovascular. In: CARLTON, W.W. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. cap. 4, p. 194-195.

- WALDVOGEL, A.S., HASSAN, S., STOERCKLE, N., et al. Specific diagnosis of parvovirus enteritis in dogs and cats by in situ hybridization. **J. Comp. Pathol.**, v. 107, p. 141-146, 1992.
- WALKER, S.T., FEILEN, C.P., SABINE, M., et al. A serological survey of canine parvovirus infection in New South Wales, Australia. **Vet. Rec.**, v. 106, p. 324-325, 1980.
- WANER, T., MAZAR, S., NACHIMAS, E., et al. Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. **Vet. Rec.**, v. 152, p. 588-591, 2003.
- WANER, T., NAVEH, A., WUDOVSKY, I., et al. Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 8, p. 427-432, 1996.
- WILHELM, S., ZIMMERMANN, P., SELBITZ, H.J., et al. Real-time PCR detection of porcine parvovirus in field samples. **J. Virol. Methods**, v. 134, p. 257-260, 2006.
- YBAÑEZ, R.R., VELA, C., CORTÉS, E., et al. Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. **Vet. Rec.**, v. 136, p. 174-175, 1995.
- YILMAZ, A., PRATELLI, A., TORUN, S. Distribution of antigen of canine parvovirus type 2 in dogs with hemorrhagic enteritis in Turkey. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 29, p. 1073-1076, 2005.
- YOUNG, N.S., BROWN, K.E. Mechanisms of disease – parvovirus B19. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 586-597, 2004.
- YULE, T.D., ROTH, M.B., DREIER, K., et al. Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. **Vaccine**, v. 15, p. 720-729, 1997.