

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

MICHELE MACHADO LENCINA

**ANÁLISE QUANTITATIVA E GENÉTICA DE PARVOVÍRUS CANINO 2 EM
VACINAS COMERCIAIS PARA CÃES**

**CAXIAS DO SUL
2021**

MICHELE MACHADO LENCINA

**ANÁLISE QUANTITATIVA E GENÉTICA DE PARVOVÍRUS CANINO 2 EM
VACINAS COMERCIAIS PARA CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Universidade de Caxias do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

CAXIAS DO SUL

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L563a Lencina, Michele Machado

Análise quantitativa e genética de parvovírus canino 2 em vacinas comerciais para cães [recurso eletrônico] / Michele Machado Lencina. – 2021.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, 2021.

Orientação: André Felipe Streck.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Cães - Doenças. 2. Parvovírus canino - Tratamento. 3. Vacinas. 4. Epidemiologia. 5. Patologia. I. Streck, André Felipe, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 578.822:636.7

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

MICHELE MACHADO LENCINA

**ANÁLISE QUANTITATIVA E GENÉTICA DE PARVOVÍRUS CANINO 2 EM
VACINAS COMERCIAIS PARA CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Universidade de Caxias do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Saúde Animal.

Aprovada em 09 de julho de 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Felipe Streck
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Profa. Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Antonella Souza Mattei
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Prof. Dr. Vagner Lunge - Membro suplente
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que ao longo do projeto de mestrado cruzaram comigo, o meu sincero muito obrigada. No entanto, não poderia deixar de agradecer de uma forma especial:

ao meu orientador, Prof. Dr. André Felipe Streck, pelo acolhimento, aprendizado e paciência em todas as etapas do presente trabalho;

ao Prof. Dr. Vagner Lunge, pelo auxílio, avaliação e sugestões acerca desse estudo;

aos meus queridos Sabrina Bertolazzi, Weslei Santana e Diéssy Kipper, pela parceria, amizade e coleguismo;

a toda equipe do Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária (LDMV), pela preciosa ajuda na realização dos experimentos;

aos meus amigos e familiares, pelo apoio nesses anos;

por fim.... aos colegas das várias clínicas, hospitais, consultórios e estabelecimentos veterinários que contribuíram para a aquisição de vacinas.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

A parvovirose canina é uma doença altamente contagiosa e frequentemente fatal em cães, apesar da ampla disponibilidade de vacinas. No Brasil, várias vacinas vivas modificadas de parvovírus canino 2 (CPV-2) são utilizadas atualmente por veterinários para seu controle e prevenção. No entanto, existem diversos produtos no mercado sem eficácia comprovada contra as cepas locais. O presente estudo teve como objetivo realizar uma análise filogenética e determinar a carga viral de cepas de CPV-2 de vacinas vivas modificadas comercializadas no Brasil. Oitenta frascos de vacinas foram obtidos de oito empresas fabricantes do país. O gene da proteína viral 2 (VP2) foi sequenciado em todas as amostras e os resultados foram analisados através de análise filogenética. A PCR em tempo real foi realizada para determinar a carga viral em todos os frascos da vacina. Os resultados filogenéticos demonstraram que todas as cepas da vacina CPV-2 estavam no clado genético contendo amostras da primeira disseminação do CPV-2, que ocorreu há mais de 40 anos. Estas amostras possuem distinção das linhagens virais atuais. A carga de DNA viral da vacina revela grandes diferenças entre as marcas e até ausência de DNA em alguns frascos de vacinas. Esses resultados corroboram para a possibilidade de que cepas virais e o armazenamento da vacina estão provavelmente associados a algumas falhas de vacinação e ocorrência de surtos de parvovírus canino no Brasil.

Palavras-chave: Falha Vacinal. Parvovírus Canino Tipo 2. CPV-2. Vacina.

ABSTRACT

The canine parvovirus is a highly contagious disease and frequently fatal to dogs, in spite of the wide availability of vaccines. In Brazil, many modified live vaccines of the canine parvovirus type 2 (CPV-2) are currently used by veterinarians. However, there are several products on the market without a proven efficacy against local strains. The present study performed a phylogenetics analysis and determine the viral load of strains of CPV-2 in modified live vaccines commercialized in Brazil. Eighty vials of vaccines were obtained from manufacturer companies in the country. VP2 gene was sequenced in all the samples and the results were comparatively analyzed through phylogenetics. The PCR was performed in real time to determine the viral load in all vaccine vials. The phylogenetics results show that all strains of the CPV-2 vaccine came from the original genetic clade, from the first dissemination of CPV-2 that occurred more than 40 years ago. This clade had several genetic differences from the disseminated lineages. The vaccine viral DNA load reveals great differences among brands and even the absence of DNA in some vaccine bottles. These results support the possibility of the viral strains and the vaccine storage being probably associated with some vaccination failures and the occurrence of canine parvovirus outbreaks in Brazil.

Keywords: Vaccine Failures. Canine Parvovirus Type 2. CPV-2. Vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
<i>et al.</i>	e outros
Gln	Glutamina
H	hora(s)
IgM	Imunoglobulina M
Ile	Isoleucina
Kg	quilograma(s)
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Mg	miligrama(s)
Min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
Nm	nanômetro(s)
Ng	nanograma(s)
Pb	pares de base
Phe	Fenilalanina
Pmol	Picomol
Pro	Prolina
s	segundo(s)
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina
µL	microlitro(s)
µm	Micromol

LISTA DE SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
BID	<i>Bis in Die</i> - Duas vezes ao dia
CPV	<i>Canine Parvovirus</i> - Parvovírus canino
CPV-1	<i>Canine Parvovirus type 1</i> - Parvovírus canino tipo 1
CPV-2	<i>Canine Parvovirus type 2</i> - Parvovírus canino tipo 2
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FPV	<i>Feline Panleukopenia Virus</i> - Vírus da panleucopenia felina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
LDMV	Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária
NS1	<i>Non Structural 1</i> - Proteína não estrutural 1
NS2	<i>Non Structural 2</i> - Proteína não estrutural 2
ORF	<i>Open Reading Frames</i> - Fase de leitura aberta
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
QID	<i>Quater in Die</i> - Quatro vezes ao dia
q-PCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RS	Rio Grande do Sul
SID	<i>Semel in Die</i> - Uma vez ao dia
SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TfR	<i>Transferrin Receptor</i> - Receptor de Transferrina
TID	<i>Ter in Die</i> - Três vezes ao dia
VP1	<i>Viral Protein 1</i> - Proteína viral 1
VP2	<i>Viral Protein 2</i> - Proteína viral 2

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Per Cento
°C	Graus Celsius
>	Maior
≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
&	<i>And / e</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	PARVOVÍRUS CANINO	13
2.1	EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA	14
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGENIA	15
2.3	DIAGNÓSTICO	18
2.4	TRATAMENTO	21
2.5	PREVENÇÃO E CONTROLE	22
3	RESULTADOS	24
4	DISCUSSÃO GERAL	50
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A parvovirose canina é um distúrbio infeccioso com alta casuística na Medicina Veterinária. Trata-se de uma doença extremamente contagiosa, cuja etiologia é o parvovírus canino do tipo 2 (CPV-2), que, atualmente, representa o mais importante agente causal das afecções digestivas, substancialmente em cães jovens (MCCAW; HOSKINS, 2006). É responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo sua alta frequência relacionada com a grande resistência do vírus no ambiente (POLLOCK, 1985).

Como essa doença não possui tratamento específico, apenas de suporte, a internação para a fluidoterapia é uma alternativa importante. Também é recomendado o uso de antieméticos, antiácidos, protetores de mucosa, antibióticos, probióticos, analgésicos, antiespasmódicos, manejo nutricional e imunoterapia (GODDARD; LEISEWITZ, 2010; NELSON; COUTO, 2006; MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016; BICHARD; SHERDING, 1998; CAMARGO et al., 2006; TAMS, 2005).

O controle da doença se dá através de medidas de higiene, visto que o vírus é capaz de resistir a longos períodos de tempo no ambiente, podendo manter sua virulência por meses. Cães assintomáticos podem eliminar o CPV-2 em suas fezes e infectar outros animais sadios, e detergentes e desinfetantes comuns são incapazes de inativar o vírus. Dessa forma, a vacinação passa a ser o método mais eficiente para a prevenção da enfermidade (BICHARD; SHERDING, 1998; GODDARD; LEISEWITZ, 2010; MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016).

Apesar de a imunização através da vacinação ser a melhor maneira de prevenção e controle, relatos de animais vacinados que desenvolvem a doença ainda são comuns e causam dúvidas com relação à eficácia vacinal, principalmente em vacinas produzidas por laboratórios brasileiros.

Somado a isso, existe o surgimento de novas variantes do CPV-2, uma vez que o vírus está em constante evolução, gerando novas mutações e novos antígenos que se disseminam pela população canina. É de fundamental importância que as vacinas sejam capazes de conferir aos cães proteção contra as cepas atuais do ambiente (SANTANA et al., 2019).

No Brasil, existem diversas marcas de vacinas com diferentes protocolos de aplicação, sendo que a vacinação de cães não é uma atividade exclusiva de

médicos veterinários, e, muitas vezes, não há exame clínico e/ou laboratorial precedentes à aplicação das mesmas. Ademais, ocorrem inadequados armazenamento e transporte das vacinas nacionais, que são geralmente comercializadas em estabelecimentos como *pet shops*, agropecuárias e lojas virtuais para posterior aplicação no animal. Assim, levantam-se dúvidas com relação à eficácia das vacinas nacionais frente às vacinas importadas, as quais tem aplicação restrita a médicos veterinários, que devem examinar previamente o paciente e manter o produto nas condições de temperatura preconizadas pelo fabricante.

Posto isto, o objetivo geral do trabalho é realizar uma análise quantitativa e genética de CPV-2 em vacinas comercializadas no Brasil. A dissertação está estruturada da seguinte forma: primeiramente é abordado o parvovírus canino, cujo capítulo apresenta as seguintes subdivisões: epidemiologia e patogenia; manifestações clínicas e lesões; diagnóstico; tratamento; e, por fim, medidas de prevenção e controle. Na sequência, apresenta-se um artigo que será submetido para publicação, com o título "*Viral load and phylogenetic analysis of modified live canine parvovirus 2 vaccines commercialized in Brazil*". Para finalizar, há uma discussão geral comparando os resultados obtidos com os dados apresentados na literatura científica sobre o assunto, as principais conclusões e as perspectivas para novos estudos.

Acredita-se que os resultados desse trabalho possam contribuir para a condução de novas pesquisas, bem como para o melhoramento das condições de armazenamento e formulação das vacinas caninas.

2 PARVOVÍRUS CANINO

O CPV-2 pertence à família Parvoviridae, subfamília Parvovirinae, gênero Protoparvovirus, e caracteriza-se por ser um vírus pequeno (20 a 25 nm), esférico, com capsídeo icosaédrico, possuindo aproximadamente 5.200 nucleotídeos em uma molécula de DNA linear de fita simples (COTMORE et al., 2014; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; TIJSSEN et al., 2011; REED; JONES; MILLER, 1988).

Os parvovírus têm apenas quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes que contêm dois quadros de leitura aberta, em inglês *Open Reading Frames* (ORFs). A primeira ORF codifica as proteínas não-estruturais NS1 e NS2 e a segunda ORF codifica proteínas estruturais VP1 e VP2, cuja função é codificação parcial do capsídeo viral, o qual possui 54 cópias de VP2 e 6 cópias de VP1, totalizando 60 cópias. Sendo assim, a VP2 é responsável por 90% do capsídeo (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012) e também a principal proteína antigênica, o que determina o tropismo do parvovírus canino por alguns tecidos e uma gama de hospedeiros, visto que o mesmo tem potencial de causar moléstias em várias espécies de aves, caninos, roedores, suínos, bovinos, felinos e seres humanos (HUEFFER; PARRISH, 2003; TIMONEY et al., 1988; GODDARD; LEISEWITZ, 2010; ZHOU et al., 2017).

Até os anos 70, somente o vírus minuto dos canídeos (CPV-1) acometia os cães, sendo responsável por sinais respiratórios leves e eventuais abortos em cadelas. O CPV-2 emergiu em 1978, e suas análises antigênicas e filogenéticas indicam relação com o vírus da panleucopenia felina (FPV) (APPEL et al., 1979; TRUYEN et al., 1995).

A ascendência e evolução do CPV-2 é um assunto bastante debatido. A hipótese mais aceita é que este vírus tenha origem no FPV, do qual difere em poucos aminoácidos na proteína VP2 do capsídeo, o que possibilitou a ligação do receptor da transferrina (TfR) presente em células de cães e conferiu um potencial patogênico ao CPV-2 (PARRISH, 1991; TRUYEN, 1999). Essa ideia é reforçada pelo fato de 99% do DNA desses vírus serem idênticos (HUEFFER; PARRISH, 2003). Acredita-se que o vírus tenha realizado sua adaptação ao hospedeiro canino, por meio de carnívoros não domésticos, como o furão e a raposa (HUEFFER; PARRISH, 2003; TRUYEN, 2006).

Após seu estabelecimento, o CPV-2 passou por alterações genéticas e, durante os anos 1980 e 1981, surgiu sua primeira variante antigênica, o CPV-2a (CARMICHAEL, 2005). Em 1984, nos Estados Unidos da América (EUA), surgiu a segunda variante antigênica denominada CPV-2b e, no ano de 2000, na Itália, surgiu o CPV-2c (BUONAVOGLIA et al., 2001), que apresentava duas variações de aminoácidos, Ser-297-Ala e Asp-426-Glu. Ou seja, o CPV-2c se distingue dos demais por substituir os aminoácidos Asn e Asp pelo Glu, na posição 426 da proteína VP2 do capsídeo (HONG et al., 2007). O CPV-2c se difundiu pela Europa (DECARO et al., 2007; DECARO et al., 2011), Ásia (NAKAMURA et al., 2004) e Américas (KAPIL et al., 2007; PÉREZ et al., 2007), e sua presença foi relatada em vários países como Itália, Portugal, Espanha, França, Estados Unidos, Alemanha, Uruguai, Argentina, Equador e México (DUQUE-GARCÍA et al., 2016). No Brasil, o primeiro relato do CPV-2c ocorreu na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, realizado por Streck et al. (2009).

2.1 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

O CPV-2 é considerado o principal agente causal de gastroenterites em cães e normalmente está associado com grandes canis, ou seja, locais com agrupamento de cães (DUIJVESTIJN et al., 2016). Esse vírus pode resistir nas fezes, em temperatura ambiente, por mais de um ano, e em solo contaminado por até cinco meses (GORDON; ANGRICK, 1986). Trata-se de um patógeno altamente contagioso, com potencial de originar graves surtos em populações suscetíveis (GUILFORD, 1996). Pode acometer cães de qualquer raça, idade ou sexo, contudo filhotes entre seis semanas e seis meses de idade são mais predispostos (GODDARD; LEISEWITZ, 2010). As raças mais suscetíveis são *Doberman*, *Pinscher*, *Rotweiller*, *PitBull*, Labrador, Pastor Alemão (NELSON; COUTO, 2006), *Springer Spaniel* Inglês e cães de trenó do Alasca (TILLEY; SMITH JR., 2008). As razões para essa suscetibilidade não são bem esclarecidas, podendo ocorrer devido a componentes genéticos ou à popularidade das raças (GODDARD; LEISEWITZ, 2010).

Após a exposição oronasal às secreções e excreções de animais infectados, o vírus entra no organismo e inicia o período de incubação, que varia de sete a

quatorze dias. Em seguida, há intensa replicação viral nos tecidos linfoides gastroentéricos e a viremia ocorre em 3-5 dias, período no qual o vírus se dissemina via leucócitos infectados, causando destruição das células em rápida divisão como o epitélio da cripta intestinal; tecido linfoide, principalmente o timo, as tonsilas, os linfonodos e o baço; e células precursoras da medula óssea (PARRISH, 1995; MORAES; COSTA, 2007; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). Os sintomas costumam iniciar em 6-10 dias após a contaminação. No entanto, antes mesmo do surgimento dos sinais clínicos, os animais infectados já eliminam o vírus nas fezes. Essa eliminação viral pode durar até dez dias (TILLEY; SMITH JR., 2008).

Apesar de ter potencial de propagar-se por todos os tecidos (POLLOCK, 1982), o CPV-2 apresenta tropismo por células em constante replicação, devido ao fato de estas possuírem grandes quantidades de receptores denominados TfR, aos quais o CPV-2 se liga (PARRISH, 1995).

Após o surgimento do CPV-2, que se disseminou mundialmente, as mutações posteriores também surgiram em zonas geográficas distintas. Hoje, três variantes antigênicas de parvovírus canino afetam a população canina, sendo que a frequência relativa parece variar de acordo com as regiões geográficas e com as variações por flutuação temporal. Apesar de estas variantes antigênicas terem maior patogenicidade nos cães, também podem infectar gatos (BATTILANI et al., 2006).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGENIA

De acordo com McCaw e Hoskins (2006), muitas das infecções pelo CPV-2 é subclínica. Essas, muitas vezes, ocorrem em cães adultos não vacinados ou em filhotes com altos títulos de anticorpos maternos (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012; MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016). No entanto, quando há presença de sintomas, é possível evidenciar dois diferentes quadros clínicos: gastroenterite e miocardite (BATTERSBY; HARVEY, 2006).

A manifestação clínica mais característica da parvovirose canina é a gastroenterite hemorrágica, cuja extensão está diretamente relacionada aos títulos de anticorpos maternos dos filhotes no momento da infecção (DECARO, 2008; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). Nesse quadro, há a ruptura da barreira mucosa intestinal, atrofia das vilosidades e má absorção, hipovolemia severa, acidose

metabólica, translocação bacteriana com coliformes e subsequentes septicemia e endotoxemia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), hipercoagulabilidade e óbito (MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016). Os sinais clínicos da infecção pelo CPV-2 na gastroenterite são inespecíficos, geralmente incluem anorexia, dor, letargia, depressão, diarreia – hematoquezia, desidratação e hipertermia pelo processo inflamatório e também pelo dano bacteriano secundário (DECARO et al., 2005; CAMPBELL, 2013). Entretanto, o vômito é, geralmente, o achado mais predominante e pode ser grave a ponto de causar esofagite (CARMICHAEL, 2005). (Figura 1).

Figura 1: Visualização de hematoemese de filhote de Pastor Alemão diagnosticado com CPV-2.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2020).

Essa apresentação típica da gastroenterite ocorre, geralmente, em cães jovens não vacinados, os quais apresentam uma acentuada progressão dos sintomas (CARMICHAEL, 2005; DECARO et al., 2005). Também são evidenciadas perda de escore corporal e palidez de mucosa nasal e ocular (APPEL et al., 1979). Em alguns casos ocorre intussuscepção. Quando o quadro evolui para síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), o prognóstico passa a ser desfavorável. Cães com quadro de gastroenterite branda têm recuperação rápida de até 48 horas, mesmo quando não tratados. Já nos casos mais severos a recuperação é mais

tardia, de sete a dez dias ou mais, e exige tratamento intensivo, podendo ocorrer o óbito em até 24 horas (SWANGO, 1997; MCCANDLISH, 2001).

Pollock (1982) menciona que em casos de choque pode haver hipotermia, cujos sinais inicialmente são: pulso normal ou fraco, palidez de mucosas, aumento do tempo de preenchimento capilar, hipotensão, nível de consciência reduzido e baixa temperatura corpórea. Os animais não tratados nesse momento progredem para um estágio terminal caracterizado por bradicardia, mucosas pálidas e cianóticas, hipotensão severa, anúria, estupor ou coma. Nesses casos, a parada cardiorrespiratória é iminente e pode levar os animais à morte (MORAES; COSTA, 2012).

A miocardite por parvovírus atinge cães recém-nascidos de três a oito semanas de vida (HOSKINS, 1997). Normalmente, todos os filhotes da ninhada são acometidos e têm morte súbita ou sinais inespecíficos, demonstrando, mais tarde, sinais de insuficiência cardíaca. Atualmente, essa forma clínica da parvovirose canina é raramente encontrada (MEUNIER et al., 1984; MORAES; COSTA, 2007; VIEIRA, et al., 2011; GREENE; DECARO, 2015; PEREIRA, 2015). No entanto, é possível ocorrer infecção intrauterina ou em filhotes com menos de oito semanas, nascidos de cadelas não vacinadas (GODDARD; LEISEWITZ, 2010). Alguns animais podem apresentar náuseas, anorexia, vômito, diarreia, hipertermia, convulsões, secreções oronasais, agitação, choro e dispneia poucas horas antes do óbito. Arritmias ventriculares podem ser evidenciadas ao eletrocardiograma (MULVEY et al., 1980; CARPENTER et al., 1980).

A lesão externa em necropsia mais comumente observada em infecções pelo CPV-2 é a palidez de mucosas devido à perda de sangue no intestino delgado. Também são comuns olhos fundos e baixo escore corporal (BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). As lesões intestinais são variáveis e inespecíficas, mas a alteração mais significativa na mucosa intestinal são as placas de Peyer aumentadas e aprofundadas (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; OLIVEIRA et al., 2009; BARKER; DREUMEL; PALMER, 1993). As porções do intestino mais atingidas são jejuno e íleo, mas o duodeno também é acometido (MEUNIER et al., 1981). As lesões variam de leves a graves, com as alças intestinais apresentando a camada serosa rugosa e hiperêmica, coberta ou não por fibrina. A congestão da camada subserosa e o edema na mucosa aumentam a espessura da parede intestinal (OLIVEIRA et al.,

2009). Os linfonodos mesentéricos e tonsilas encontram-se aumentados e avermelhados (APPEL; PARRISH, 1987; OLIVEIRA et al., 2009; MEUNIER et al., 1985). Ocorre diminuição ou atrofia do timo e esplenomegalia (MEUNIER et al., 1985; OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com Parrish (1995), a medula óssea também pode ser gravemente afetada, com uma diminuição de sua celularidade. No fêmur, a medula óssea pode estar liquefeita (ROBINSON; WILCOX; FLOWER, 1980). É possível observar necrose e redução das células germinativas e maduras das séries mieloide e eritroide, seguidas de hipoplasia regenerativa durante a recuperação do cão (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; OLIVEIRA et al., 2009). Outras lesões microscópicas ainda incluem a redução e necrose dos folículos linfoides do baço, timo e linfonodos, especialmente os mesentéricos (MEUNIER et al., 1985) e necrose de miocardiócitos (MEUNIER et al., 1984).

2.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico baseado apenas na apresentação clínica da parvovirose canina é considerado impreciso, pois outros patógenos também podem causar vômitos de início agudo, depressão, desidratação, febre e diarreia em cães, tais como coronavírus, adenovírus, morbilivírus, rotavírus e reovírus. Dessa forma, a suspeita clínica deve ser sempre confirmada por exames laboratoriais (GODDARD; LEISEWITZ, 2010; DECARO et al., 2005). Sendo a infecção por parvovírus canino uma doença de caráter infecto-contagiosa, o diagnóstico rápido é essencial na instituição do tratamento oportuno, definição de prognóstico e controle de sua propagação (VIEIRA et al., 2008).

As alterações hematológicas da parvovirose podem ser bastante graves. Usualmente, leucopenia com linfopenia ocorre devido à necrose dos tecidos linfoides (SWANGO, 1997). Em decorrência do dano intestinal há constante perda sanguínea, que leva à anemia. É possível observar leucocitose com desvio à esquerda em animais que estão se recuperando, em consequência da regeneração do tecido linfoide. As alterações bioquímicas mais encontradas são: hipoalbuminemia, hipocalcemia, hipocalemia, hiperfosfatemia, hiponatremia, aumento de ureia em consequência da oligúria e azotemia pré-renal em decorrência da hipovolemia

(JACOBS et al., 1980, GONZÁLEZ; SILVA, 2006). A enzima alanina aminotransferase se eleva em aproximadamente 25% dos casos. Desequilíbrios ácido-básicos em cães gravemente doentes indicam quadro de acidose metabólica (STROMBECK; GUILFORD, 1991).

Devido as alterações de hemograma não serem específicas, muitos métodos laboratoriais foram desenvolvidos a fim de diagnosticar a moléstia. As técnicas disponíveis se baseiam principalmente na detecção direta do CPV nas fezes dos cães no período agudo da infecção (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). O vírus pode ser detectado por microscopia eletrônica e isolamento viral em cultivo celular. No entanto, essas técnicas não são utilizadas na rotina, pois requerem treinamento, equipamentos específicos e demandam tempo (DESARIO et al., 2005; KUMAR; NANDI, 2010; GODDARD; LEISEWITZ, 2010; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). Convém mencionar que nenhum sinal radiográfico ou ultrassonográfico específico está associado à enterite por parvovírus canino (GODDARD; LEISEWITZ, 2010).

A identificação do vírus por teste de hemaglutinação, imunocromatografia e reação em cadeia da polimerase (PCR) ou ainda a detecção indireta por testes sorológicos como inibição da hemaglutinação e soroneutralização e teste de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) são também usados para fins diagnósticos (HOSKINS, 2004; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012).

O teste de hemaglutinação consiste em empregar as propriedades dos parvovírus de aglutinarem hemácias *in vitro*. Para tanto, utilizam-se hemácias de suínos em microplacas combinadas com uma porção de fezes de um animal suspeito e avalia-se o grau de hemaglutinação. Essa técnica necessita de eritrócitos frescos para que se evitem problemas de gerenciamento e alojamento de suínos doadores. Além disso, pode ser afetada por um coeficiente alterado de hemácias que ocorre por estresse ou doença do animal doador (DESARIO et al., 2005). A inibição da hemaglutinação também pode ser usada para diagnóstico da parvovirose, mas antes é necessário revelar a atividade biológica do parvovírus contra o qual o soro está sendo testado, efetuando a constatação da hemaglutinação (STRECK et al., 2007). Apesar de ser um método considerado simples, rápido e barato, possui baixa reprodutibilidade e automação (SYKES, 2013).

Os testes de imunocromatografia são os mais utilizados na rotina clínica, pois apresentam rápida e fácil execução, podendo ser realizados no consultório pelo próprio médico veterinário (VIEIRA et al., 2011). Existe uma grande quantidade de marcas comerciais desses testes denominados “*snaps*”. Os testes geralmente são confeccionados sobre uma placa de suporte, sendo constituídos de filtro de amostra, suporte do conjugado, membrana de nitrocelulose e filtro de adsorção, que se sobrepõem (O’FARRELL, 2009). Em geral, apresentam elevada especificidade para o diagnóstico da parvovirose, superior a 80%. Porém, a sensibilidade pode variar, pois as fezes do animal podem ter alterações na quantidade de vírus (BERGMANN et al., 2021).

O diagnóstico sorológico laboratorial, principalmente por ELISA, consiste na detecção de anticorpos dos tipos IgM ou IgG, podendo ser útil na confirmação da infecção ativa ou passada pelo CPV. Levando em consideração a prevalência de anticorpos na população canina contra o parvovírus, o diagnóstico de infecção ativa requer evidência de soroconversão ou a presença de anticorpos da classe IgM (GREENE, 2015). Além disso, cerca de 95% dos cães possuem soroconversão pela vacinação ou exposição anterior; sendo assim, esses testes sorológicos indiretos não possuem um bom valor diagnóstico, bem como não oferecem diagnóstico de infecções em fases agudas (TINKY et al., 2015).

Técnicas moleculares como a PCR, associada ou não a enzimas de restrição, e o sequenciamento genético apresentam alta especificidade e sensibilidade, possibilitando a detecção do vírus e a caracterização das cepas virais (MARTELLA et al., 2005), quando comparadas com os testes tradicionais (GODDARD; LEISEWITZ, 2010). A PCR em tempo real, além da alta sensibilidade, ainda é específica e permite a detecção e quantificação do CPV em poucas horas. Contudo, os ensaios moleculares, especialmente o método de PCR em tempo real, requerem elevado investimento em equipamentos, reagentes e operações especializadas (DESARIO et al., 2005; DECARO et al., 2005). Ademais, essas análises podem ser afetadas pelas modificações nas propriedades antigênicas do vírus, e devem, portanto, ser atualizadas periodicamente (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012).

2.4 TRATAMENTO

Ainda não há terapia específica para a parvovirose canina, e o gerenciamento da doença é basicamente de suporte através de tratamento com fluidos cristaloides, coloides sintéticos e naturais, correção da hipoglicemia e distúrbios eletrolíticos, combinação de antibióticos, antieméticos, analgésicos e suporte nutricional (GODDARD; LEISEWITZ, 2010).

Os animais desidratados precisam receber fluido preferencialmente por via endovenosa. É necessário evitar qualquer aporte oral, uma vez que a ingestão de alimentos causa vômitos, os quais requerem controle através da administração de metoclopramida subcutânea na dose de 0,2-0,4 mg/kg quatro vezes ao dia (QID) ou três vezes ao dia (TID) ou em infusão contínua na dose de 1-2 mg/kg/dia ou ondasetrona na dose de 0,5-1,0 mg/kg a cada uma vez ao dia (SID) OU duas vezes ao dia (BID) (TILLEY; SMITH JR., 2008; NELSON; COUTO, 2006). Caso os vômitos persistam, o citrato de maropitan (4-8 mg/kg, uma vez ao dia) torna-se uma opção (PEREIRA, 2017).

Em casos de gastrite e esofagite, o sucralfato líquido pode ser útil (NELSON; COUTO, 2006), bem como omeprazol na dose de 0,5-1,0 mg/kg, duas vezes ao dia (PEREIRA, 2017). A dor abdominal pode ser atenuada com anti-inflamatórios, como flunexina de meglumina (1mg/kg, IV, uma vez ao dia, 7 dias) (MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016; PEREIRA, 2017). Convém lembrar que é necessária cautela ao administrar AINEs em virtude da toxicidade renal (TILLEY; SMITH JR., 2008).

A antibioticoterapia se faz necessária em casos de infecções secundárias e as cefalosporinas de primeira e segunda geração são indicadas, devendo ser substituídas, caso não funcionem, pelo metronidazol na dose 15-20 mg/kg BID por 10 dias (GODDARD; LEISEWITZ, 2010) ou ciprofloxacino (FLORES, 2007; MYLONAKIS; KALLI; RALLIS, 2016). Ainda há a opção de uso de aminoglicosídeos como a amicacina 20 mg/kg IV (GODDARD; LEISEWITZ, 2010), os quais devem ser utilizados apenas em filhotes com boa hidratação (TILLEY; SMITH JR., 2008).

2.5 PREVENÇÃO E CONTROLE

Como todo parvovírus, o CPV-2 é bastante estável e pode sobreviver por muito tempo no ambiente devido ao fato de não ser envelopado. Possui resistência às mudanças de pH (de 3 a 9) e às variações de temperatura (DECARO, 2008) e umidade (HOSKINS, 1998; GREENE, 2015). Em temperaturas abaixo de 7°C, o vírus pode manter seu potencial infectante por vários meses (KENNEDY et al., 1995). No entanto, o vírus sofre ação de formaldeído a 5%, hipoclorito de sódio a 0,175% e glutaraldeído, podendo também ser inativado por calor a uma temperatura de 56°C por 60 minutos ou ainda por radiação gama (GODDARD; LEISEWITZ, 2010; MORAES; COSTA, 2012; TIMONEY et al., 1988; GREENE, 2015).

Os cães acometidos, inclusive com quadro subclínico, eliminam o vírus nas fezes (NELSON; COUTO, 2006). Desse modo, o isolamento dos animais infectados e a descontaminação do ambiente que os abrigava são de fundamental importância para conter a propagação do agente (HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). Boas práticas de higiene, incluindo a desinfecção das instalações e de pessoas, são essenciais para a prevenção da transmissão do vírus (PRITTIE, 2004), uma vez que fômites, roedores, insetos e o homem são vetores do patógeno (HOSKINS, 1997). O isolamento dos cães acometidos pela parvovirose, pelo período mínimo de uma semana após a recuperação completa, contribui para o controle do vírus (BICHARD; SHERDING, 1998). Contudo, além de uma boa higiene para a prevenção da parvovirose, é preciso garantir a imunidade individual eficaz, através de vacinação (PRITTIE, 2004). É crucial que os cães fiquem sem contato com a rua e com outros animais até terem o quadro vacinal completo, e o cuidado com a limpeza do ambiente precisa ser rigoroso (MCCANDLISH, 2001; NELSON; COUTO, 2006; MORAES; COSTA, 2012).

O sistema de vacinação de filhotes é o método mais efetivo na prevenção da parvovirose. Usualmente, os cães devem receber a primeira dose entre seis e oito semanas de idade, com dois reforços da vacina a cada quatro semanas (conforme cada protocolo recomendado pela marca da vacina). À medida que a imunidade passiva declina, ocorre a estimulação da imunidade ativa, sendo indicado o isolamento do animal até concluir a etapa de imunização (FLORES, 2007; DECARO et al., 2020).

As vacinas vivas atenuadas utilizadas atualmente são baseadas nas cepas CPV-2 ou CPV-2b originais. Apesar das alterações genéticas que deram origem aos subtipos CPV-2^a, CPV-2b e CPV-2c, as diferenças entre essas três cepas são mínimas, o que confere uma boa proteção cruzada (FLORES, 2007; DECARO et al., 2020).

A vacinação eficaz depende tanto do nível de anticorpos maternos, como do tipo de vacina usado (título, grau de atenuação, as propriedades antigênicas da cepa viral e da via de administração) (PRITTIE, 2004; MARTELLA et al., 2005). O motivo mais comum de falha vacinal é a neutralização do vírus da vacina pelos anticorpos maternos (DAY; SCHULTZ, 2014), visto que a imunidade passiva persiste por até 18 semanas de idade nos animais (NELSON; COUTO, 2006). Um título de anticorpos maternos $\geq 1:20$ pode interferir na vacinação, mas não evitar a infecção com vírus virulento, já que o título considerado protetor é de $>1:80$ (BUONAVOGLIA et al., 1992; WANER et al., 1996; MARTELLA et al., 2005).

3 RESULTADOS

Os resultados estão descritos em forma de artigo científico, a ser submetido para o periódico *Brazilian Journal of Microbiology*.

Phylogenetic analysis and viral load of canine parvovirus 2 strains from modified live vaccines in Brazil.

Michele Lencina¹, Wesley Santana¹, Diéssy Kipper¹, Suélen Paesi², Vagner Ricardo Lunge³, André Felipe Streck¹

¹Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária - Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil

²Laboratório de Diagnóstico Molecular - Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil

³Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil.

* Corresponding author: afstreck@ucs.br

ABSTRACT

Canine parvovirus is a highly contagious and frequently fatal disease in dogs. Vaccination is considered the unique tool to prevent and control canine parvovirus 2 (CPV-2). However, the effectiveness of the most used modified live vaccines has been controversial because the very high occurrence of dogs with CPV-2 in Brazil. It is supposed that current vaccines could not elicit proper immune response due to the original CPV-2 strains used in these biological products (different from the field variants) as well as the thermal conditions to store them until the effective immunization of the dogs. The present study aimed to perform a phylogenetic analysis and to determine the viral load of CPV-2 strains from vaccines commercialized in Brazil. Eighty vaccine vials were obtained from eight important manufacturers in the country. Thermal conditions for the storage of the vaccine vials were evaluated with a proper technical questionnaire. Viral protein 2 (VP2) gene was sequenced in all samples and the results were comparatively analyzed with global phylogenetic trees. Real time PCR was carried out to determine the viral load in all vaccine vials. The phylogenetic results demonstrated that all CPV-2 vaccine strains belonged to the original genetic clade from the first viral spreading that occurred more than 40 years ago, different from current disseminated lineages. Amino acid differences were observed in several VP2 protein positions. The vaccine viral loads ranged from 4.12×10^2 to 4.89×10^{10} DNA copies / mL in the vaccine vials. Importantly, seven vials from three different manufacturers presented undetectable CPV-2 DNA. These results demonstrated that antigenic differences between CPV-2 vaccine and field strains as well as low DNA load in the vaccine vials are probably related to the vaccination failures and the occurrence of canine parvovirus outbreaks in Brazil.

INTRODUCTION

Canine parvovirus is a severe hemorrhagic gastroenteritis characterized by loss of appetite, diarrhea, depression and vomiting (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012; MITTAL et al., 2014). It is a concerning disease in veterinary medicine due to the high rate of morbidity and mortality (GREENE, 2015). The etiological agent of this disease is the canine parvovirus type 2 (CPV-2). It is classified in the family Parvoviridae, subfamily Densovirinae, genus Protoparvovirus and species Carnivore protoparvovirus 1 (COTMORE et al., 2019).

Vaccination is one of the most important tools to control CPV-2. All dogs should be immunized independently of the country, since it protects from severe, life-threatening diseases (DAY et al., 2016). Modified live virus (MLV) vaccines induce a strong, long-lasting (usually life-long) immunity by replicating within the host, without producing significant tissue damage or clinical signs (DECARO et al., 2020). The major capsid protein (viral protein 2 - VP2) is the main antigenic viral portion that induces neutralizing antibodies (DECARO and BUONAVOGLIA, 2012).

Despite the availability of the CPV-2 MLV vaccines and the immunization programs that have been largely introduced worldwide, canine parvovirus represents one of the most frequent infectious diseases and cause of death in juvenile dogs, mostly in countries under development (DECARO and BUONAVOGLIA, 2012). In Brazil, CPV-2 MLV vaccines are produced by different pharmaceutical industries and there are more than ten important manufacturers in the country, including local producers as well as international companies. Unfortunately, a more effective quality control of the vaccine production is necessary for the commercial vaccines seled in veterinary stores.

The present study aimed to identify viral strains by VP-2 sequencing and phylogenetic analysis as well as to determine the viral load in vaccines commercialized in Brazil. In addition, different conditions of storage and ways of application were also evaluated in the commercial veterinary stores.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Eighty vials from eight different commercial CPV-2 MLV vaccines (ten vials per manufacturer) were obtained for this study (Table S1). They were purchased at different commercial veterinary stores in 20 cities in the state of Rio Grande do Sul from January to December 2019. All vaccines were named from Vac-1 to Vac-8 according to the different manufacturers (Table 1). Additionally, one standardized technical questionnaire was used to collect data from the transport and storage proceedings in the veterinary store (Figure S1). After the acquisition, all samples were maintained at low temperatures (2°C to 8°C) until laboratorial analysis.

Table 1 - Description of the commercial vaccines and viral DNA loads.

Code	Strain	Nationality	DNA copy number (mean)	DNA copy number (min-max)
Vac-1	CPV - 154	International	2.18E+09	4.06E+07 – 2.68E+10
Vac-2	780916	International	2.15E+09	1.64E+09 – 7.33E+09
Vac-3	Not informed	International	4.11E+02	6.35E+03 – 5.32E+04
Vac-4	CPV-2	Brazilian	2.57E+09	6.52E08– 5.12E+09
Vac-5	Not informed	Brazilian	1.09E+09	1.83E+08 – 4.89E+10
Vac-6	Not informed	Brazilian	3.18E+09	5.34E+08 – 2.46E+09
Vac-7	Cornell 916	Brazilian	2.69+08	5.94+07 – 4.03E+09
Vac-8	CPV 780916	Brazilian	4.19E+09	4.53+07 – 1.02E+10

CPV-2 quantification and VP2 sequencing

Total DNA in the vaccine vials were extracted using NewGene Prep and PreAmp reagent kits according to manufacturer instructions (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil). q-PCR and evaluation of the viral load (quantification) was carried out in duplicate as previously described (STRECK et al., 2013). Additionally, CT 36 was defined as the limit for a positive detection. All extraction and amplification procedures were performed on the same day as the vaccines were obtained.

One DNA sample per manufacturer was selected for VP2 gene sequencing. VP2 gene was amplified by PCR as previously described (DE OLIVEIRA et al., 2019). PCR sequencing products were analyzed by capillary electrophoresis on the 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). All results were evaluated with Data Collection v. 3.1 software (Thermo Fisher Scientific). Consensus sequences were further analyzed with Geneious v. 2020.2.4 (Biomasters, www.geneious.com). Nucleotide sequences were submitted to the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) under accession numbers MW648348-648369 (Table S1).

CPV-2 phylogenetic and structural analysis

All nucleotide sequences were comparatively analyzed with more 315 public CPV-2 VP2 complete gene sequences downloaded from the GenBank database. The complete dataset included 114 sequences from Brazilian CPV-2 field variants and four commercial vaccine strains (KP406926, FJ011098, FJ011097, and EU914139). The sequences were aligned using MAFFT (KATO & STANDLEY, 2016). Nucleotides and amino acids sequences were visually inspected in the program Geneious® v. 2020.2.4. In addition, amino acid phylogeny was generated using the MEGA-X program (KUMAR et al., 2018). A preliminary evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining algorithm with 1000 bootstrap replicates (NEI & KUMAR, 2000). The phylogeny was edited using the program FigTree v. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Finally, VP2 epitopes were predicted with BepiPred v. 2.0 (JESPERSEN et al., 2017).

RESULTS

CPV-2 detection and quantitation in the vaccine vials

CPV-2 was detected in a total of 73 vaccine vials. qPCR results were negative in the other seven vaccine vials, produced by four different manufacturers: one from Vac-1, one from Vac-2, five from Vac-3 and one from Vac-5 (Table S3). CPV-2 loads ranged from 0 to 4.89E+10 DNA copies / mL. There were 63 (78.75%) vaccine vials

with a viral load higher than $1\text{E}+08$ DNA copies / mL and 17 (21.25%) vials had loads from 0 till $9,90\text{E}+07$ DNA copies / mL.

Phylogenetic analysis of the CPV-2 vaccine strains

All 323 CPV-2 VP2 sequences were analyzed and the strains could be classified into two main clades (Figure 1). Clade I included sequences from South America (n = 154; 56.7%), Asia (n = 66; 23.8%), North America (n = 23; 8.2%), Europe (n = 20; 7.1%), and Africa (n = 13; 4.1%). All vaccine strains clustered in the clade O, independently from the antigenic types, CPV-2 or CPV-2b. This clade (clade O) was mainly formed by ancestral canine parvovirus sequences, dating 1978 as the average isolation year (almost 40 years ago). Clade O included sequences from South America (n = 17; 36.2%), North America (n = 17; 36.2%), Europe (n = 7; 14.8%), Asia (n = 1; 2.2%), and five sequences (10.6%) without country information. The field strains could be classified into a main clade disseminated worldwide today (Clade I), with several different lineages, without a complete association with the previous identified genotypes CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. Most of these sequences of clade I were collected from Brazil from the 1980s up to 2010 (n = 28; 28.5%), but there were also 70 samples (71.5%) isolated from after 2011, demonstrating a currently circulation of samples from this clade in Brazil

VP2 amino acid epitopes in the CPV-2 vaccines

VP2 amino acid sequences of the vaccine strains were similar to the original CPV-2 reference samples (M19296). Compared to this strain, single amino acid substitutions could be identified in the vaccine strains, as T-44-A, I-219-V, K-271-R, T-301-I, V316-I/L/V, Y-367-D, D-375-N, Q-386-K and Y-573-F. Most vaccines exhibited up to five amino acid modifications for the ancestral strain, the only exception being vaccines 5 and 8 which had seven modifications (Table S2).

To identify possible antigenic distances between the new field variants (clade I) and the vaccine strains (clade O), the main antigenic regions were predicted (Table 2). The prediction of epitopes revealed that the main antigenic fractions were located in the loops of the VP2 protein (loop 1: around amino acid position 75-105, loop 2:

200-240, loop 3: 280 – 330 and loop 4: 400- 450). These positions covered the majority of the virus surface, including the threefold spike.

It was observed 58 sites with amino acid substitutions that occurred in the VP gene in the different samples available Genbank. Only eight (13.8%) substitutions were located in areas not demarcated as epitopes, indicating the interaction with the immune system as an evolutionary driver. Most of these amino acid substitutions (48) had no predominance in the sequences and were sporadically finding in the sequences; however, 10 amino acid substitutions were predominant. These modifications summarize changes in hydrophobicity, structure or polarity, leading to important modifications for antibody binding.

Table 2 - Amino acid substitutions present in different CPV-2 clades. The sites highlighted in gray represent putative epitopes. The sites highlighted with red/yellow represent amino acids substitutions (red: substitution present in more than 50% of the sequences / yellow: less than 50%) in comparison with the original CPV-2 strain (M19296).

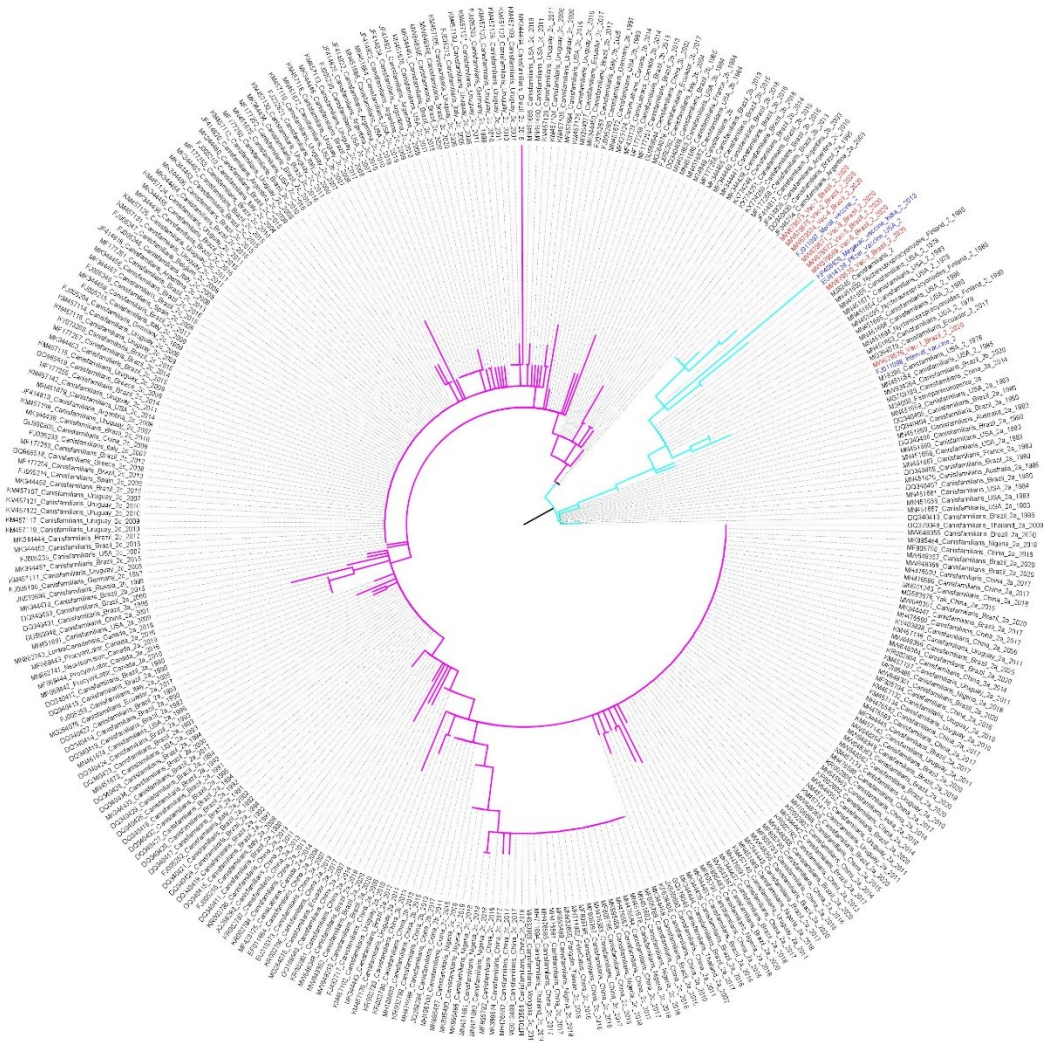


Figure 1 - Phylogenetic tree based on 311 public field strains, four vaccine strains obtained from GenBank (tip label blue) and eight vaccine strains sequenced in this study (tip label red), of amino acids from the CPV VP2 gene. Purple branches are Clade I and blue branches are Clade O. The evolutionary history was established by the Neighbor-Joining method, with 1000 bootstrap replicates.

Information collected at points of sale or vaccination

A questionnaire was applied with sales points and veterinary clinics to collect information on storage and perceptions about vaccines. When asked about the relationship between the equality of the effectiveness of national and multinational vaccines, 60% of the interviewees believe that there are differences between national and international brands, while 40% believe that both are equally effective. Observing the 80 establishments, 75% had a responsible veterinarian, against 25% where the absence was reported. This percentage is higher in agro stores and pet shops, which only 15% had a veterinarian. 51.2% of respondents answered that they provide instructions for application of the product (Figure S2).

All establishments informed to possess an adequate storage system, 91.2% of the interviewees informed that storage vaccine doses in the refrigerator body, 5% at the door, and 3.7% in both locations. 81.2% of the interviewees measure the storage temperature with a thermometer (2-8°C) and 18.7% did not have thermal control in the refrigerator (Figure S2).

DISCUSSION

Vaccines for the protection from infectious diseases that affect canines were developed in the past 50 years. Research and development during this time period has focused on controlling fatal infectious diseases like canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvovirus infections, or leptospirosis. Modified live virus (MLV) vaccines became the products of choice to control fatal virus infections in dogs. They induce rapid and prolonged cellular as well as humoral immune responses after a single inoculation in susceptible animals (APPEL, 1979). Although most vaccines on the market are safe and efficacious, there have been exceptions where disease was induced by vaccination or dogs were not protected.

In Brazil, there are many vaccine manufacturing laboratories and also vaccines from multinational companies. In the country, multinational vaccines are sold exclusively to veterinary clinics and applied by veterinarians through clinical examination, while national vaccines can be marketed by any veterinary

establishments. Usually, they are applied by owners with less financial condition. In this context, vaccines from multinational companies are seen as products of superior quality. In this work, samples from different brands were accessed in regard to their amount of viral DNA and antigenic profile. Additionally, in the present study all vaccines were obtained at points of sale (or application) in order to analyze the product when reach the consumer/client.

A questionnaire was applied with sales points and veterinary clinics to collect information on storage and perceptions about vaccines. When asked about the relationship between the equality of the effectiveness of national and multinational vaccines, 60% of the interviewees believe that there are differences between national and international brands, while 40% believe that both are equally effective. Observing the 80 establishments, 75% had a responsible veterinarian, against 25% where the absence was reported. This percentage is higher in agro stores and pet shops, which only 15% had a veterinarian. 51.2% of respondents answered that they provide instructions for application of the product. Although errors in manufacturing can affect the efficacy of CPV-2 vaccines, incorrect storage and transportation that interrupt the cold chain, may potentially inactivate live vaccines, especially in warm climate regions (DAY et al., 2016). The fact that some establishments do not store vaccines correctly and, sometimes, do not even have temperature control in the refrigerator raise concern and point to an inefficient distribution chain.

The quantitative assessment of the number of copies of viral DNA present in vaccines was used as an indicator of the quality of a given vaccine sample. Certainly, a vaccine must also be evaluated against experiments conducted on animals, but the amount of genome in an MLV vaccine is critical to its efficiency. In this study, the variation among DNA copy numbers in the same brand from different establishments is worrying. It was even possible to observe that some samples were absent as to the presence of DNA. In one of the brands, we found a low number of copies in all samples. It is possible that some component of the formulation is inhibiting the PCR. This was not observed in the other brands, as they have a number of copies compatible with that usually obtained in cell cultures.

Likewise, it was observed in this study that vaccines from national and multinational brands did not present such different numbers when evaluated with

regard to the number of copies of each sample. However, the variance observed in each brand by the values of the standard deviations, shows that the quantity of DNA copies reaches the consumer with disparity. Which may not guarantee the vaccine efficacy and justify part of the in-vivo vaccine failures.

In turn, the amino acid analysis of all vaccine-based strains demonstrated an ancient origin of these strain, possibly from the original CPV-2 samples. These samples show significant differences from the samples found in later years. The analysis of epitopes was able to demonstrate that these differences are found in antigenically important regions, mainly in the loops of the protein. Among those, the loop 1 and loop 2 regions identified as escape fractions, since mutations in those sites can cause reactivity change of monoclonal antibodies (STRASSHEIM et al., 1994). The loop 4 shape the 3-fold spike of the capsid and loop 3 is located in their shoulder. These positions are responsible for virus-host interaction and considered highly variable among parvoviruses. Amino acid modifications on these sites are also considered escape mutations to neutralizing antibodies (PARRISH & CARMICHAEL, 1983; CHAMPMAN & ROSSMANN, 1993; HAFENSTEIN et al., 2009). With modifications in these important hotspots, it is not surprising that studies with antisera raised against the various antigenic types revealed substantial differences in the neutralization capability (PRATELLI et al., 2000; CAVALLI et al., 2008). Worryingly, we can evidence several amino acids in important antigenic portions, which are distributed among the field samples. This indicates the existence of different phenotypic profiles which can differ from the vaccine type.

In conclusion, the present study demonstrates that there is no significant difference between the CPV-2 vaccine brands marketed in Brazil with respect to the antigenic profile. Vaccines should contain the newest antigenic types, as this implies the most complete protection. For CPV-2, changes within the capsid protein that occurred over the last 50 years lead to the occurrence of distinct capsid profiles. In Brazil, we can observe the circulation of all field clades, emphasizing the importance of updating the vaccine strain. It also causes concern the absence of CPV-2 DNA in some vaccine vial and the DNA variation among brands. This study highlights the importance a continuous surveillance over the effectiveness of pet vaccines, as observed with human vaccines.

REFERENCES

- APPEL, M. J.; COOPER, B. J.; GREISEN, H.; SCOTT, F. W.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. I. Status report on corona-and parvo-like viral enteritides. **The Cornell veterinarian**, v. 69, n. 3, p. 123-133, 1979.
- CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; CAMERO, M.; BELLACICCO, A. L.; DE PALO, P.; DECARO, N.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 534-539, 2008.
- CHAPMAN, M. S.; ROSSMANN, M. G. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. **Virology**, v. 194, n. 2, p. 491-508, 1993.
- COTMORE, S. F.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; CANUTI, M.; CHIORINI, J. A.; EIS-HUBINGER, A. M.; HUGHES, J.; MIETZSCH, M.; MODHA, S.; OGLIASTRO, M.; PÉNZES, J. J.; PINTEL, D. J.; QIU, J.; SODERLUND-VENERMO, M.; TATTERSALL, P.; TIJSSSEN, P.; ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. **The Journal of general virology**, v. 100, n. 3, p. 367, 2019.
- DAY, M. J.; HORZINEK, M. C.; SCHULTZ, R. D.; SQUIRES, R. A.; VACCINATION GUIDELINES GROUP (VGG) OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION (WSAVA). WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. **The Journal of small animal practice**, v. 57, n. 1, p. E1, 2016.
- DE OLIVEIRA, P.; CARGNELUTTI, J. F.; MASUDA, E. K.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. **Archives of virology**, v. 164, n. 5, p. 1361-1369, 2019.
- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus - a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. **Veterinary microbiology**, v. 155, n. 1, p. 1-12, 2012.
- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; BARRS, V. R. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication?. **Veterinary Microbiology**, p. 108760, 2020.
- GREENE, C.E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.
- HAFENSTEIN, S.; BOWMAN, V. D.; SUN, T.; NELSON, C. D.; PALERMO, L. M.; CHIPMAN, P. R.; BATTISTI, A. J.; PARRISH, C. R.; ROSSMANN, M. G. Structural comparison of different antibodies interacting with parvovirus capsids. **Journal of virology**, v. 83, n. 11, p. 5556-5566, 2009.
- JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W24-W29, 2017.
- KATO, K.; STANDLEY, D. M. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, v. 32, n. 13, p. 1933-1942, 2016.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

MITTAL, M.; CHAKRAVARTI, S.; MOHAPATRA, J. K.; CHUG, P. K.; DUBEY, R.; UPMANUYU, V.; NARWAL, P. S.; KUMAR, A.; CHURAMANI, C. P.; KANWAR, N. S. Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 1-6, 2014.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford university press, 2000.

PARRISH, C. R.; CARMICHAEL, L. E. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. **Virology**, v. 129, n. 2, p. 401-414, 1983.

PRATELLI, A.; CAVALLI, A.; NORMANNO, G.; DE PALMA, M. G.; PASTORELLI, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2b). **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 47, n. 4, p. 273-276, 2000.

STRASSHEIM, M. L.; GRUENBERG, A.; VEIJALAINEN, P.; SGRO, J. Y.; PARRISH, C. R. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. **Virology**, v. 198, n. 1, p. 175-184, 1994.

STRECK, A. F.; RÜSTER, D.; TRUYEN, U.; HOMEIER, T. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. **Journal of virological methods**, v. 193, n. 1, p. 6-8, 2013.

Complementary Form

Project Canine Parvovirus – Responsible Veterinarian: Michele Machado
Lencina

General Information

Protocol: _____ / _____

Institute: _____

Telephone: _____

Address: _____

Responsible Veterinarian: _____

Email for sending the results: _____

Date of collection: _____

Time of collection: _____

Specific information of the product:

Vaccine brand: _____

Batch: _____

Manufacturing date: _____

Expiration date: _____

Conditioning and Use:

- 1) Do the national and imported vaccines have the same efficiency? yes () no
- 2) Are the vaccines stored in a refrigerator/minibar? yes () no
In case of negative answer, what is the storage location? _____
- 3) In what part of the refrigerator/minibar are the vaccines stored?
 door () refrigerator body () both
- 4) Does the refrigerator/minibar have temperature control through thermometer?
 yes () no
In case of affirmative answer, what is the average temperature? _____
- 5) After being acquired, in what way are the vaccines stored to take them to the client's residence?
 bag with ice () Styrofoam with ice () only applied in the institute
- 6) Are the vaccines sold with printed directions? yes () no
- 7) Are instructions related to the application of the vaccine provided to the client? yes () no
- 8) Is the pet clinically assessed before the application of the vaccine? yes () no

Figure S1- Questionnaire applied at the time of acquisition of vaccine samples

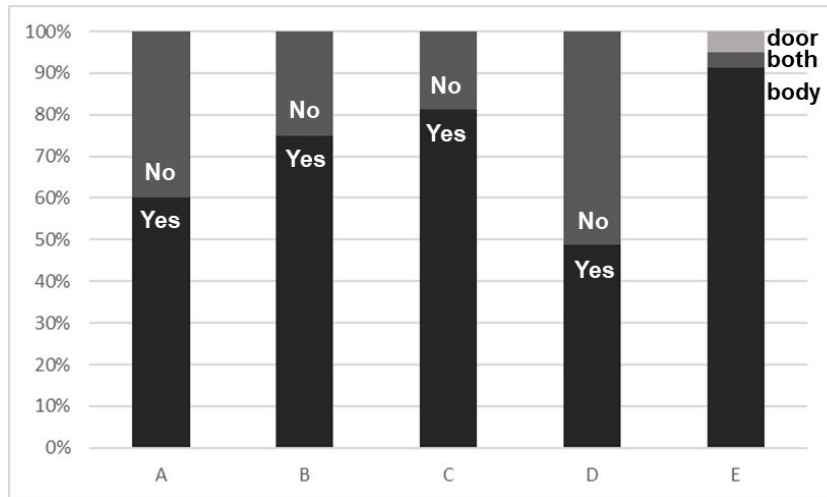


Figure S2 - Questionnaire applied in the establishments at the time of purchase of the vaccines. A- Do national vaccines have the same effectiveness? B- Does the establishment have a responsible veterinarian? C- Is there a temperature control in the refrigerator? D- Are there instructions for clients to apply the vaccine? E- Where is the vaccine stored in the refrigerator?

Table S1 – Metadata of VP2 gene sequences of this study

Access number	Species/Organism	Country	Year of collection	Subtype	Clade
EF011664	Canis familiaris	China	2004	2a	I
EU310373	Canis familiaris	China	2007	2a	I
FJ005252	Canis familiaris	Italy	2002	2a	I
FJ005253	Canis familiaris	Italy	2005	2a	I
FJ005256	Canis familiaris	Italy	2008	2a	I
FJ432717	Canis familiaris	China	2008	2a	I
GQ169540	Canis familiaris	China	2007	2a	I
GQ379048	Canis familiaris	Thailand	2009	2a	I
GQ379049	Canis familiaris	Thailand	2008	2a	I
JQ268283	Canis familiaris	China	2011	2a	I
JQ268284	Canis familiaris	China	2011	2b	I
JX660690	Canis familiaris	China	2011	2a	I
KF638400	Canis familiaris	China	2010	2a	I
KM457102	Canis familiaris	Uruguay	2010	2a	I
KM457132	Canis familiaris	Uruguay	2010	2a	I
KM457133	Canis familiaris	Uruguay	2010	2a	I
KM457134	Canis familiaris	Uruguay	2010	2a	I
KM457135	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KM457136	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KM457137	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KM457138	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KM457140	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KM457141	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KM457143	Canis familiaris	Uruguay	2011	2a	I
KR002792	Canis familiaris	China	2013	2a	I
KR002793	Canis familiaris	China	2013	2b	I
KR002794	Canis familiaris	China	2013	2a	I
KR002795	Canis familiaris	China	2013	2a	I
KR002796	Canis familiaris	China	2013	2b	I
KR002797	Canis familiaris	China	2013	2a	I
KR002798	Canis familiaris	China	2013	2a	I
KR002799	Canis familiaris	China	2013	2b	I
KR002801	Canis familiaris	China	2014	2a	I
KR002802	Canis familiaris	China	2014	2a	I
KR002803	Canis familiaris	China	2014	2a	I
KR002804	Canis familiaris	China	2014	2a	I
KR002805	Canis familiaris	China	2014	2a	I
KY403998	Canis familiaris	China	2008	2a	I
MF069442	Procyon Lotor	Canada	2010	2a	I
MF069443	Procyon Lotor	Canada	2016	2a	I
MF069444	Procyon Lotor	Canada	2016	2a	I

MF423125	Canis Latrans	Canada	2014	2a	
MF805790	Canis familiaris	China	2016	2a	
MF805791	Canis familiaris	China	2016	2a	
MF805793	Canis familiaris	China	2016	2a	
MF805794	Canis familiaris	China	2016	2a	
MF805798	Canis familiaris	China	2016	2a	
MG583676	Yak	China	2015	2a	
MG763189	Canis familiaris	China	2014	2a	
MH106698	Canis familiaris	China	2015	2a	
MH106699	Canis familiaris	China	2015	2b	
MH106700	Canis familiaris	China	2016	2c	
MH476580	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH476582	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH476586	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH476588	Canis familiaris	China	2017	2b	
MH476589	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH476590	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH476591	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH476593	Canis familiaris	China	2017	2a	
MH545963	Canis familiaris	India	2018	2a	
MK344435	Canis familiaris	Brazil	2016	2a	
MK344437	Canis familiaris	Brazil	2018	2a	
MK344442	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	
MK344443	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	
MK344444	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	
MK344445	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	
MK344447	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	
MK344449	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	
MK344451	Canis familiaris	Brazil	2016	2a	
MK344468	Canis familiaris	Brazil	2015	2a	
MK895483	Canis familiaris	Nigeria	2018	2a	
MK895484	Canis familiaris	Nigeria	2018	2a	
MK895485	Canis familiaris	Nigeria	2018	2a	
MN451673	Canis familiaris	USA	1993	2a	
MN451674	Canis familiaris	USA	1996	2a	
MN451689	Canis familiaris	Nigeria	2018	2a	
MN451691	Canis familiaris	USA	2009	2a	
MN661243	Canis familiaris	India	2016	2a	
MN862741	Neovison vison	Canada	2019	2a	
MN862742	Lontra Canadensis	Canada	2019	2a	
MW648348	Canis familiaris	Brazil	2019	2a	
MW648349	Canis familiaris	Brazil	2019	2a	
MW648350	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648351	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648352	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648353	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	

MW648354	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648355	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648356	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648357	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648358	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648359	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648361	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648362	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648363	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648364	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648367	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648368	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
MW648369	Canis familiaris	Brazil	2020	2a	
DQ340430	Canis familiaris	Brazil	1995	2a	
FJ005196	Canis familiaris	Germany	1997	2c	
FJ005203	Canis familiaris	Germany	1998	2c	
FJ005204	Canis familiaris	Germany	1999	2c	
FJ005210	Canis familiaris	Italy	2004	2c	
FJ005213	Canis familiaris	Italy	2005	2c	
FJ005214	Canis familiaris	Spain	2006	2c	
FJ005215	Canis familiaris	Italy	2006	2c	
FJ005233	Canis familiaris	Italy	2007	2c	
FJ005235	Canis familiaris	USA	2007	2c	
FJ005236	Canis familiaris	USA	2007	2c	
FJ005245	Canis familiaris	Italy	2008	2c	
FJ005246	Canis familiaris	Spain	2008	2c	
FJ005247	Canis familiaris	Belgium	2008	2c	
FJ005260	Canis familiaris	Germany	1997	2b	
FJ005262	Canis familiaris	Italy	2004	2b	
FJ005263	Canis familiaris	Italy	2005	2b	
GQ865518	Canis familiaris	Greece	2008	2c	
GQ865519	Canis familiaris	Greece	2009	2c	
GU380305	Canis familiaris	China	2008	2c	
GU569944	Canis familiaris	China	2002	2b	
GU569946	Canis familiaris	China	2001	2a	
JF346754	Canis familiaris	Argentina	2003	2a	
JF414817	Canis familiaris	Argentina	2003	2b	
JF414818	Canis familiaris	Argentina	2008	2c	
JF414819	Canis familiaris	Argentina	2008	2c	
JF414820	Canis familiaris	Argentina	2009	2c	
JF414821	Canis familiaris	Argentina	2009	2c	
JF414822	Canis familiaris	Argentina	2010	2c	
JF414823	Canis familiaris	Argentina	2009	2c	
JF414824	Canis familiaris	Argentina	2010	2c	
JF414825	Canis familiaris	Argentina	2010	2c	
JF414826	Canis familiaris	Argentina	2010	2c	

JN033694	Canis familiaris	Russia	1993	2b	
KM457103	Canis familiaris	Uruguay	2006	2c	
KM457104	Canis familiaris	Uruguay	2006	2c	
KM457105	Canis familiaris	Uruguay	2006	2c	
KM457106	Canis familiaris	Uruguay	2006	2c	
KM457107	Canis familiaris	Uruguay	2007	2c	
KM457108	Canis familiaris	Uruguay	2007	2c	
KM457109	Canis familiaris	Uruguay	2007	2c	
KM457110	Canis familiaris	Uruguay	2007	2c	
KM457111	Canis familiaris	Uruguay	2008	2c	
KM457112	Canis familiaris	Uruguay	2008	2c	
KM457113	Canis familiaris	Uruguay	2008	2c	
KM457114	Canis familiaris	Uruguay	2008	2c	
KM457115	Canis familiaris	Uruguay	2009	2c	
KM457116	Canis familiaris	Uruguay	2009	2c	
KM457117	Canis familiaris	Uruguay	2009	2c	
KM457118	Canis familiaris	Uruguay	2009	2c	
KM457119	Canis familiaris	Uruguay	2010	2c	
KM457120	Canis familiaris	Uruguay	2010	2c	
KM457121	Canis familiaris	Uruguay	2010	2c	
KM457122	Canis familiaris	Uruguay	2010	2c	
KM457123	Canis familiaris	Uruguay	2010	2c	
KM457124	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457125	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457126	Canis familiaris	Uruguay	2010	2c	
KM457127	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457128	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457129	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457130	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457131	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KM457142	Canis familiaris	Uruguay	2011	2c	
KY073269	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	
MF177250	Canis familiaris	Brazil	2010	2c	
MF177252	Canis familiaris	Brazil	2010	2c	
MF177253	Canis familiaris	Brazil	2010	2c	
MF177254	Canis familiaris	Brazil	2010	2c	
MF177255	Canis familiaris	Brazil	2014	2c	
MF177256	Canis familiaris	Brazil	2013	2b	
MF177257	Canis familiaris	Brazil	2014	2c	
MF177258	Canis familiaris	Brazil	2013	2b	
MF177260	Canis familiaris	Brazil	2012	2c	
MF177261	Canis familiaris	Brazil	2013	2c	
MF423123	Canis Latrans	Canada	2014	2b	
MF423124	Canis Latrans	Canada	2014	2b	
MF457594	Canis familiaris	USA	2015	2c	
MF805789	Canis familiaris	China	2016	2c	

MF805792	Canis familiaris	China	2016	2c	I
MF805795	Canis familiaris	China	2016	2c	I
MF805796	Canis familiaris	China	2016	2c	I
MF805797	Canis familiaris	China	2016	2c	I
MG013488	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MG264075	Canis familiaris	Ecuador	2017	2a	I
MG264076	Canis familiaris	Ecuador	2017	2a	I
MG264077	Canis familiaris	Ecuador	2017	2c	I
MG264078	Canis familiaris	Ecuador	2017	2b	I
MH476581	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MH476583	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MH476584	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MH476585	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MH476587	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MH476592	Canis familiaris	China	2017	2c	I
MH660909	Canis familiaris	Mongolia	2017	2c	I
MH711894	Canis familiaris	Thailand	2016	2c	I
MH711902	Felix Catus	China	2016	2c	I
MK344433	Canis familiaris	Brazil	2017	2a	I
MK344434	Canis familiaris	Brazil	2016	2c	I
MK344436	Canis familiaris	Brazil	2016	2c	I
MK344438	Canis familiaris	Brazil	2016	2c	I
MK344439	Canis familiaris	Brazil	2016	2b	I
MK344440	Canis familiaris	Brazil	2016	2b	I
MK344441	Canis familiaris	Brazil	2016	2b	I
MK344446	Canis familiaris	Brazil	2017	2c	I
MK344448	Canis familiaris	Brazil	2017	2c	I
MK344450	Canis familiaris	Brazil	2017	2b	I
MK344452	Canis familiaris	Brazil	2016	2c	I
MK344453	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344454	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344455	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344456	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344457	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344458	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344459	Canis familiaris	Brazil	2017	2c	I
MK344460	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344461	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344462	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344463	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344464	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344465	Canis familiaris	Brazil	2015	2b	I
MK344466	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344467	Canis familiaris	Brazil	2015	2c	I
MK344470	Canis familiaris	Brazil	2015	2b	I
MK388674	Canis familiaris	China	2017	2c	I

MK895486	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MK895487	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MK895488	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MK895489	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MK895490	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MN451672	Canis familiaris	USA	1993	2b	
MN451675	Canis familiaris	USA	2016	2c	
MN451676	Canis familiaris	USA	2017	2c	
MN451677	Canis familiaris	USA	2007	2b	
MN451678	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MN451679	Canis familiaris	USA	2014	2c	
MN451680	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MN451681	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MN451682	Canis familiaris	Nigeria	2018	2c	
MN451684	Canis familiaris	USA	2019	2c	
MN451685	Canis familiaris	USA	2019	2c	
MN451686	Canis familiaris	USA	2019	2c	
MN451690	Canis familiaris	USA	2011	2c	
MN832850	Pangolin	Taiwan	2018	2c	
MT010564	Canis familiaris	China	2018	2c	
MW648365	Canis familiaris	Brazil	2020	2c	
MW648366	Canis familiaris	Brazil	2020	2c	
DQ340422	Canis familiaris	Brazil	1993	2a	
DQ340423	Canis familiaris	Brazil	1993	2a	
DQ340424	Canis familiaris	Brazil	1993	2a	
DQ340425	Canis familiaris	Brazil	1993	2a	
DQ340426	Canis familiaris	Brazil	1994	2a	
DQ340427	Canis familiaris	Brazil	1994	2a	
DQ340428	Canis familiaris	Brazil	1994	2a	
DQ340429	Canis familiaris	Brazil	1994	2a	
DQ340431	Canis familiaris	Brazil	1995	2a	
DQ340432	Canis familiaris	Brazil	1995	2a	
DQ340433	Canis familiaris	Brazil	2000	2a	
DQ340434	Canis familiaris	Brazil	2000	2a	
KX774249	Canis familiaris	Brazil	2014	2b	
KX774250	Canis familiaris	Brazil	2016	2b	
KX774251	Canis familiaris	Brazil	2015	2b	
MF177251	Canis familiaris	Brazil	2013	2b	
MF177259	Canis familiaris	Brazil	2013	2b	
FJ222821	Canis familiaris	Italy	2000	2c	
DQ340411	Canis familiaris	Brazil	1990	2a	
DQ340412	Canis familiaris	Brazil	1990	2a	
DQ340413	Canis familiaris	Brazil	1990	2a	
DQ340414	Canis familiaris	Brazil	1990	2a	
DQ340415	Canis familiaris	Brazil	1991	2a	
DQ340416	Canis familiaris	Brazil	1991	2a	

DQ340417	Canis familiaris	Brazil	1991	2a	I
DQ340418	Canis familiaris	Brazil	1992	2a	I
DQ340419	Canis familiaris	Brazil	1992	2a	I
DQ340420	Canis familiaris	Brazil	1992	2a	I
DQ340421	Canis familiaris	Brazil	1992	2a	I
DQ340404	Canis familiaris	Brazil	1980	2a	O
DQ340405	Canis familiaris	Brazil	1980	2a	O
DQ340406	Canis familiaris	Brazil	1980	2a	O
DQ340407	Canis familiaris	Brazil	1980	2a	O
DQ340408	Canis familiaris	Brazil	1980	2a	O
DQ340409	Canis familiaris	Brazil	1985	2b	O
DQ340410	Canis familiaris	Brazil	1986	2a	O
MG264079	Canis familiaris	Ecuador	2017	2	O
MN451653	Canis familiaris	USA	1979	2	O
MN451654	Canis familiaris	USA	1979	2	O
MN451655	Canis familiaris	USA	1978	2	O
MN451656	Canis familiaris	USA	1983	2a	O
MN451657	Canis familiaris	USA	1983	2a	O
MN451658	Canis familiaris	USA	1983	2a	O
MN451659	Canis familiaris	USA	1983	2a	O
MN451660	Canis familiaris	USA	1983	2a	O
MN451661	Canis familiaris	USA	1984	2a	O
MN451662	Canis familiaris	USA	1984	2b	O
MN451663	Canis familiaris	USA	1984	2b	O
MN451664	Canis familiaris	USA	1985	2	O
MN451665	Canis familiaris	USA	1986	2	O
MN451666	Canis familiaris	France	1984	2b	O
MN451667	Canis familiaris	France	1983	2a	O
MN451668	Canis familiaris	USA	1980	2	O
MN451669	Canis familiaris	Australia	1982	2a	O
MN451670	Canis familiaris	Australia	1985	2a	O
MN451671	Canis familiaris	USA	1993	2	O
MN451693	Nyctereutes procyonoides	Finland	1980	2	O
MN451694	Nyctereutes procyonoides	Finland	1980	2	O
MN451695	Nyctereutes procyonoides	Finland	1986	2	O
M19296	Canis familiaris	USA	1978	2	O
EU914139	Canine parvovirus/vaccine	USA	NI	2	O
FJ011097	Canine parvovirus/vaccine	NI	NI	2	O
KP406926	Canine parvovirus/vaccine	India	2013	2	O
FJ011098	Canine parvovirus/vaccine	NI	NI	2	O
MW679576	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O
MW679575	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O
MW679570	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O
MW679574	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O
MW679572	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O
MW679569	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O

MW679573	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O
M74849	Canis familiaris	NI	NI	2b	O
M38245	Canis familiaris	NI	NI	2	O
MW934264	Canis familiaris	Brazil	2020	2b	O
M24000	Canis familiaris	NI	NI	2a	O
MW679571	Canine parvovirus/vaccine	Brazil	2020	2	O

NI - Not informed

MW679576 – Vac-1

MW679575 – Vac-2

MW679570 – Vac-3

MW679574 – Vac-4

MW679572 – Vac-5

MW679569 – Vac-6

MW679573 – Vac-7

MW679571 – Vac-8

Table S2 - Amino acid residues substitutions and their respective positions in the VP2 gene from vaccines and in reference samples.

Sequence identification	CPV-2 (subtype)	Amino acid residue																						
		4	8	8	10	21	23	27	27	29	29	30	30	30	31	36	37	37	38	42	46	55	57	57
		4	7	9	1	9	7	0	1	6	7	0	1	5	6	7	5	7	6	6	6	5	0	3
M19296	2	T	M	K	I	I	D	C	K	Q	S	A	T	D	V	Y	D	R	Q	N	N	V	K	Y
M38245_2	2	D	N	
M74849_2b	2b	.	L	.	T	G	.	Y	.	D	.	.	.	D	.	.	.	
M24000_2a	2a	.	L	.	T	G	.	Y	.	D	I	.	
FJ222821_2c	2c	.	L	.	T	A	G	.	Y	.	D	.	.	.	E	.	.	
Vac-1	2	V	D	N	.	K	
Vac-2	2	A	R	I	D	N	
Vac-3	2	A	D	F	
Vac-4	2	A	R	I	D	N	
Vac-5	2	A	R	.	.	D	I	.	L	D	N	
Vac-6	2	A	V/I	D	N	
Vac-7	2	A	R	I	D	N	
Vac-8	2	A	R	.	.	D	I	.	I	D	N	
FJ011098_Intervet	2	V	I	D	N	T	
FJ011097_Merial	2	A	R	I	D	N	T	
EU914139_Pfizer	2	A	.	.	.	K	.	V	D	.	.	R	.	.	.	F	
KP406926_Megavac	2	A	.	R	.	.	G	.	.	P	N	G	.	Y	.	D	N	G	K	.	D	.	.	

Table S3 – Detection and Viral load in all vaccine vials.

Trademark	Vaccine batch	Ct* (1 copy)	Ct* (2 copy)	Number of copies (mean)
Vac-1	064/19	16,13	16,21	3,10E+09
Vac-1	065/19	16,31	15,86	3,34E+09
Vac-1	066/19	17,18	16,9	1,83E+09
Vac-1	067/19	17,46	22,74	3,97E+07
Vac-1	068/19	16,35	16,89	2,45E+09
Vac-1	069/19	15,57	15,7	1,91E+09
Vac-1	001/19	0	0	0,00E+00
Vac-1	003/19	17,43	15,38	2,68E+10
Vac-1	012/19	16,34	15,95	2,92E+09
Vac-1	042/19	16,72	18,07	1,58E+09
Vac-2	076/19	15,47	15,53	2,18E+09
Vac-2	077/19	15,24	14,92	2,91E+09
Vac-2	078/19	15,67	15,39	2,15E+09
Vac-2	079/19	15,89	15,94	1,64E+09
Vac-2	080/19	0	0	0
Vac-2	081/19	15,78	15,71	1,84E+09
Vac-2	082/19	15,33	15,75	2,14E+09
Vac-2	083/19	15,67	16,02	1,73E+09
Vac-2	007/19	15,33	14,66	7,33E+09
Vac-2	063/19	16,63	15,65	3,36E+09
Vac-3	070/19	32,69	36,83	6,35E+03
Vac-3	071/19	0	0	0
Vac-3	072/19	37,24	0	8,21E+02
Vac-3	073/19	0	0	0
Vac-3	074/19	0	0	0
Vac-3	075/19	0	0	0
Vac-3	011/19	0	0	0
Vac-3	023/19	32,54	32,64	5,32E+04
Vac-3	041/19	35,32	35,99	7,42E+03
Vac-3	043/19	33,6	33,04	4,15E+04
Vac-4	051/19	18,98	18,84	1,65E+09
Vac-4	050/19	18,29	18,61	2,30E+09
Vac-4	046/19	20,71	20,14	6,52E+08
Vac-4	045/19	17,29	17,12	5,12E+09
Vac-4	040/19	18,12	18,05	2,90E+09
Vac-4	039/19	17,83	17,27	4,16E+09
Vac-4	037/19	17,62	17,71	3,91E+09
Vac-4	024/19	18,37	18,08	2,66E+09

Vac-4	020/19	19,09	19,22	1,51E+09
Vac-4	009/19	18,25	18,41	2,48E+09
Vac-5	005/19	19,19	19,81	1,36E+09
Vac-5	014/19	17,12	17,09	1,78E+09
Vac-5	026/19	16,16	16,15	1,87E+10
Vac-5	030/19	14,79	15,11	4,89E+10
Vac-5	032/19	17,37	17,32	7,29E+09
Vac-5	055/19	21,99	22	3,34E+07
Vac-5	057/19	0	0	0
Vac-5	060/19	20,47	20,37	6,35E+08
Vac-5	061/19	20,51	19,78	8,19E+08
Vac-5	062/19	18,64	18,82	5,71E+08
Vac-6	006/19	17,16	17,25	2,46E+10
Vac-6	016/19	20,76	20,51	1,39E+09
Vac-6	034/19	18,28	19,54	6,69E+09
Vac-6	044/19	19,1	19,82	3,87E+09
Vac-6	053/19	22,12	21,49	5,34E+08
Vac-6	054/19	20,91	20,77	1,21E+09
Vac-6	056/19	19,1	19,82	3,87E+09
Vac-6	058/19	20,42	20,12	1,90E+09
Vac-6	059/19	18,73	20,01	4,38E+09
Vac-6	022/19	19,62	20,36	2,48E+09
Vac-7	002/19	20,58	19,94	6,67E+08
Vac-7	008/19	21,98	22,26	2,33E+08
Vac-7	013/19	24,46	24,67	5,94E+07
Vac-7	015/19	20,19	20,91	5,70E+08
Vac-7	027/19	21,32	21,49	3,03E+08
Vac-7	028/19	16,87	17,17	4,03E+09

Vac-7	029/19	23,46	23,48	1,09E+08
Vac-7	035/19	19,06	18,18	1,69E+09
Vac-7	036/19	22,05	22,16	2,34E+08
Vac-7	048/19	23,49	23,41	1,10E+08
Vac-8	018/19	18	16,31	1,02E+10
Vac-8	019/19	17,51	18,81	4,33E+09
Vac-8	021/19	17,13	17,71	7,05E+09
Vac-8	025/19	16,33	19,01	8,87E+09
Vac-8	031/19	18,46	17,01	6,24E+09
Vac-8	033/19	18,92	18,76	2,22E+09
Vac-8	038/19	18,2	18,58	3,22E+09
Vac-8	047/19	17,82	18,42	4,04E+09
Vac-8	049/19	21,74	21,68	4,53E+07
Vac-8	052/19	18,51	17,8	3,98E+09

*Cycle Threshold

4 DISCUSSÃO GERAL

No Brasil, a densidade populacional canina sofre variações de acordo com a cidade, região e bairro. Estes estão relacionados aos aspectos socioeconômicos de cada grupo populacional de uma mesma localidade (REICHMANN et al., 2000). No ano de 2015, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) informou os dados de sua última pesquisa, realizada em 2013. O questionário de saúde continha questões sobre animais de companhia, fato inédito no país. A pesquisa foi realizada de forma amostral por setores censitários e domicílios escolhidos aleatoriamente e apontou um número de 54,2 milhões de cães domiciliados. Atualmente, não há um estudo específico do perfil da população animal brasileira, do número *per capita* de cães e gatos e sua correlação com outros dados. Desta maneira, é perceptível a dificuldade de conhecer o número de animais vacinados e/ou não vacinados, uma vez que a população de cães não domiciliados é evidentemente maior do que os domiciliados e não há medidas públicas para vacinação em animais de rua.

Apesar dos esforços médicos veterinários para a vacinação, o parvovírus canino continua sendo a principal infecção responsável pela mortalidade canina, substancialmente em filhotes, no Brasil. Atualmente, as falhas vacinais são um ponto de interesse no que diz respeito à imunização contra a parvovirose, uma vez que cães devidamente vacinados podem desenvolver a doença (DECARO et al., 2020).

No Brasil, existem muitos laboratórios fabricantes de vacinas e também um número significativo de vacinas de marcas multinacionais, fato que gera dúvidas no momento da escolha do produto. No país, as vacinas multinacionais tem sua venda restrita para clínicas e hospitais veterinários. Assim são aplicadas exclusivamente por médico veterinário mediante exame clínico. As vacinas nacionais não utilizam esta estratégia de venda, e são comercializadas por variados estabelecimentos veterinários. Além disto, apesar da recomendação dos fabricantes e da Wsava (DAY et al., 2016; DAY; SCHULTZ, 2014) de manter a temperatura ideal para as vacinas, sofrem transporte sem monitoramento do local de venda até a residência, para posterior aplicação no animal, cuja sanidade não é conhecida. Dessa forma, o produto é passível de alterações térmicas que podem prejudicar sua qualidade e gerar incredulidade com relação ao seu potencial profilático.

O presente estudo revelou que também muitos comerciantes de lojas agropecuárias, *pet shops* e outros estabelecimentos veterinários consideram a vacina nacional com capacidade imunizante inferior a multinacional. Adicionado a isso, há o fato de que nem todo estabelecimento veterinário possui médico veterinário. Neste trabalho é possível observar que 15% dos locais que comercializam vacinas polivalentes caninas nacionais não possuem responsável técnico, fato que pode dificultar a transmissão de informações corretas com relação à aplicação da vacina. Isto ficou evidente no questionário, onde 53,25% dos entrevistados informaram que não repassam instruções de aplicação aos clientes.

O local para armazenamento das vacinas é fundamental para a eficiência das vacinas. Estas devem ser armazenadas no corpo da geladeira, visto que não podem ser congeladas ou posicionadas próximo ao congelador (DAY; SCHULTZ, 2014). A abertura do refrigerador também leva à oscilação térmica, fato que torna a porta do equipamento um local inadequado para a conservação do produto. No estudo, uma parcela de 8,75% dos comerciantes não mantém armazenamento exclusivo neste local e 18,75% sequer têm controle de temperatura através de termômetro.

A avaliação quantitativa do número de cópias de DNA viral presente em vacinas foi utilizada como um indicador de qualidade de uma determinada amostra vacinal. Neste estudo, observamos a presença de quantidades variáveis de DNA em uma mesma marca oriundas de estabelecimentos distintos, mostrado pelos valores do desvio padrão destas amostras. Complementar a esse desvio, foi possível observar que algumas amostras foram negativas quanto à presença de DNA, o que pode significar uma drástica redução em sua eficácia vacinal e justificar parcela das falhas vacinais *in-vivo*. Da mesma forma, observou-se neste estudo que as vacinas de laboratórios nacionais e multinacionais, não apresentaram números tão distintos quando avaliadas no que se refere ao número de cópias de cada amostra, porém a grande variância observada em cada marca demonstra que a quantidade de cópias de DNA chega ao consumidor com grande variação de conservação, e consequentemente pode afetar sua resposta vacinal.

Por sua vez, a análise de aminoácidos destas vacinas demonstrou que estes possuem origem antiga, possivelmente das amostras CPV-2 originais. Mesmo assim, algumas amostras vacinas apresentam substituições importantes em aminoácidos localizados no terceiro *loop* da proteína VP2. Embora estas regiões

estejam na superfície da proteína, não estão próximas à região *3-fold*, responsável por distinção antigênica. As amostras vacinais apresentaram pouca variação entre elas. Entretanto a sua análise filogenética indicou uma clusterização distintas das amostras de campo brasileiras. A análise estrutural realizada com *software* de predição de epítomos revelou que a maioria destas substituições está em regiões antigenicamente importantes. Isto suscita a possibilidade de que mutantes de escape vacinal podem estar em circulação.

Destaca-se que, no presente estudo, não visamos avaliar a eficiência vacinal que cada marca, distintamente nacional ou multinacional, produz no indivíduo desafiado. No entanto, utilizamos indicadores para avaliar a sua eficácia e eficiência da cadeia de distribuição. Com os resultados obtidos neste trabalho, verificamos que uma grande variação de DNA viral nas vacinas disponíveis para veterinários, além de uma disparidade de protocolos de aplicação, conservação e armazenamento.

Importantemente, o público consumidor de vacinas nacionais é representado por tutores de classe média baixa, que normalmente possuem cães que não têm uma rotina de acompanhamento veterinário e apresentam maior contato com outros cães. Esses fatores tornam o animal mais suscetível a doenças, uma vez que aumentam a exposição e transmissão de patógenos. Já os cães que são imunizados com vacinas importadas, em sua maioria são animais com menor exposição a agentes patogênicos, visto que o contato com outros cães é reduzido ou inexistente. Assim, a disparidade no desafio oferecido aos cães vacinados também deve ser considerada ao analisar um programa eficaz de vacinação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo foi motivado pela existência de dúvidas com relação à eficácia de vacinas caninas utilizadas contra o CPV-2. A análise dos resultados obtidos nesse trabalho demonstra que há uma grande variação na quantidade de DNA viral nas unidades de vacinas comercializadas no sul do Brasil, inclusive com ausência de DNA viral detectável em algumas unidades vacinais. A análise filogenética indicou que as vacinas representam um clado distinto dos vírus circulantes no Brasil. Estes vírus ainda possuem um perfil de capsídeo distinto das cepas vacinais, o que pode levar a redução na eficácia vacinal. Foi possível observar, ainda, falhas técnicas em alguns dos estabelecimentos de vendas de vacinas.

Ainda há poucos trabalhos que realizam a análise de qualidade vacinal do CPV-2 em vacinas comerciais. Outras análises poderão complementar este trabalho, a fim de se obter um melhor entendimento a respeito dos fatores que influenciam nas falhas vacinais. A inclusão de novas variantes nas formulações vacinais, a descrição da cepa viral utilizada em bula e melhoria nas condições de armazenamento do produto até chegar ao consumidor estão entre as medidas a serem recomendadas a partir dos resultados desses estudos.

REFERÊNCIAS

- APPEL, M. J.; COOPER, B. J.; GREISEN, H.; SCOTT, F. W.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. I. Status report on corona and parvo-like viral enteritides. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, NY, v. 69, n. 3, p. 123-133, Apr. 1979. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/223812/>. Acesso em: 10 out. 2020.
- APPEL, M. J.; PARRISH, C. R. Canine parvovirus type 2. *In*: APPEL, M. J. (ed.). **Virus infections of carnivores**. New York: Elsevier, 1987. v. 1, p. 69-92.
- BARKER, I. K.; DRUEMEL, A. A. V.; PALMER, N. The alimentary system. *In*: JUBB, K. V. F. (ed.). **Pathology of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 1, p. 198-199.
- BATTERSBY, I.; HARVEY, A. Differential diagnosis and treatment of acute diarrhoea in the dog and cat. **In Practice**, London, v. 28, n. 8, p. 480-488, Sep. 2006.
- BATTILANI, M.; SCAGLIARINI, A.; CIULLI, S.; MORGANTI, L.; PROSPERI, S. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. **Virology**, New York, v. 352, n. 1, p. 22-26, Aug. 2006.
- BERGMANN, M.; HOLZHEU, M.; ZABLOTSKI, Y.; SPECK, S.; TRUYEN, U.; STRAUBINGER, R. K.; HARTMANN, K. Comparison of four commercially available point-of-care tests to detect antibodies against canine parvovirus in dogs. **Viruses**, Basel, Switzerland, v. 13, n. 1, p. 18, 2021.
- BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders**: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1998.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 12, p. 3021-3025, Dec. 2001.
- BUONAVOGLIA, C.; TOLLIS, M.; BUONAVOGLIA, D.; PUCCINI, A. Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 281-283, Oct. 1992.
- CAMARGO, P. L. de; ORTOLANI, M. B. T.; UENAKA, S. A.; MOTTA, M. B.; BRAGA, C. dos R.; SANTOS, P. C. dos; SILVA JÚNIOR, J. C. da; VIEIRA, V. G.; ALFIERI, A. F. Avaliação do efeito da suplementação terapêutica com probiótico em cães filhotes com gastroenterite hemorrágica. **Semina**: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, n. 3, p. 453-462, jul./set. 2006. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744081014>. Acesso em: 25 maio 2021.
- CAMPBELL, A. Gastrointestinal emergencies. *In*: NORKUS, C. L. (ed.). **Veterinary Technician's Manual for Small Animal Emergency and Critical Care**. Hoboken, NJ: Wiley, 2013. p. 151-176.

CARMICHAEL, L. An annotated historical account of canine parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine. Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Berlin, v. 52, n. 7-8, p. 303-311, Sep./Oct. 2005.

CARPENTER, J. L.; ROBERTS, R. M.; HARPSTER, N. K.; [KING JR.](#), N. W. Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a litter of pups. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, IL, v. 176, n. 11, p. 1269-1273, June 1980.

COTMORE, S. F.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; CHIORINI, J. A.; MUKHA, D. V.; PINTEL, D. J.; QIU, J.; SODERLUND-VENERMO, M.; TATTERSALL, P.; TIJSSEN, P.; GATHERER, D.; DAVISON, A. J. The family Parvoviridae. **Archives of Virology**, Wien, v. 159, n. 5, p. 1239-1247, May 2014.

DAY, M. J.; HORZINEK, M. C.; SCHULTZ, R. D.; SQUIRES, R. A. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, UK, v. 57, n. 1, p. E1-E45, Jan. 2016.

DAY, M. J.; SCHULTZ, R. D. Vaccination. *In*: DAY, M. J.; SCHULTZ, R. D. **Veterinary immunology: principles and practice**. Boca Raton: CRC Press; Taylor and Francis Group, 2014. p. 224.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus – A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 155, n. 1, p. 1-12, Feb. 2012.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; BARRS, V. R. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: are we far from disease eradication? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 247, p. 1-8, Aug. 2020.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D. D.; MARTELLA, V.; VIEIRA, M. J.; ELIA, G.; ZICOLA, A.; DAVIS, C.; THOMPSON, G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; BUONAVOGLIA, C. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, GA, v. 13, n. 8, 1222-1224, Aug. 2007.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; MARI, V.; LAVAZZ, A.; NARDI, M.; BUONAVOGLIA, C. Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **The New Microbiologica**, Pavia, Italy, v. 31, n. 1, p. 125-130, Jan. 2008.

DECARO, N.; DESARIO, C.; BILLI, M.; MARI, V.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. **The Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 2, p. 195-199, Feb. 2011.

DECARO, N.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, M. S.; BELLACICCO, A. L.; BUONAVOGLIA, C. New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. **Journal of Veterinary Medicine. Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Berlin, v. 52, n. 7-8, p. 316-319, Sep./Oct. 2005.

- DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: wich diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, NLD, v. 126, n. 1-2, p. 179-185, June 2005.
- DUIJVESTIJN, M.; MUGHINI-GRAS, L.; SCHUURMAN, N.; SHIJF, W.; WAGENAAR, J. A.; EGBERINK, H. Enteropathogen infections in canine puppies: co-occurrence, clinical relevance and risk factors. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 195, p. 115-122, Nov. 2016.
- DUQUE-GARCÍA, Y.; ECHEVERRI-ZULUAGA, M.; TREJOS-SUAREZ, J.; RUIZ-SAENZ, J. Prevalence and molecular epidemiology of canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: a possible new CPV-2a is emerging? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 201, p. 1-24, Mar. 2017.
- FLORES, E. F. (org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007.
- GODDARD, A.; LEISEWITZ, A. L. Canine parvovirus. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, PA, v. 40, n. 6, p. 1041-1053, Nov. 2010.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Alterações do equilíbrio ácido-básico e hidroeletrólítico. *In*: GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. cap. 2, p. 49-79.
- GORDON, J.; ANGRICK, E. Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 7, p. 1464-1467, July 1986.
- GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.
- GREENE, C. E.; DECARO, N. **Infectious diseases in dogs and cats**. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- GUILFORD, W. Gastrointestinal tract infections, parasites and toxicoses. *In*: GUILFORD, W.; STROMBECK, D.; WILLIAMS, D.; MEYER, D. (ed.). **Strombeck's small animal gastroenterology**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. cap. 21, p. 411-432.
- HESSE, R. A.; TRIBLE, B. R.; ROWLAND, R. R. Parvoviridae e circoviridae. *In*: MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 49, p. 360-369.
- HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P.; PARDO, M., SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C, SALIKI, J. Ocurrance of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, CA, v. 19, n. 5, p. 535-539, Sep. 2007.

HOSKINS, J. D. Canine viral enteritis. *In*: GREENE, C. E. (ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 40-45.

HOSKINS, J. D. Doenças virais caninas. *In*: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 1, p. 442-444.

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

HUEFFER, K.; PARRISH, C. R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, n. 4, p. 392-398, Aug. 2003.

JACOBS, R. M.; WEISER, M. G.; HALL, R. L.; KOWALSKI, J. J. Clinicopathologic features of canine parvoviral enteritis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, CO, v. 16, p. 809-814, 1980.

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

KENNEDY, M. A.; MELLON, V. S.; CALDWELL, G.; POTGIETER, L. N. D. Virucidal efficacy of the newer quaternary ammonium compounds. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, CO, v. 31, p. 254-258, 1995.

KUMAR, M.; NANDI, S. Development of a Sybergreen based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, NLD, v. 169, n. 1, p. 198-201, Oct. 2010.

MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; DECARO, N.; ELIA, G.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; BOZZO, G.; TARSITANO, E.; BUONAVOGLIA C. Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b in pups with maternally derived antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, DC, v. 12, n. 10, p. 1243-1245, Oct. 2005.

MCCANDLISH, I. A. P. Infecções específicas caninas. *In*: DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. p. 915-952.

MCCAWE, D.; HOSKINS, J. Canine viral enteritis. *In*: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2006. cap. 8, p. 63-71.

MEUNIER, P. C.; COOPER, B. J.; APPEL, M. J.; SLAUSON, D. O. Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, CA, v. 21, n. 5, p. 509-515, Sep. 1984.

- MEUNIER, P. C.; COOPER, B. J.; APPEL, M. J.; SLAUSON, D. O. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, CA, v. 22, n. 1, p. 60-71, Jan. 1985.
- MEUNIER, P. C.; GLICKMAN, L. T.; APPEL, M. J.; SHIN, S. J. Canine parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, NY, v. 71, n. 1, p. 96-110, Jan. 1981.
- MORAES, M. P.; COSTA, P. R. Parvoviridae. In: FLORES, E. F. (org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. cap. 14, p. 375-396.
- MULVEY, J. J.; BECH-NIELSEN, S.; HASKINS, M. E.; JEZYK, P. F.; TAYLOR, H. W.; EUGSTER, A. K. Myocarditis induced by parvoviral infection in weanling pups in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 177, n. 8, p. 695-698, Oct. 1980.
- MYLONAKIS, M. E.; KALLI, I.; RALLIS, T. S. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Medicine**, Auckland, NZ, v. 7, p. 91-100, July 2016.
- NAKAMURA, M.; TOHYA, Y.; MIYAZAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; PHUNG, H. T. T.; NGUYEN, N. H.; HUYNH, L. M. T.; NGUYEN, L. T.; NGUYEN, P. N.; NGUYEN, P. V.; NGUYEN, N. P. T.; AKASHI, H. A novel antigenic variant of *Canine parvovirus* from a Vietnamese dog. **Archives of Virology**, Wien, v. 149, n. 11, p. 2261-2269, Nov. 2004.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios do trato intestinal. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 439-484.
- O'FARRELL, B. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems. In: WONG, R.; TSE, H. (ed.). **Lateral flow immunoassay**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 1-33.
- OLIVEIRA, E. C.; PESCADO, C. A.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P.; SANTOS, A. S.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Immunohistochemical analysis of dogs naturally infected with canine parvovirus. **Brazilian Veterinary Research**, [Rio Grande do Sul], v. 2, n. 29, p. 131-136, Feb. 2009.
- PARRISH, C. R. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones, **Virology**, New York, v. 183, n. 1, p. 195-205, July 1991.
- PARRISH, C. R. Pathogenesis of the feline panleukopenia virus and canine parvovirus. **Baillière's Clinical Haematology**, London, v. 8, n. 1, p. 57-71, Mar. 1995.
- PEREIRA, C. A. D. Parvovirose canina. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2017. cap. 88, p. 844-887.

PEREIRA, C. A. D. Parvovirus. *In*: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Treatise on internal medicine for dogs and cats**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 788-794.

PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, M. First detection of canine parvovirus type C in South America. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 124, n. 1-2, p. 147-152, Sep. 2007.

POLLOCK, R. V. Experimental canine parvovirus infection in dogs. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, NY, v. 72, n. 2, p.103-119, Apr. 1982.

POLLOCK, R. V. The parvovirus. **Cães e Gatos**, [s. l.], v. 1, p. 34-41, 1985.

POLLOCK, R. V.; CARMICHAEL, L. Canine viral enteritis. *In*: GREENE, C. E. (ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. cap. 21, p. 268-279.

POLLOCK, R. V.; CARMICHAEL, L. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 180, n. 1, p. 37-42, Jan. 1982.

PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 167-176, 2004.

REED, A. P.; JONES, E. V.; MILLER, T. J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 62, n. 1, p. 266-276, Jan. 1988.

[REICHMANN, M. B.](#); [PINTO, H. F.](#); [ARANTES, M. B.](#); SANTOS, M. B.; [VIARO, O.](#); NUNES, V. P. **Educação e promoção da saúde no Programa de Controle da Raiva**. São Paulo (Estado): Instituto Pasteur; 2000. (Manuais, 5).

ROBINSON, W.; WILCOX, G.; FLOWER, R. Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, CA, v. 17, n. 5, p. 589-599, Sep. 1980.

SANTANA, W. O.; LENCINA, M. M.; BERTOLAZZI, S.; SILVEIRA, S.; STRECK, A. F. Parvovírus canino: uma abordagem evolutiva e clínica. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 13, n. 4, p. 526-533, out./dez. 2019.

STRECK, A. F.; GAVA, D.; RECH, H.; CANAL, C. W. Técnicas de diagnóstico imunológico em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35 (Supl.), p. S125-S130, 2007.

STRECK, A. F.; SOUZA, C. K.; GONÇALVES, K. R.; ZANG, L.; PINTO, L. D.; CANAL, C. W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 465-469, 2009.

STROMBECK, D. R.; GUILFORD, W. G. **Small animal gastroenterology**. 2nd ed. [USA]: Wolfe Publishing Limited, 1991. p. 327-330.

SWANGO, L. J. Moléstias virais caninas. *In*: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (ed.). **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 69, p. 573-588.

SYKES, J. E. Canine parvovirus infections and other viral enteritides. *In*: SYKES, J. E. **Canine and feline infectious diseases**. St. Louis, MO: Elsevier, 2013. p. 141-151.

TAMS, T. R. **Gastroenterologia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005.

TIJSSEN, P.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; ALMENDRAL, J. M.; BERGOIN, M.; FLEGEL, T. W.; HEDMAN, K.; KLEINSCHMIDT, J.; LI, Y.; PINTEL, D. J.; TATTERSALL, P. The family Parvoviridae. *In*: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (ed.). **Virus taxonomy**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier, 2011. p. 405-425.

TILLEY, L. P.; SMITH JR., F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos**: espécie canina e felina. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals**. 8th ed. Ithaca; London: Cornell University Press, 1988. p. 832-846.

TINKY, S. S.; AMBILY, R.; NAIR, S. R.; MINI, M. Utility of a rapid immunochromatographic strip test in detecting canine parvovirus infection compared with polymerase chain reaction. **Veterinary World**, Rajkot, India, v. 8, n. 4, p. 523-526, 2015.

TRUYEN, U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 69, n. 1-2, p. 47-50, Sep. 1999.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus: a need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, NLD, v. 117, n. 1, p. 9-13, Oct. 2006.

TRUYEN, U.; GRUENBERG, A.; CHANG, S.; OBERMAIER, B.; VEIJALAINEN, P.; PARRISH, C. R. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 69, n. 8, p. 4702-4710, Aug. 1995.

VIEIRA, M. J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A. L.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Parvovirose canina em Portugal. **Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 78, p. 55-62, 2011.

VIEIRA, M. J.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, A. L.; DECARO, N.; DESARIO, C.; MULLER, A.; CARVALHEIRA, J.; BUONAVOGLIA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 488-491, 2008.

WANER, T.; NAVEH, A.; WUDOVSKY, I.; CARMICHAEL, L. Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic based enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 427-432, 1996.

ZHOU, P.; ZENG, W.; ZHANG, X.; LI, S. The genetic evolution of canine parvovirus: a new perspective. **Public Library of Science One**, San Francisco, CA, v. 12, n. 3, p. 1-13, Mar. 2017.