

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**  
**ANIMAL**

**BRENDA PICOLI GHENO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE CEPAS DE CAMPO DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO  
2 E EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL DE ANTICORPOS GERADOS POR  
VACINAS COMERCIAIS E EXPERIMENTAIS**

**CAXIAS DO SUL**

**2023**

**BRENDA PICOLI GHENO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE CEPAS DE CAMPO DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO  
2 E EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL DE ANTICORPOS GERADOS POR  
VACINAS COMERCIAIS E EXPERIMENTAIS**

Projeto apresentado à Universidade de Caxias do Sul - 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**

**2023**

**BRENDA PICOLI GHENO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE CEPAS DE CAMPO DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO 2 E EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS E EXPERIMENTAIS**

Projeto apresentado à Universidade de Caxias do Sul - 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.

Área: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

Aprovado em:

**Banca Examinadora**

**Prof. Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

**Prof. Dra. Sandra Arenhart**

Universidade Federal de Santa Catarina

**Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge**

Universidade de Caxias do Sul

**CAXIAS DO SUL**

**2023**

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

G412a Gheno, Brenda Picoli

Análise molecular de cepas de campo de parvovírus canino tipo 2 e eficiência de neutralização viral de anticorpos gerados por vacinas comerciais e experimentais [recurso eletrônico] / Brenda Picoli Gheno. – 2023.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, 2023.

Orientação: André Felipe Streck.

Modo de acesso: World Wide Web

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

1. Parvovirus canino. 2. Vacinas. 3. Virologia veterinária. 4. Vacinação de animais. I. Streck, André Felipe, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 636.7:578.822

Catálogo na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

## **Dedicatória**

À minha base de incentivo, meus pais Salete Maria Picoli Gheno e Ivori Gheno e minha irmã Flávia Picoli Gheno, dedico este agradecimento em prol de todo apoio durante a minha pós-graduação e por todo esforço para manter a minha permanência, mesmo que longe da minha cidade natal. Dedico também a minha falecida avó Adelina Roncato Picoli a qual tanto me incentivou no início da minha graduação e ao meu avô, Setembrino Picoli. E, também, ao meu namorado e companheiro Gustavo Henrique Pretto que participou de toda a minha trajetória na pós-graduação e me deu imenso apoio emocional em todo meu caminho.

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos os meus professores que me receberam e me acolheram no retorno à Universidade de Caxias do Sul. Agradeço principalmente ao meu orientador André Felipe Streck, que me incentivou a ir à busca de meus objetivos e a concluir este trabalho com resultados satisfatórios atingindo as nossas expectativas. Assim como a professora Scheila de Avila e Silva, a qual sempre esteve presente me auxiliando e incentivando a seguir carreira acadêmica que, se tornou além de professora uma amiga para a vida. À toda equipe do Laboratório de Medicina Veterinária da Universidade de Caxias do Sul (LDMV/UCS), mas, principalmente, Tamiris Silva Lopes que além de acompanhar toda etapa de revisão bibliográfica e experimental de meu projeto sempre esteve presente na minha rotina auxiliando em meu aperfeiçoamento. Agradeço também a minha estagiária Joana Detofano e a minha colega Letícia Silva que sempre estiveram presentes colaborando e auxiliando em meu projeto sem medir esforços, assim como a Camila Cantele e a Caroline Nesello por todo amparo na parte experimental deste projeto. Agradeço imensamente a quem me auxiliou com materiais para a elaboração do meu Projeto de Mestrado e me incentivou a promover o melhor possível em meu trabalho: Sandra Arenhart, minha antiga professora da Universidade Federal de Santa Catarina, por quem sempre tive tanta admiração. Assim como as Clínicas Veterinárias parceiras que colaboraram com amostras para o meu projeto de pesquisa, principalmente ao meu amigo e colega Médico Veterinário Guilherme Ramos. Também ressalto a importância do apoio e auxílio desde quando iniciei a graduação na Universidade de Caxias do Sul à minha prima Vânia Elisabete Schneider por ter me incentivado a participar de projetos de iniciações científicas e ter me acolhido de braços abertos em seu núcleo de pesquisa do Instituto de Saneamento Ambiental da Universidade de Caxias do Sul (ISAM/UCS). E, por fim, agradeço imensamente a todo apoio da FAPERGS (Fundação de amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul) para concretização deste trabalho sob o código de financiamento número 42008018036P8.

*“Quando aceitamos nossos limites, conseguimos ir além deles”.*

**(Albert Einstein)**

## Resumo

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é um vírus que apresenta características evolutivas através dos resultados de substituições nucleotídicas que, por consequência acarreta na alterações de aminoácidos em seu genoma, principalmente na proteína VP2, gerando principalmente sinais clínicos gastroentéricos em cães jovens e não vacinados. Na imunização dos caninos contra o CPV-2 dita-se que a falha vacinal dos filhotes pode estar relacionada à supressão de resposta imune induzida por anticorpos maternos. Existem diferentes marcas de vacinas disponíveis no Brasil levantando-se o questionamento da eficácia das vacinas nacionais frente às importadas. Visto isso, a análise da qualidade das vacinas é de suma importância a fim de avaliar a sua eficácia. Este trabalho foi desenvolvido a fim de elucidar a partir de testes *in vivo* a capacidade de neutralização viral dos anticorpos gerados pelas vacinas comercializadas na região sul do Brasil, incluindo tanto marcas nacionais quanto importadas. Além disso, obtiveram-se cepas de campo em parceria com clínicas da Serra Gaúcha e região metropolitana de Porto Alegre para determinar as variantes predominantes e o status vacinal dos animais portadores da parvovirose canina. Ademais, também foram utilizadas ferramentas de bioinformática a fim de determinar as principais variantes circulantes no Brasil, nos últimos 10 anos, através do acesso à plataforma GenBank. Desta forma, foi realizado o alinhamento das sequências no programa MEGA11, realizou-se uma árvore filogenética no programa FigTree v1.4.4. e foram determinadas as regiões predominantes com substituições de aminoácidos presentes, tanto nas cepas circulantes quanto nas vacinas comerciais já sequenciadas em estudo anterior, finalizando com a avaliação da proteína estrutural VP2 no programa ChimeraX visualizando os pontos eletrostáticos e hidrofóbicos dos sítios apresentados. Em seguida caracterizou-se a predominância da circulação da variante CPV-2a, seguida de CPV-2c e CPV-2b, respectivamente, destacando alterações nos sítios 44, 101, 267, 297, 300, 305, 324, 375, 426 e 440, com alterações de carga e hidrofobicidade na proteína VP2. Na árvore filogenética realizada observaram-se as vacinas agrupadas no clado em conjunto à cepa ancestral, as variantes CPV-2b e CPV-2c, agrupadas em um mesmo clado, e a CPV-2a em um único clado. Por fim, levantou-se o questionamento da eficácia das vacinas comercializadas, disponíveis na região sul do Brasil, por serem observadas diferentes titulações de anticorpos neutralizantes nos resultados obtidos *in vivo*.

**Palavras-chave:** Parvovírus canino tipo 2, Vacinas, Variantes

## **Abstract**

Canine Parvovirus Type 2 (CPV-2) is a virus that undergoes evolutionary changes due to nucleotide substitutions, which consequently lead to amino acid alterations in its genome, primarily in the VP2 protein, resulting in gastroenteric clinical signs, mainly in young and unvaccinated dogs. Regarding the immunization of dogs against CPV-2, it is suggested that vaccine failure in puppies may be related to the suppression of the immune response induced by maternal antibodies. Different brands of vaccines are available in Brazil, raising questions about the efficacy of domestic vaccines compared to imported ones. Therefore, the analysis of vaccine quality is of utmost importance to assess their effectiveness. This study was conducted to elucidate, through *in vivo* tests, the ability of antibodies generated by vaccines marketed in the southern region of Brazil, including both domestic and imported brands, to neutralize the virus. Additionally, field strains were obtained in collaboration with clinics in the Serra Gaúcha and metropolitan region of Porto Alegre to determine the predominant variants and the vaccination status of dogs with canine parvovirus. Furthermore, bioinformatics tools were also used to determine the main circulating variants in Brazil over the past 10 years, accessed through the GenBank platform. Thus, sequence alignment was performed in the MEGA11 program, a phylogenetic tree was constructed in the FigTree v1.4.4 program, and the predominant regions with amino acid substitutions were determined, both in circulating strains and in commercially sequenced vaccines from a previous study. The analysis concluded with an evaluation of the structural protein VP2 in the ChimeraX program, visualizing the electrostatic and hydrophobic points of the presented sites. The study identified the predominance of the CPV-2a variant, followed by CPV-2c and CPV-2b, respectively, highlighting changes in sites 44, 101, 267, 297, 300, 305, 324, 375, 426, and 440, with alterations in charge and hydrophobicity in the VP2 protein. In the phylogenetic tree, the vaccines were observed to cluster in the clade together with the ancestral strain, CPV-2b and CPV-2c variants were grouped in the same clade, and CPV-2a in a separate clade. Finally, questions were raised about the efficacy of the vaccines available in the southern region of Brazil, as different titers of neutralizing antibodies were observed in the *in vivo* results.

**Keywords:** Canine parvovirus type 2, Vaccines, Variants



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>20</b>
3.1. ETIOLOGIA – Família Parvoviridae	20
3.2. EPIDEMIOLOGIA	21
3.3. PATOGENIA	23
3.4. SINAIS CLÍNICOS	25
3.5. DIAGNÓSTICO	26
3.5.1. Ensaio imunocromatográfico (EIE)	27
3.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	28
3.5.3. Técnica de hemaglutinação (HA)	28
3.5.4. Técnica de inibição da hemaglutinação (HI)	28
3.5.5. Isolamento viral em cultivo celular	29
3.6. TRATAMENTO	29
3.7. CONTROLE	30
3.8. PREVENÇÃO E VACINAÇÃO	31
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>33</b>
<b>4.1. COLETA E ANÁLISE DAS CEPAS DE CAMPO DE CPV-2</b>	<b>34</b>
4.1.1. Captação de amostras	34
4.1.2. Extração do DNA com sílica	35
4.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
<b>4.2. ANÁLISE MOLECULAR E ESTRUTURAL DE CEPAS DE CAMPO DE CPV-2 E VACINAS COMERCIAIS</b>	<b>36</b>
<b>4.3. ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS E CEPAS DE CAMPO DE CPV-2</b>	<b>37</b>
4.3.1. Animais utilizados	37
4.3.2. Seleção de cepas de parvovírus canino tipo 2	38
4.3.3. Cultivo viral	41
4.3.4. Teste de Hemaglutinação (HA)	42
4.3.5. Inativação com formalina e Óleo mineral como adjuvante	42
4.3.6. Teste de esterilidade com meio Brain Heart Infusion	43
4.3.7. Procedimentos anestésicos, manuseio e formas de coleta	45
4.3.8. Armazenamento das amostras	48
4.3.9. Preparo do soro dos ratos (inativação do soro)	48
4.3.10. Pesquisa de anticorpos neutralizantes	48
4.3.11. Extração do DNA com sílica a partir das amostras das vacinas e PCR em tempo real (qPCR)	49
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>51</b>

<b>5.1. ANÁLISE DAS CEPAS DE CAMPO DE CPV-2</b>	<b>51</b>
5.1.1. Amostras de campo	51
5.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	51
<b>5.2. ANÁLISE MOLECULAR E ESTRUTURAL DE CEPAS DE CAMPO DE CPV-2 E VACINAS COMERCIAIS</b>	<b>52</b>
<b>5.3. ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS E CEPAS DE CAMPO DE CPV-2</b>	<b>62</b>
5.3.1. Cultivo viral	62
5.3.2. Teste de Hemaglutinação (HA)	62
5.3.3. Inativação com formalina e óleo mineral como adjuvante	64
5.3.4. Teste de esterilidade com meio Brain Heart Infusion (BHI)	64
5.3.5. Procedimentos e manuseios realizados	64
5.3.6. Pesquisa de anticorpos neutralizantes	64
5.4. Correlação de Spearman do resultado da análise de Virusneutralização e qPCR das amostras provenientes das vacinas	67
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>74</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>75</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>88</b>
<b>Anexo I</b>	<b>88</b>
<b>Anexo II</b>	<b>89</b>
<b>Anexo III</b>	<b>90</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Patogênese do parvovírus canino.....	24
<b>Figura 2:</b> Principais órgãos acometidos por consequência da passagem endotoxinas na corrente sanguínea. ....	26
<b>Figura 3.</b> Metodologia resumida representando o delineamento das análises. ....	34
<b>Figura 4.</b> Visualização do alinhamento <i>Muscl</i> realizado no programa MEGA11 das sequências utilizadas para o desenvolvimento da vacina experimental para identificação dos aminoácidos de interesse substituídos do parvovírus canino tipo 2.....	39
<b>Figura 5:</b> Análise filogenética realizada por SANTANA et al, 2022 apresentando os respectivos clados das amostras utilizadas em estudo para a fabricação de uma vacina experimental. ....	40
<b>Figura 6.</b> Garrafas de cultivo celular devidamente identificadas com os respectivos vírus identificados e o controle da sua passagem.....	42
<b>Figura 7.</b> Local em que os animais permaneceram durante o estudo. ....	44
<b>Figura 8.</b> Esquema representando o protocolo utilizado.....	45
<b>Figura 9A.</b> Aplicação intraperitoneal de vacina comercial em rato da linhagem <i>wistar</i> .....	46
<b>Figura 9B.</b> Animal sendo anestesiado através de anestesia inalatória com isoflurano.....	47
<b>Figura 9C.</b> Coleta de sangue realizada através da veia gengival com o rato da linhagem <i>wistar</i> , previamente insensibilizado com isoflurano.....	47
<b>Figura 10.</b> Técnica de vírusneutralização (VN) realizada na Universidade de Leipzig, Alemanha.....	49
<b>Figura 11.</b> Gel de agarose após coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta. A seta vermelha representa o marcador de peso molecular e as setas azuis indicam as amostras em que o DNA alvo foi amplificado.....	51
<b>Figura 12.</b> Árvore filogenética pelo método da máxima verossimilhança (ML),envolvendo 79 sequências da proteína VP2, depositadas no GenBank nos últimos 10 anos, sendo 8 destas sequências de vacinas. Cada sequência foi identificada de acordo com o número de acessos do GenBank. Na árvore, G1 está em azul, G2 está em roxo e as vacinas (GVac) estão em ciano (junto da cepa ancestral). A história evolutiva foi inferida utilizando o método de Máxima	

Verossimilhança e o modelo baseado na matriz JTT(JONES D.T., TAYLOR W.R., AND THORNTON J.M., 1992).....53

**Figura 13.** Imagem em *cartoon* da proteína VP2 (M19296-1), apresentando os principais sítios de aminoácidos substituídos. A coloração amarela indica a sua localização na proteína e a seta indica qual o sítio do aminoácido presente naquele local. ....55

**Figura 14.** Imagem ampliada referente à análise de hidrofobicidade dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (44, 101, 267, 297 e 300) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente.....56

**Figura 15.** Imagem ampliada referente à análise de hidrofobicidade dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (305, 324, 375, 426 e 440) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente.....57

**Figura 16.** Imagem ampliada referente aos pontos eletrostáticos dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (44, 101, 267, 297 e 300) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente. Em azul representa-se carga positiva e em vermelho cargas com potencial eletrostático negativo. ....58

**Figura 17.** Imagem ampliada referente aos pontos eletrostáticos dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (305, 324, 375, 426 e 440) entre as sequências consenso G1, G2 e eGVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente. Em azul representa-se carga positiva e em vermelho cargas com potencial eletrostático negativo. ....59

**Figura 18.** A figura apresenta as estruturas esquemáticas dos aminoácidos originais (à esquerda) e mutantes (à direita) e seus respectivos sítios. A espinha dorsal, que é a mesma para cada aminoácido, é colorida de vermelho. A cadeia lateral, única para cada aminoácido, é colorida de preto.....61

**Figura 19.** Observação de efeito citopático 72 horas após a inserção do vírus na célula de linhagem CFRK. A seta vermelha indica espaços entre as células, caracterizando morte celular (apoptose).....62

**Figura 20.** Imagem apresentando o teste de hemaglutinação (HA), realizado após o isolamento do vírus em cultivo celular a fim de determinar a quantidade de unidades hemaglutinantes (UHA) presente em cada amostra. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas. ....63

**Figura 21.** Produto final da vacina experimental contendo o vírus isolado em cultivo celular, inativado com formalina e óleo mineral como adjuvante.....64

## Lista de quadros

- Quadro 1.** Sequências de parvovírus canino tipo 2 depositadas no GenBank em estudo prévio realizado por Santana et al. (2022), utilizadas para o desenvolvimento da vacina experimental com as respectivas caracterizações dos aminoácidos substituídos com os respectivos sítios, após alinhamento no programa MEGA11 (KUMAR S. et Al., 2018).....39
- Quadro 2.** Quadro apresentando o vírus utilizado, quantidade de vírus, de formalina, de PBS e de óleo mineral, totalizando 2 mL de cada vacina. .... 43
- Quadro 3.** Classificação das variantes circulantes no Brasil, realizada a partir das sequências depositadas no GenBank nos últimos 10 anos, separadas de acordo com a cidade (localização) e classificação das cepas das vacinas comerciais nacionais e importadas utilizadas no Brasil.....52
- Quadro 4.** Alterações observadas no clado G1, G2 e GVac em comparação à cepa ancestral de acordo com cada sítio e seus respectivos aminoácidos.....54
- Quadro 5.** Principais sítios com substituições de AA das sequências consenso..... 54
- Quadro 6.** Alterações de polaridade observadas a partir das sequências consenso após a substituição dos aminoácidos comparados à cepa ancestral CPV-2 (Acesso no GenBank: M19296.1).....60
- Quadro 7.** Resultado do teste de hemaglutinação dos vírus utilizados para a fabricação da vacina experimental. ....63
- Quadro 8.** Apresentação dos resultados obtidos a partir do teste de VN com Imunofluorescência dos soros obtidos da coleta do procedimento terminal dos ratos da linhagem tipo *wistar* incluindo os grupos *Vac1*, *Vac2*, *Vac3*, *Vac4* e *Vac5*. ....65
- Quadro 9.** Apresentação dos resultados obtidos a partir do teste de VN com Imunofluorescência dos soros obtidos da coleta do procedimento terminal dos ratos da linhagem tipo *wistar* incluindo os grupos *Vac7*, *Vac8*, *UCS2*, *UCS12*, *CPV2* e *Grupo controle*..... 65

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Tabela apresentando o N amostral de cada grupo (n=5) exibindo os resultados da moda, média, mediana e desvio padrão do teste de VN das amostras do soro dos ratos da linhagem *wistar*, imunizados com as oito vacinas comerciais, três vacinas experimentais e o grupo controle contra TCDI 100 submetidos à cepa 265:CPV-2.....66

## **Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**

**LDMV** – Laboratório de Medicina Veterinária

**UCS** - Universidade de Caxias do Sul

**ISAM** - Instituto de Saneamento Ambiental

**CPV-2** – Parvovírus canino tipo 2

**FPV**- Vírus da Panleucopenia Felina

**MEV** – Vírus da enterite da marta

**RaPV** – Raccoon parvovírus

**ORF** – Quadros de leitura abertos (do inglês “*Open Reading Frames*”)

**SIRS** – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

**HI** - Teste de inibição da hemaglutinação

**IF** – Imunofluorescência

**ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”)

**EIE** – Ensaio imunocromatográfico

**IHQ** – Imunohistoquímica

**HA** – Teste de Hemaglutinação

**WASAVA** – Associação Mundial de Veterinários de Pequenos Animais (do inglês “*World Small Animal Veterinary Association*”)

**CREAL** - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

**VN** – Virusneutralização

**CFRK** – Célula de linhagem de rim felino (do inglês “*Cell feline kidney lineage*”)

**TfR** – Transferrina

**ALA** – Alanina

**GLI** – Glicina

**M** – Glicina

**L** – Leucina



**I** – Isoleucina

**T** - Treonina

**S** – Serina

**A** – Alanina

**D** – Aspartato

**Y** - Tirosina

**N** - Asparagina

**V** – Valina

**T** – Treonina

**G** – Glicina

**BHI** – Infusão de cérebro e coração (do inglês “*Brain Heart Infusion*”)

**PBS** (do inglês *Phosphate Buffer Solution*)

**BBS** (do inglês *Borate Buffer Solution*)

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das principais causas de diarreia infecciosa em cães jovens é a enterite viral causada pelo parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) que acomete esta espécie desde o fim dos anos 70 (APPEL, M. J. et al; 1979; REED et al., 1988; MCCAWE E HOSKINS, 2006). Nota-se contínua incidência de enterite devido ao vírus ter a capacidade de sofrer substituições alterações de aminoácidos em determinadas regiões de epítipo, tornando-o mais resistente e virulento dando origem a novas subvariantes (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). O CPV-2 é um vírus não envelopado de DNA fita simples, altamente resistente ao ambiente (GREENE; DECARO, 2012; VOORHEES 2020).

O CPV-2 é o agente etiológico da gastroenterite hemorrágica em cães jovens (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012) e caracteriza-se pelo tropismo em diferentes linhas celulares, causando infecção entérica grave sanguinolenta, apresentando supressão imunológica e alta letalidade; além disso também pode apresentar quadros de anorexia e vômito associando-se à elevada mortalidade e morbidade na população canina (PRITTIE, 2004; GODDARD e LEISEWITZ, 2010). Os sinais clínicos da parvovirose canina não são patognomônicos, mas auxiliam na suspeita mediante a realização do exame físico devido ao quadro de diarreia hemorrágica, podendo ser realizados testes com amostras fecais para diagnóstico (MAZZAFERRO, 2020).

O controle da parvovirose canina através da vacinação é considerado importante a fim de proteger os caninos contra as cepas atuais do ambiente (SANTANA et al., 2019). No entanto, o parvovírus canino acumulou substituições em aminoácidos, que conferem a vantagens adaptativas, que surgem desde a sua emergência no final da década de 80, resultando na origem de três variantes antigênicas (subtipos) denominadas CPV-2a, CPV-2b e CPV- 2c (MIRANDA; THOMPSON, 2016; VOORHEES et al ., 2020). O CPV-2 original não se apresenta mais circulante desde os anos 90, no entanto a maioria das vacinas são produzidas com esta cepa ou com CPV-2b. Não existem vacinas comerciais produzidas com o subtipo mais recente, o CPV-2c (CASTRO et al., 2007; GODDARD e LEISEWITZ, 2010; DECARO; BUONAVOGLIA; BARRS, 2020). Estudos apontam a necessidade de avaliar as cepas do parvovírus canino através de análises moleculares, visando determinar a predominância das variantes circulantes e aumentar a consciência da população perante as características da doença em cães vacinados e não vacinados (YIP, et al., 2020).

Muitas vacinas disponíveis no mercado são comercializadas com as cepas CPV-2 ou CPV-2b, utilizando-se o vírus vivo modificado (MLV) conferindo a uma resposta de anticorpos duradoura, mas dependendo de revacinação (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012; WILSON et al., 2014). No entanto, estas vacinas podem não gerar resposta imunológica suficiente, o que pode estar relacionado à produção da vacina com cepa inadequada, erro na atenuação do vírus ou mal armazenamento (DAY et al., 2007; DECARO et al., 2020).

Existem diferentes marcas de vacinas com diferentes protocolos disponíveis no Brasil. A vacinação em cães é uma atividade exclusiva de médicos veterinários, no entanto, na maioria das vezes a sua aplicação é realizada sem exame clínico e/ou laboratorial prévio e também por profissionais não capacitados. Além disso, o armazenamento e transporte de vacinas nacionais pode ocorrer de maneira inadequada, bem como a sua comercialização, que se encontra em estabelecimentos como pet shops, agropecuárias e lojas virtuais, o que pode levar à aplicação errônea das mesmas. Desta forma existem questionamentos quanto à eficácia de marcas de vacinas, principalmente quando aplicadas sem prévio exame físico do paciente e armazenamento adequado do produto (LENCINA et al., 2023).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar diferentes perfis de anticorpos de vacinas comerciais disponíveis contra CPV-2, realizando a aplicação de diferentes vacinas através de sistema murino, para que na sequência fosse determinada a produção de anticorpos neutralizantes através do teste de virusneutralização (VN) e imunofluorescência. Ademais, foram realizadas análises *in silico* através de ferramentas de bioinformática a fim de caracterizar pontos importantes com substituições de aminoácidos na proteína VP2. Para isso, foram avaliadas proteínas estruturais, a fim de determinar alterações de pontos eletrostáticos e hidrofóbicos em aminoácidos que podem estar relacionados com o desenvolvimento de anticorpos e neutralização viral.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar as variantes circulantes de CPV-2 e a capacidade neutralizante de anticorpos gerados das vacinas comercializadas no sul do Brasil.

### **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Obter vírus de campo (CPV-2) da região que abrange Caxias do Sul e região metropolitana de Porto Alegre a fim de se determinar as variantes circulantes.
- Avaliar a capacidade neutralizante de anticorpos gerados pelas vacinas comerciais do CPV-2 disponíveis no Brasil.
- Determinar substituições de aminoácidos e seus respectivos sítios presentes nas vacinas comerciais.
- Determinar substituições de aminoácidos e seus respectivos sítios presentes dos vírus em circulação no Brasil.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. ETIOLOGIA – Família *Parvoviridae*

Diversos hospedeiros naturais podem se infectar com os representantes da família *Parvoviridae*, sendo eles humanos, macacos, suínos, cães, gatos, martas, ratos, entre outros. As doenças graves provocadas por estes vírus acometem principalmente indivíduos jovens da espécie infectada (GOVINDASAMY et al., 2003). Segundo a classificação mais recente, o CPV se inclui na família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Protoparvovirus*, sendo formado em apenas uma espécie, *Protoparvovirus Carnivore 1*, juntamente com o parvovírus felino (FPV) e outros parvovírus de carnívoros (BARRS et al., 2019). Em contrapartida, alguns pesquisadores sugerem considerar as três variantes antigênicas como pertencentes a um único “clado CPV-2a” que através de análise filogenética apresenta uma ramificação distinta da cepa CPV-2 (VOORHEES et al., 2020). No entanto, até o presente momento, a maioria dos virologistas utilizam a nomenclatura de três variantes (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c).

Os parvovírus são capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados, a família *Parvoviridae* constitui as subfamílias *Densovirinae* e *Parvovirinae*. Há pouco tempo sugeriu-se uma reclassificação da subfamília *Parvovirinae* para incluir treze gêneros e mais de setenta e cinco espécies. O gênero que era conhecido anteriormente como *Parvovirus* foi renomeado para *Protoparvovirus* que possui quatro espécie-tipo do *Rodent protoparvovirus 1* (*Protoparvovirus de roedor 1*) como espécie e seis espécies-tipo que são: *Minute virus of mice* (vírus minúsculo de camundongos), MVM; *Bufavirus 1a human* (bufavírus 1a humano), BuV1a; *Canine parvovirus* (parvovírus canino), CPV; *Feline parvovirus* (parvovírus felino), FPV; *Porcine parvovirus* (parvovírus suíno), PPV; e *Parvovirus H1* (parvovírus H1), H1 (COTMORE et al., 2019 ; ICTV, 2019)

Em meados dos anos 70 observou-se descendentes de um ancestral comum, a partir de análise filogenética de isolados do CPV, relacionado ao parvovírus endêmico da panleucopenia felina (FPV) das martas, guaxinins, raposas do ártico, ou outros hospedeiros da ordem Carnivora. Ainda assim sugeriu-se a raposa como o hospedeiro intermediário deste vírus devido os parvovírus atuais, que infectam raposas, terem uma sequência de DNA intermediária entre os FPV (mais antigo) e o CPV-2 atual (PARRISH, 1990; TRUYEN et al., 1998B; PARRISH, 1999).

O parvovírus canino (CPV-2) possui um DNA fita simples (polaridade negativa), com pequenas dimensões, com cerca de 5 kb (quilobases) e não envelopado. Contém uma cápside proteica, icosaédrica, apresentando 20 a 25 nm de diâmetro. O seu genoma é composto por duas proteínas estruturais: VP1 e VP2/VP3 e duas não estruturais: NS1 e NS2 (PARKER; PARRISH, 1997; SHACKELTON et al., 2005; MORAES e COSTA, 2007; OHSHIMA et al., 2008; HOELZER; PARRISH, 2010). Estas proteínas diferem nas porções e modificam-se após a tradução ou apenas na porção inicial (amino-terminal) (SIMPSON et al., 2002), somado a isto a proteína VP2 (64KDa) representa ser o principal constituinte do capsídeo (TURISO et al., 1992). Dentre as proteínas não estruturais acredita-se que a NS1 seja fundamental para que ocorra a replicação do DNA, controlando as ações citotóxicas na célula hospedeira e o controle de promotores (COTMORE; TATTERSALL, 2007). Em relação a NS2 compreende-se pouco a sua função em relação à replicação dos parvovírus (WANG et al., 1998).

O genoma do parvovírus canino constitui duas extensas regiões de leituras (“Open Reading Frames” – ORF) que são localizadas em sua porção interna e não se sobrepõem, sendo localizadas em cada um dos lados. A região com a porção 3’ codifica as proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e outra região com a porção 5’ é onde localizam-se as proteínas da cápside VP1 e VP2, em que são codificadas (SHACKELTON, 2005). A proteína VP2 apresenta o sítio de ligação aos receptores dos hospedeiros e confere às propriedades hemaglutinantes contendo epítomos que são responsáveis pela indução dos anticorpos neutralizantes (LOPEZ de TURIZO et al., 1991).

O DNA do genoma viral do parvovírus canino não possui um gene que codifica a enzima DNA-polimerase necessária para a replicação. Sendo assim, multiplica-se em células com elevada atividade mitótica na fase S do ciclo da síntese de DNA que se mantém por poucas horas. É por este motivo que a predileção do vírus é por células do epitélio intestinal, do miocárdio (em neonatos) e da medula óssea (MEGID et al., 2016).

### **3.2. EPIDEMIOLOGIA**

Anteriormente à denominação de CPV-2, o único parvovírus canino conhecido era o vírus que hoje denominamos de CPV-1, considerado não patogênico (CARMICHAEL et al., 1994). O CPV-2 foi identificado nos Estados Unidos, no ano de 1978 pela primeira vez (APPEL et al., 1979). Notava-se sinais clínicos relacionados a casos graves de enterite hemorrágica e leucopenia acentuada, com elevada mortalidade e rapidamente se espalhou por todo mundo, chegando ao Brasil em abril de 1980 (REED et al., 1988; CARMICHAEL et al., 2005). Em

poucos anos foi observado o surgimento de novas variantes do CPV-2, o qual agregou mutações com vantagens adaptativas na população canina, sendo substituído pelas variantes antigênicas CPV-2a e CPV-2b e CPV-2c (PRATELLI et al., 2001; STRECK et al., 2009; MIRANDA e THOMPSON, 2016).

O sítio 426 da proteína VP2, do capsídeo, é utilizado para determinar as classificações das variantes CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c avaliando-se qual o aminoácido presente. Neste caso, o sítio 426 a variante CPV-2a apresenta a asparagina (N) nesta posição; a variante CPV-2b apresenta o aspartato (D) e a variante CPV-2c apresenta o glutamato (E) (HONG et al., 2007). A variante CPV-2c foi determinada devido a alteração do aminoácido glutamato no sítio 426 da proteína VP2, detectada pela primeira vez na Itália, em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001) A nova variante foi localizada em muitos países como no Vietnã (NAKAMURA et al., 2004), Espanha (DECARO et al., 2006b), Uruguai (PÉREZ et al., 2007) e o novo biótipo do CPV-2c foi relatado somente em 2008 no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul (STRECK et al., 2009).

A distribuição global dos subtipos de CPV-2 indica que o CPV-2a é o subtipo predominante na Ásia, enquanto o CPV-2c é predominante na América do Sul e na Europa (ZHOU ET AL., 2017). No entanto, dentre os países da América do Sul, no Brasil se destaca a circulação da variante CPV-2a (ZHOU, P. et al., 2017). Estudos anteriores indicaram que o CPV-2b é o subtipo predominante no Irã e nos EUA (FIROOZJAI et al., 2011; MIRANDA E THOMPSON, 2016; ZHOU et al., 2017; NIKBAKHT et al., 2018).

Dentre os cães de raça definida, os das raças *Shih-Tzu*, *Rottweiler*, *Dobermann*, *Pinscher*, *Labrador Retriever*, *Pastor Alemão*, *Springer Spaniel*, *American Pit Bull Terrier* e *Yorkshire* são considerados os mais acometidos (MEGID et al., 2016). Além disso, supõe-se que em *Rottweilers*, *Dobermann* e *Pinschers* existam predisposições devido à herdabilidade genética das raças relacionadas à imunodeficiências que fazem com que aumente as chances destes animais desenvolverem as manifestações graves da parvovirose devido não responderem geneticamente à infecção pelo CPV-2 (PRITTIE, 2004).

Alguns animais apresentam infecção subclínica e assumem uma grande importância na disseminação desta doença por excretarem quantidades substanciais do vírus, sendo então importantes fontes de contágio (MCCAW; HOSKINS, 2006). Outros reservatórios da doença considerados importantes são os cães errantes e canídeos selvagens, devido ao fato de serem susceptíveis à infecção subclínica e apresentarem sintomatologia discreta, sendo carreadores do

vírus. Por outro lado, os gatos não manifestam sinais clínicos mas podem ser portadores e importantes fontes de transmissão aos caninos (TRUYEN et al., 1995; TRUYEN et al., 1996). A parvovirose canina é considerada de elevada mortalidade e morbidade entre a população suscetível (PRITTIE, 2004).

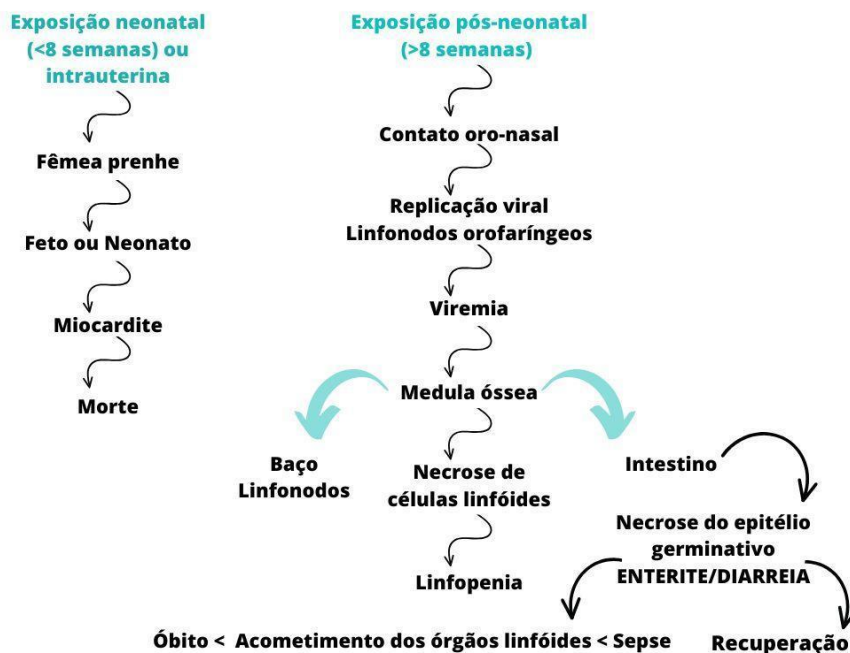
A transmissão procede-se ao contato com fômites contaminados por fezes, através da via fecal-oral ou do contato oronasal (HOSKINS, 1997). Visto isso, o vírus pode ser transportado através das mãos ou vestuário de pessoas que entraram em contato com material infectado por fezes que contenham o vírus, sendo uma importante fonte de disseminação (TIMONEY et al., 1992; GUILFORD, 1996; PARRISH, 1999). Nota-se que a maior gravidade da doença ocorre em caninos filhotes com menos de duas semanas de idade, em virtude das suas células de tecidos linfóides, epitélio intestinal, medula óssea e coração serem as mais acometidas. Quando os caninos possuem mais que duas semanas de idade os tecidos acometidos são iguais aos anteriores, à exceção das células cardíacas. Vale ressaltar que em filhotes que estão em desmame há maior susceptibilidade de infecção devido às mudanças na dieta e de sua microbiota bacteriana (HOUSTON et al., 1996; SMITH-CARR et al., 1997).

### **3.3. PATOGENIA**

Após a entrada do vírus no organismo ele passa a se replicar nos tecidos linfóides da orofaringe e timo (em filhotes) e dissemina-se por diversos órgãos, através da corrente sanguínea, gerando uma infecção sistêmica (MEUNIER et al., 1985). Durante o processo de viremia no organismo os órgãos alvos em que o vírus se deposita são principalmente os que possuem alta divisão celular, como as células da medula óssea, órgãos linfopoiéticos e criptas intestinais (Figura 1) (COHN et al., 1999; MCCAWE; HOSKINS, 2006).



**Figura 1:** Patogênese do parvovírus canino.



**Fonte:** Adaptado pela própria autora de POLLOCK; COYNE, 1990; GREEN; DECARO, 2012.

No intestino, a ruptura da lâmina própria, a atrofia das vilosidades, bem como a sua perda, resulta no colapso do epitélio intestinal devido o vírus percorrer a corrente sanguínea e alcançar as criptas intestinais (SMITH-CARR et al., 1997). Os filhotes que se infectam via intrauterina ou antes das 8 semanas de idade podem desenvolver miocardite devido a elevada replicação viral no tecido cardíaco, o que pode ocasionar a morte súbita do animal (BIRD; TAPPIN, 2013).

Após entrar em contato com o vírus via oronasal, entre o terceiro e quarto dia de infecção, ocorre a viremia intensa, que passa a diminuir a partir do sexto dia, o qual os anticorpos neutralizantes passam a estar presentes no soro. O período de incubação pode variar entre 2 a 14 dias. Cães que apresentam imunidade parcial podem apresentar formas clínicas brandas ou infecções subclínicas da doença (FLORES, 2007).

Quando o animal está infectado ele se apresenta imunodeprimido e fica predisposto a infecções secundárias por outros agentes oportunistas, sendo eles bactérias, vírus, parasitas e fungos, o que contribui para o agravamento dos sinais clínicos (FLORES, 2007). Normalmente a diarreia hemorrágica se apresenta de quatro a cinco dias após a infecção (MCCAW; HOSKINS, 2006). Aproximadamente após o terceiro dia de infecção o vírus passa a ser excretado nas fezes, sendo em maior quantidade por volta dos 20 dias. Provavelmente a excreção viral através das fezes cesse com o surgimento da imunidade (FLORES, 2007).

### 3.4. SINAIS CLÍNICOS

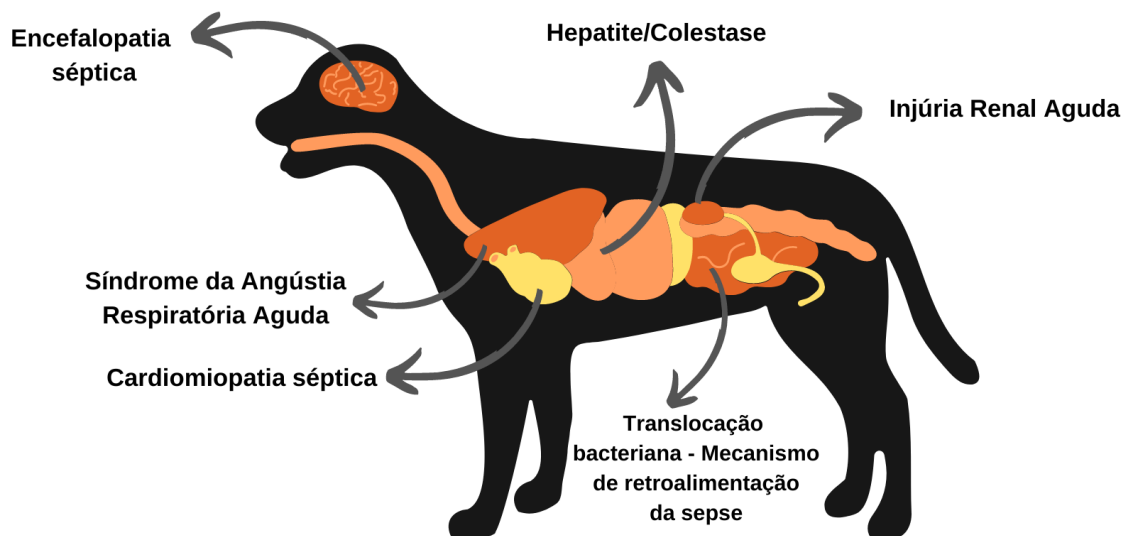
As intensidades dos sinais clínicos estão diretamente relacionadas à quantidade de carga viral a qual o canino foi exposto, à sua resposta imunológica, bem como a sua idade e a virulência do subtipo viral (PEREIRA et al., 2015). Durante a viremia os cães podem apresentar febre e anorexia ou apresentar melhoras destes sinais antes de evoluírem para a doença clínica (COHN et al., 1999; MCCAWE; HOSKINS, 2006).

O CPV-2 infecta principalmente os tecidos do trato gastrointestinal, medula óssea e miocárdio, sendo que o miocárdio acomete principalmente cães com menos de duas semanas de idade (GREENE; DECARO, 2012). Alguns fatores podem ser agravantes da doença em filhotes, sendo eles: elevada carga parasitária, infecções concomitantes, comprometimento da imunidade humoral e baixos títulos de anticorpos maternos, bem como fatores ambientais estressantes (PRITTIE et al., 2004).

Os primeiros sinais clínicos são inespecíficos e incluem anorexia, depressão e febre. Após 24 a 48 horas do início dos sinais clínicos nota-se vômito e diarreia proveniente do intestino delgado. Devido a isto podem haver consequências como desidratação grave e choque hipovolêmico pela perda de fluidos importantes através do trato gastrointestinal. Sinais como estado mental alterado, tempo de preenchimento capilar (TPC) prolongado, taquicardia, pulsos fracos e filiformes, hipotensão, extremidades frias e hipotermia normalmente são evidentes e estão relacionados à hipoperfusão (PRITTIE et al., 2004).

A manifestação clínica mais comum em filhotes é a enterite aguda que pode se apresentar amarelo-acinzentada (inicialmente) e com estrias de sangue ou fezes mais escurecidas devido ao sangue, se tornando hemorrágica progressivamente (PRITTIE, 2004; GREENE; DECARO, 2012). Por ser um vírus que gera intenso dano da mucosa intestinal o animal fica predisposto à translocação bacteriana e sepse devido à disbiose intestinal, promovendo a passagem de endotoxinas ao sangue (SCHOEMAN et al., 2013). A sepse é ameaçadora à vida do animal e é definida como um desequilíbrio orgânico pela resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Para considerar um canino como séptico deve-se enquadrar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) o qual esteja confirmado a um processo infeccioso com reação sistêmica (SINGER et al., 2016). A Figura 2 ilustra os principais órgãos acometidos por consequência da passagem de endotoxinas ao sangue.

**Figura 2:** Principais órgãos acometidos por consequência da passagem endotoxinas na corrente sanguínea.



**Fonte:** Adaptada pela própria autora de SINGER et al., 2016; SIMON et al., 2019.

Sendo assim, a elevada mortalidade e morbidade da parvovirose não é determinada apenas pela gastroenterite viral, mas sim pela migração de bactérias do lúmen intestinal na corrente sanguínea que gera a absorção de toxinas e à resposta inflamatória sistêmica causando a insuficiência dos órgãos e favorecendo, assim, a patogênese da parvovirose (PRITTIE, 2004).

### 3.5. DIAGNÓSTICO

Os caninos que apresentarem sinais clínicos, como diarréia hemorrágica, devem passar por um exame clínico minucioso a fim de serem realizados os diagnósticos diferenciais de parvovirose canina. Para a conclusão da suspeita diagnóstica devem ser feitos testes laboratoriais complementares e específicos para a detecção do CPV-2 (CARMICHAEL et al., 1980; STTROMANN et al., 2008; HUMM; HUGHES, 2009).

No momento do exame físico o animal pode apresentar dor abdominal devido ao quadro de gastroenterite aguda que pode acarretar em intussuscepção intestinal (PRITTIE, 2004). Quando os animais se encontram em quadros de síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), septicemia ou endotoxemia notam-se sinais de choque distributivo associado a petéquias e mucosas congestivas devido às alterações na coagulação (HUMM; HUGHES, 2009).

Para obtenção do diagnóstico definitivo são realizadas técnicas de detecção de parvovírus canino através das fezes (DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). A microscopia eletrônica e o isolamento viral em cultivo celular foram as primeiras técnicas a serem utilizadas para diagnóstico. A microscopia eletrônica não é mais utilizada devido ao seu custo elevado e baixa especificidade e sensibilidade. O isolamento viral em cultivo celular é usualmente utilizado para pesquisa e indústria (POLLOCK; CARMICHAEL, 1983; DECARO; BUONAVOGLIA, 2012). Outras técnicas utilizadas são: reação em cadeia polimerase (PCR), a reação de inibição da hemaglutinação (HI), reação da hemaglutinação (HA), teste de imunofluorescência (IF), testes imunoenzimáticos (ELISA), ensaio imunocromatográfico (EIE) e análise imunohistoquímica (MORAES; COSTA, 2007; REDDY, 2015).

O EIE, também chamado de “*teste rápido*”, é utilizado rotineiramente na clínica médica de pequenos animais tanto para cães adultos quanto para filhotes, proporcionando a detecção precoce da parvovirose canina e consequentemente prevenindo a sua disseminação entre os animais. A técnica de PCR também está sendo realizada cada vez mais para a sua detecção devido ser altamente sensível e específica e possibilitando a detecção de quantidades mínimas do DNA de CPV-2 nas fezes dos caninos, permitindo ainda realizar a sua quantificação.

### **3.5.1. Ensaio imunocromatográfico (EIE)**

O EIE, também chamado de “*teste rápido*” ou “*Snap Test*”, é considerado um ensaio que utiliza tecnologia baseada no teste de ELISA. Esse método de diagnóstico é amplamente utilizado na rotina clínica veterinária, por ser rápido e de baixo custo. O teste geralmente considera a presença de antígenos ou anticorpos na amostra. Para a sua realização, a amostra do paciente é coletada e depositada no local do exame juntamente com uma solução tampão, para que ocorra a reação. O resultado é indicado através de marcadores colorimétricos e deve ser interpretado pelo clínico de acordo com as instruções do fabricante. Contudo, esse teste apenas determina os resultados como reagente (positivo) ou não-reagente (negativo) para a detecção do antígeno-alvo (ou agente infeccioso) que se deseja detectar. Sendo assim, é um teste qualitativo e não quantitativo. Dependendo da fase da doença em que o animal se encontra (aguda ou crônica) pode ocorrer um resultado falso-negativo (não-reagente), no qual não será detectada a presença do antígeno existente. É importante salientar que cada doença infecciosa possui uma fase de incubação do patógeno, por isso, os resultados desses testes devem ser analisados com cautela para a determinação de um resultado correto, tendo em mente que um resultado não-reagente não exclui a possibilidade de presença do patógeno; deve-se, nestes casos, solicitar outros testes para

se obter uma conclusão mais certa, considerando que esse método pode ser amostra-dependente (REDDY et. al., 2015)

### **3.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica de PCR é um método diagnóstico amplamente utilizado na biologia molecular com elevada sensibilidade e especificidade na identificação de quantidades mínimas de DNA e demonstrou-se satisfatória em amplificar exponencialmente sequências-alvo através da utilização de *primers* oligonucleotídeos. Esta técnica permite mimetizar *in vitro* os processos de replicação do DNA através de uma região específica do alvo que se deseja detectar. Em contrapartida existem duas técnicas amplamente utilizadas, a de PCR convencional e a de PCR em tempo real. Ambas as técnicas possuem o mesmo princípio das etapas de desnaturação, anelamento e extensão do material genético através da utilização de *primers* que amplificam a sequência-alvo desejada. A diferença é que na PCR convencional são visualizados apenas resultados qualitativos das amostras, não possibilitando visualizar a quantificação das amostras, já a PCR em tempo real permite a quantificação de material genético presente na amostra (NASCIMENTO et al., 2010; TOOHEY-KURTH et al., 2020).

### **3.5.3. Técnica de hemaglutinação (HA)**

O parvovírus canino tem capacidade de se ligar às hemácias e promover a sua hemaglutinação devido à ligação ao receptor de transferrina presente nas hemácias. Desta forma, a técnica de HA permite identificar e quantificar antígenos virais de parvovírus canino através das fezes de cães positivos considerando-se o título viral da amostra a que apresenta maior diluição onde ocorre a hemaglutinação (CARMICHAEL et al., 1980).

### **3.5.4. Técnica de inibição da hemaglutinação (HI)**

A técnica de HI permite identificar e quantificar os anticorpos anti-CPV presentes em amostras do soro dos caninos através da capacidade que anticorpos específicos de vírus capazes de inibir a atividade hemaglutinante, possibilitando medir a quantidade específica contra vírus hemaglutinantes (SENDA et al., 1986).

### 3.5.5. Isolamento viral em cultivo celular

O isolamento viral em cultivo celular permite gerar, *in vitro*, a replicação do vírus. Para isso se faz necessário trabalhar com linhagens de células específicas no cultivo celular de acordo com a predileção do microorganismo trabalhado. Para o isolamento viral de amostras de parvovírus canino pode-se utilizar linhagens de células de rim de gato (CFRK) e de rim canino, linhagens estabelecidas de pulmão de marta (LLC - 64), rim de cão (Mad in-Darby) e VERO. A replicação viral é evidenciada a partir da visualização de efeitos citopáticos ou através da detecção de proteínas ou ácidos nucleicos virais obtidos a partir das células infectadas. No caso do parvovírus canino, o efeito citopático observado com mais frequência é o de apoptose, o que caracteriza morte celular por conta da replicação viral (ANGELO et. al., 1988).

### 3.6. TRATAMENTO

O tratamento da parvovirose canina é apenas de suporte pelo fato de não existirem antivirais eficazes para a doença (WILLARD, 2009). Assim que diagnosticados, os cães infectados devem ser tratados isoladamente em um local específico (MORAES; COSTA, 2007). O tratamento da parvovirose canina é limitado a cuidados de suporte com fluidoterapia e antibióticos a fim de promover o equilíbrio eletrolítico e evitar complicações por infecções secundárias, além disso recomenda-se a fluidoterapia até que cessem os sinais de êmese, febre e diarreia (PRITTIE, 2004; WILLARD, 2009; GREENE; DECARO, 2012).

A antibioticoterapia é associada ao tratamento devido à consequência gerada pela diarreia, que é a disbiose intestinal, esta permite a entrada de bactérias na corrente sanguínea, principalmente a *Escherichia coli* e a *Clostridium perfringens*. No protocolo deste tratamento deve-se incluir antibioticoterapia de espectro que atinja tanto bactérias anaeróbicas Gram negativas quanto aeróbicas. Normalmente utiliza-se a combinação de penicilina com aminoglicosídeo a fim de combater essas bactérias, sobretudo, os animais devem estar corretamente hidratados devido à nefrotoxicidade que os aminoglicosídeos podem causar. O tratamento complementar com antieméticos, como metoclopramida, ondansetrona e maropitant são utilizados para controle da êmese, mas devem ser administrados com cautela pois podem causar hipotensão e não serem tão eficientes na redução da êmese (GREENE; DECARO, 2012). A administração de maropitant não é indicada para filhotes caninos com menos de quatro meses de idade pois há relatos de hipoplasia medular, quando utilizados (CRAWFORD; SELTON, 2010).

Na fluidoterapia preconiza-se a utilização de soluções cristalóides com eletrólitos equilibrados para reposição volêmica. Quando os animais apresentam diarreia grave podem ser utilizadas soluções alcalinizantes devido à grande possibilidade de desenvolverem acidose metabólica. A solução de Ringer Lactato é uma boa opção e pode ser utilizada em todos os casos. Deve-se levar em consideração o déficit de hidratação, perdas de líquidos e necessidades de manutenção para realizar o cálculo do volume total da fluidoterapia (MACINTYRE; SMITH-CARR, 1997; TAMS, 2007). Em filhotes com parvovirose é comum a ocorrência de hipoglicemia e hipocalcemia devido às perdas no vômito, diarreia e pela anorexia. Ainda assim a hipoglicemia pode ser consequência do hipermetabolismo devido à disfunção hepática ou sepse. Visto isso pode-se acrescentar ao fluido de manutenção uma solução de glicose de 2,5% ou 5% após correção *in bolus* intravenoso de 0,5 a 1 mL/kg, diluídos ao dobro do volume da solução fisiológica 0,9%. Para correção da hipocalcemia administra-se o potássio conforme resultados laboratoriais, não ultrapassando a taxa de 0,5 mEq/kg/h, a fim de evitar problemas cardíacos (PRITTIE, 2004; GODDARD; LEISEWITZ, 2010).

Quando o vômito está controlado, pode-se associar probióticos ao tratamento. Os probióticos restabelecem a saúde do lúmen intestinal, através da síntese de elementos antimicrobianos e diminuição do pH do lúmen intestinal, competem contra os microrganismos patogênicos por nutrientes locais (FERREIRA et al., 2011).

Recentemente há um novo tratamento disponível e aprovado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês, *United States Department of Agriculture*) comercializado pela ELANCO® e é realizado através do anticorpo monoclonal do parvovírus canino, sendo considerado o primeiro e único tratamento de anticorpo monoclonal (mAb), aprovado condicionalmente pelo USDA, que tem como alvo o parvovírus canino (CPV). Este anticorpo monoclonal é composto por uma região constante de cão e uma região variável de rato e esses dois elementos trabalham juntos para neutralizar o parvovírus canino *in vivo*, ligando-se seletivamente e impedindo que o vírus entre e destrua os enterócitos, observando-se como perspectiva futura a sua disponibilidade em território brasileiro.

### **3.7. CONTROLE**

O CPV-2 não possui envelope, é de estrutura simples e compacta ele pode resistir no ambiente por cerca de um ano se permanecer em seu pH ideal (de 3 a 9) e em temperatura abaixo de 56°C. O seu potencial infectante, quando presente em temperaturas abaixo de 7°C, pode

permanecer durante várias meses (KENNEDY et al., 1995; MORAIS; COSTA, 2007; HOELZER; PARRISH, 2010; GREENE; DECARO, 2012)

Para evitar a disseminação da doença, medidas de controle e profilaxia são extremamente importantes, contudo, caninos infectados devem permanecer isolados até a sua recuperação. No entanto, mesmo que vacinados, os caninos podem ser portadores assintomáticos da parvovirose canina, apresentando-se subclínicos e eliminando pequenas quantidades do vírus nas fezes. O ambiente e os fômites devem ser desinfetados adequadamente, sendo recomendado o vazio sanitário de seis meses destes animais (MORAES; COSTA, 2007). A desinfecção dos ambientes e objetos pode ser realizada com formaldeído 5%, hipoclorito de sódio a 0,175% e glutaraldeído. O vírus também pode ser inativado por radiação gama (TIMONEY et al., 1988).

### **3.8. PREVENÇÃO E VACINAÇÃO**

Além das questões higiênicas relacionadas ao ambiente e os fômites serem desinfetados adequadamente (MORAES; COSTA, 2007) um fator muito importante é o de prevenção, o que inclui a imunização dos animais de forma adequada através da vacinação, sendo assim, quando os animais apresentam titulação de anticorpos elevadas não desenvolvem a doença clínica e conseqüentemente não disseminam o vírus (POLLOCK; COINE, 1993; PRITTIE, 2004). Substituiu-se as vacinas com vírus inativado pelas vacinas atenuadas, o que gerou um aumento na imunidade e apresentou-se segura para ser utilizada (PRITTIE, 2004; GREENE; DECARO, 2012).

A maneira mais efetiva de prevenção é a vacinação, sendo que as vacinas disponíveis no mercado são compostas pelo CPV-2 e o CPV-2b (PRATELLI et al., 2001; DAVIS-WURZLER, 2014; DAY et al., 2016). O protocolo de vacinação deve ser bem criterioso, visto que os anticorpos maternos levam a falhas vacinais, não gerando a soroconversão da vacina administrada. Quando há ausência da interferência de anticorpos maternos nota-se após três dias de vacinação o início da produção de anticorpos (GREENE; DECARO, 2012; DAY et al., 2016).

É recomendado pela Associação Mundial de Veterinários de Pequenos Animais (WSAVA, 2020 do inglês *World Small Animal Veterinary Association*) que no protocolo vacinal quando a vacinação deve ser iniciada às 6 ou 9 semanas de idade, recomenda-se quatro vacinas essenciais primárias que devem ser administradas com um intervalo de 4 semanas, mas somente três doses são necessárias quando o início é entre 8 ou 9 semanas de idade e intervalo similar de



4 semanas ressaltando que este deve ser encerrado até os 4 meses de vida do animal sugerindo o intervalo de reforço a cada 3 anos. Contudo, na maioria das bulas das vacinas disponíveis comercialmente há recomendação de que se inicie a primovacinação em filhotes com 6 semanas de idade, repetindo-se as doses com intervalo de 2 a 3 semanas e, por fim, o reforço vacinal deve ser realizado a cada 12 meses, a partir da última aplicação. No entanto, cada marca de vacina disponível no mercado determina seus protocolos de aplicações, que devem ser seguidos conforme suas recomendações.

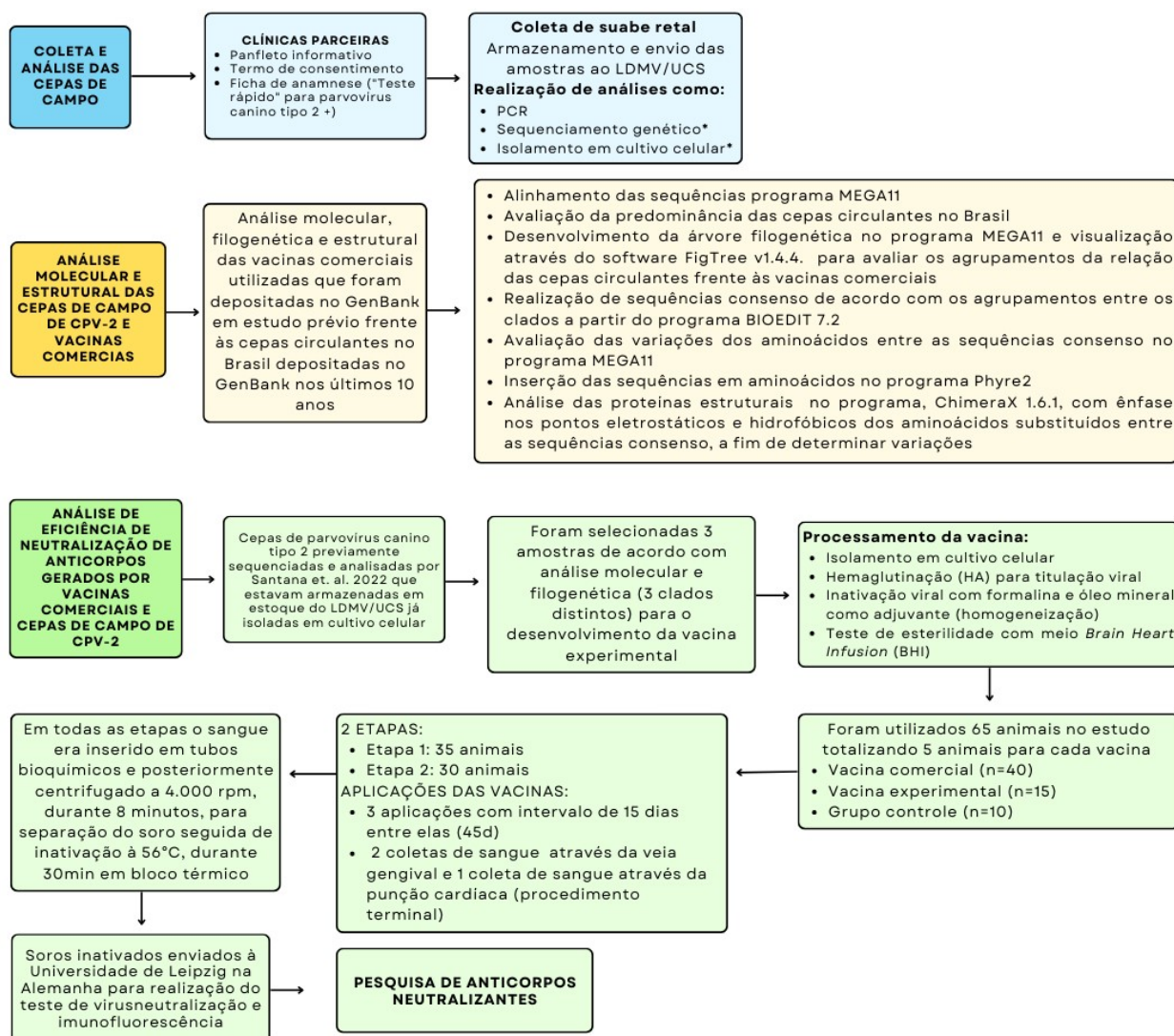
As bulas das vacinas ainda reforçam que o esquema de vacinação poderá ser alterado conforme orientações do Médico Veterinário, devendo-se realizar um exame físico minucioso dos animais, excluindo qualquer possibilidade de comprometimento do sistema imune. Deve-se avaliar se o animal foi vermifugado previamente à vacinação (a fim de eliminar endoparasitas) ou recebeu alguma medicação prévia (como glicocorticóides) que podem conferir a alteração do status imunológico do animal.

#### **4. METODOLOGIA**

Este trabalho contém etapas envolvendo: I. Coleta e análise de amostras de campo de CPV-2; II. Análise estrutural de cepas de campo de CPV-2 e vacinas comerciais e III. Análise de eficiência de neutralização de anticorpos gerados por vacinas comerciais e cepas de campo de CPV-2. A Figura 3 abrange a metodologia resumida das análises descritas em sequência.

O presente trabalho foi desenvolvido com a utilização de animais de estudo e foi previamente aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Caxias do Sul, em reunião extraordinária do dia 25 de abril de 2022, o qual analisou o projeto supracitado e o considerou aprovado, de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) devidamente cadastrados sob o número 002/2022 e 006/2022.

**Figura 3.** Metodologia resumida representando o delineamento das análises.



“\*” Análises que ainda seguem processamento

Fonte: Esquema elaborado pela própria autora.

## 4.1. COLETA E ANÁLISE DAS CEPAS DE CAMPO DE CPV-2

### 4.1.1. Captação de amostras

Clínicas parceiras da região de Caxias do Sul e região metropolitana de Porto Alegre receberam uma ficha de anamnese específica (Anexo I), preenchida no momento do exame físico dos caninos, a fim de determinar o grau dos sinais clínicos apresentados e um termo de consentimento (Anexo II) que foi assinado pelos tutores, a fim de permitir a utilização dos

resultados e dos dados de seus animais no estudo, bem como um panfleto informativo entregue às clínicas contendo os principais aspectos da pesquisa realizada (Anexo III).

As clínicas coletaram amostras de fezes com suabe retal dos caninos positivos, previamente testados com o *Parvo Ag Test Kit* (Alere, Brasil). Os suabes foram inseridos em um tubo contendo 3 mL de solução salina e devidamente identificados, conforme a ficha de anamnese de cada animal. Estas amostras foram armazenadas a -20°C e refrigeradas até o momento do encaminhamento ao LDMV/UCS.

#### **4.1.2. Extração do DNA com sílica**

O DNA total foi extraído com sílica utilizando-se kit comercial (NewGene® SIMBIOS Biotecnologia), seguindo recomendações do fabricante, para posteriormente submeter ao teste de reação em cadeia da polimerase (*PCR do inglês polymerase chain reaction*).

#### **4.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para a realização do teste de PCR foram utilizados os primers 555', H' e M', a fim de amplificar fragmentos e pares de bases que codificam as proteínas VP1/VP2 do CPV-2. Os primers utilizados para a amplificação e sua posição de nucleotídeo correspondem a uma linhagem CPV-2 de referência (número de acesso GenBank M19296), foram: VP2Mfor (2747-GCCGGTGCAGGACAAGTAAA-2766) e VP2Mrev (3651 - GGTGGTAAGCCCAATGCTCT-3632), Hfor (3555 - CAGGTGATGAATTTGCTACA - 3574) e Hrev (4184 - CATTGGATAAACTGGTGGT - 4165), 555for (4002 - CAGGAAGATATCCAGAAGGA - 4021) e 555rev (4585 - GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA - 4561) (BUONAVOGLIA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2019).

Nas condições experimentais estabeleceu-se a temperatura de desnaturação inicial à 95°C por 2 min, precedidos de 40 ciclos de desnaturação em 95° C por 40 ciclos, hibridização à 52° C por 30s, seguido da etapa final de extensão à 72° C por 5min. O volume total da reação foi de 25 µl, dos quais 12,5 µl corresponde ao Green Master Mix PROMEGA®, 7,5 µl de água purificada, 1 µl de cada primer e 2 µl do DNA viral extraído de cada amostra.

Foi utilizado o termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems™) e, por fim, o fragmento de DNA foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (0,8% em TAE 1x), corado em brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador (Spectroline™).

## 4.2. ANÁLISE MOLECULAR E ESTRUTURAL DE CEPAS DE CAMPO DE CPV-2 E VACINAS COMERCIAIS

Para compreender melhor a relação genética entre o CPV-2 e as vacinas comerciais foi realizada a busca de sequências de cepas circulantes de CPV-2, depositadas nos últimos 10 anos na plataforma GenBank e selecionou-se as que apresentavam a proteína VP2 completa, estas sequências foram inseridas em formato FASTA no programa MEGA11 (KUMAR S. et Al., 2018). Em seguida, foi realizado o alinhamento *muscle*, no mesmo programa, para a visualização das substituições dos aminoácidos, possibilitando determinar as variantes. O conjunto final dos aminoácidos após o alinhamento apresentou um total de 584 posições (KUMAR S. et Al., 2018). Foram avaliados os sítios 297, 305 e 426 a fim de se caracterizar as variantes CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. Além disso, foi realizada a separação, em tabela, de acordo com cepas predominantes em diferentes localidades.

Em seguida, foi realizada uma árvore filogenética, considerando uma distribuição discreta de Gamma, utilizada para modelar as diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios (6 categorias (+G, parâmetro = 0,0500). A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos medidos pelo número de substituições por sítio. Os dados codificados foram traduzidos, assumindo uma tabela de código genético padrão. Houve um total de 584 posições no conjunto de dados final. A árvore com o maior logaritmo de verossimilhança (-2171,14) foi apresentada. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando o modelo JTT, e então selecionando a topologia com o maior valor de logaritmo de verossimilhança (KUMAR et al., 2018; RAMBAUT, 2010). A árvore filogenética foi visualizada através do *software* FigTree v1.4.4. (RAMBAUT, 2010) para avaliação dos clados. Na sequência, foram inseridas todas as classificações realizadas previamente, de acordo com cada sequência, possibilitando melhor visualização do agrupamento entre os clados. Posteriormente, foram alinhadas as sequências, conforme seus agrupamentos nos clados, a fim de avaliar a porcentagem de substituições de aminoácidos e seus respectivos sítios comparadas à cepa ancestral.

Em seguida foi efetuado o desenvolvimento de sequências de consenso de acordo com os clados formados. Para isto, foi utilizado o *software* BIOEDIT 7.2 (HALL, 1999). Em seguida, o alinhamento destas sequências de consenso foi realizado para avaliar as variações dos aminoácidos e seus respectivos sítios entre as sequências consenso no *software* MEGA11 (KUMAR et al., 2018). Posteriormente, proteínas hipotéticas das sequências consenso preditas através da plataforma online Phyre2 (Acesso em: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (KELLEY, 2015). A análise estrutural das proteínas foi realizada no *software* ChimeraX 1.6.1 (PETTERSEN, 2020), com ênfase nos pontos eletrostáticos e hidrofóbicos dos aminoácidos substituídos.

Após a observação das alterações encontradas com relação às alterações em pontos eletrostáticos e hidrofóbicos das proteínas no *software* ChimeraX 1.6.1, optou-se pela utilização da ferramenta online HOPE (do inglês *Have yOur Protein Explained*) (Acesso em: <https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>) a fim de se obter mais informações com relação a carga e hidrofobicidade dos aminoácidos mutantes das alterações estudadas entre as sequências consenso, além das estruturas esquemáticas dos aminoácidos. Para isso, foi inseriu-se na plataforma HOPE a sequência da cepa ancestral (Acesso no GenBank: M19296.1) em proteína, obtida após o alinhamento no programa MEGA11 (PETTERSEN, 2020; VENSEELAR et al., 2010; KUMAR et al., 2018).

### **4.3. ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS E CEPAS DE CAMPO DE CPV-2**

#### **4.3.1. Animais utilizados**

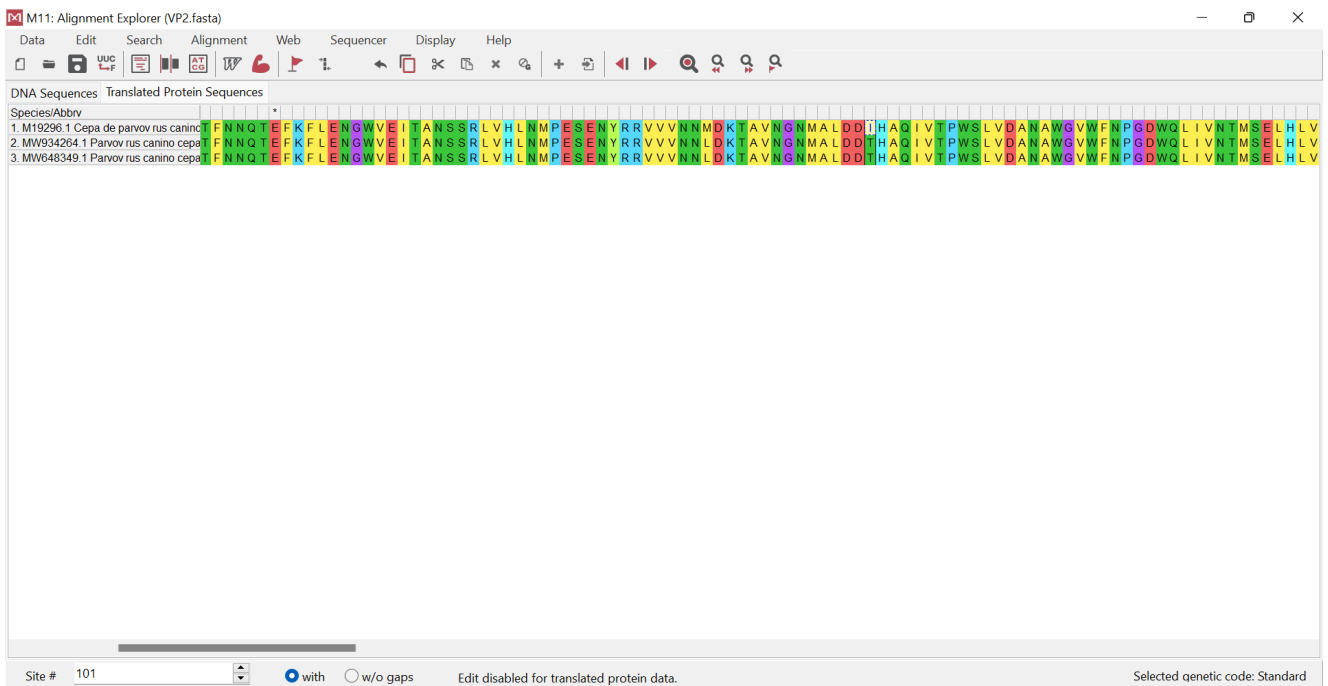
Foram utilizados 65 ratos, machos, da linhagem *wistar*, para o experimento. Os ratos foram adquiridos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O número amostral deste projeto teve como embasamento a utilização deste modelo experimental em estudos previamente realizados (WANG et al, 2020; GAO et al, 2020). O experimento foi realizado no Biotério da Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, localizado no Bloco S, Sala 514.

#### 4.3.2. Seleção de cepas de parvovírus canino tipo 2

Nesta etapa foram selecionados 3 vírus armazenados no LDMV para o desenvolvimento de três vacinas experimentais sendo dois destes vírus foram selecionados a partir do estudo prévio realizado por Santana et al. (2022) e um denominado de 265:CPV-2 (cepa referência). Santana et. al. (2022) coletou amostras de campo cedidas por clínicas parceiras da região da serra gaúcha, entre os anos de 2019 e 2020, de animais que apresentavam sinais clínicos como: hematoquezia, vômito e apatia e eram positivos no “teste rápido” para parvovirose canina e não apresentavam histórico vacinal completo. Estas amostras foram processadas no LDMV/UCS e inseridas em seu estudo. Foi realizado o teste de PCR com os *primers* 555', H' e M' a fim de obter a porção completa da proteína VP1/VP2 e, das amostras positivas em todos os *primers* procedeu-se a purificação e encaminhamento para o sequenciamento genético (BUONAVOGLIA et al., 2001 e OLIVEIRA et al., 2019). Em seguida, os resultados obtidos foram depositados na plataforma GenBank e inseridos em seu estudo. Ao total foram sequenciadas 23 amostras destes animais. O estudo incluiu a análise filogenética do gene VP2, a qual apresentou quatro clados distintos de CPV-2, através de inferência bayesiana. Nesta árvore foram utilizadas 661 sequências completas do gene VP2, incluindo todos os continentes (exceto a Antártida), através do acesso realizado pela plataforma GenBank. A árvore está representada na Figura 5.

Os resultados das sequências destas amostras foram analisados através do programa MEGA11 (KUMAR et al., 2018) a fim de ser realizada a visualização das variações entre os aminoácidos como finalidade de selecionar amostras para o desenvolvimento dos imunógenos experimentais. As sequências foram alinhadas (Figura 4) com a cepa ancestral (Número de acesso no GenBank: M19296.1) apresentando um total de 584 posições no conjunto de dados final após o alinhamento.

**Figura 4.** Visualização do alinhamento *Muscle* realizado no programa MEGA11 das sequências utilizadas para o desenvolvimento da vacina experimental para identificação dos aminoácidos de interesse substituídos do parvovírus canino tipo 2.



Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023 através do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA versão 11.0, 2022) (KUMAR et al., 2018)

Após o alinhamento das sequências os respectivos sítios com aminoácidos substituídos foram inseridos em uma tabela contendo a posição (número do AA) para que fosse realizada a visualização das variantes trabalhadas, correlacionando-se ao agrupamento entre os clados também demonstrados na Figura 5. Os respectivos aminoácidos estão numerados dispostos em colunas com as suas alterações apresentadas no Quadro 1. Após a observação das variantes trabalhadas em seus respectivos clados procedeu-se para a realização de outras análises a fim de avaliar a viabilidade destas amostras.

**Quadro 1.** Sequências de parvovírus canino tipo 2 depositadas no GenBank em estudo prévio realizado por Santana et al. (2022), utilizadas para o desenvolvimento da vacina experimental com as respectivas caracterizações dos aminoácidos substituídos com os respectivos sítios, após alinhamento no programa MEGA11 (KUMAR et al., 2018).

Acesso no GenBank	Amostra	Clado agrupado	87	101	297	300	301	305	324	426	440	555
M19296.1	CPV-2	W	M	I	S	A	T	D	Y	N	T	V
MW934264.1	UCS-12	W4	L	T	S	A	T	D	Y	N	T	V
MW648349.1	UCS-2	W1	L	T	A	G	T	Y	I	N	T	V

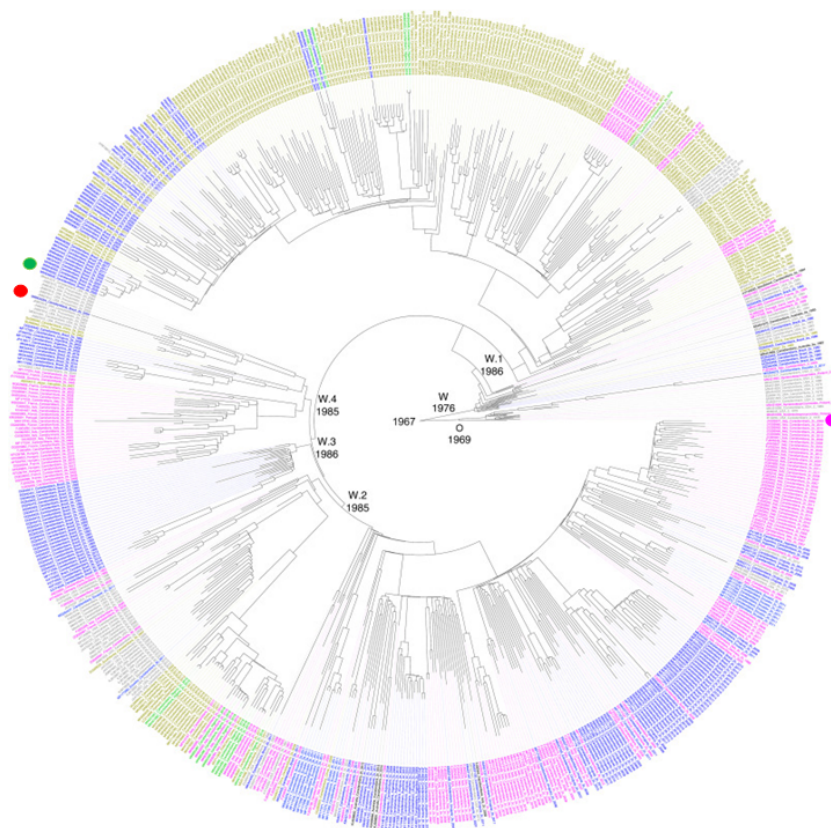
Fonte: Santana et al., 2022



Dos três vírus, um deles se encontra no clado W1, marcado em verde (Número de acesso no GenBank: MW648349.1) e o outro no clado W4, marcado em vermelho (Número de acesso no GenBank: MW934264.1). O número de acesso do vírus representando o CPV-2, está localizado no clado W, está marcado na cor violeta e é representado pelo número de acesso da cepa ancestral, por se tratar de um vírus com tal classificação armazenado de outros estudos realizados pelo LDMV/UCS (Número de acesso no GenBank: M19296.1 - CPV-2). Os vírus utilizados neste estudo estão representados na Figura 5.

Estes vírus foram avaliados quanto a sua viabilidade, sendo realizadas as seguintes análises: testes como PCR com o *primer* 555' e hemaglutinação (HA), a fim de avaliar a presença de partículas virais ativas. Na sequência foi realizado o cultivo viral com células da linhagem CFRK, a fim de avaliar a viabilidade viral (BUONAVOGLIA et al., 2001 e OLIVEIRA et al., 2019). O isolamento viral em cultivo celular e técnica da hemaglutinação estão descritos nos itens 4.3.3 e 4.4.4.

**Figura 5:** Análise filogenética realizada por SANTANA et al, 2022 apresentando os respectivos clados das amostras utilizadas em estudo para a fabricação de uma vacina experimental.



Fonte: Santana et al., 2022.

### 4.3.3. Cultivo viral

Foram utilizadas células CFRK cultivadas através de cultura em monocamada em garrafas de poliestireno descartáveis para cultivo TPP®, com área de 25cm<sup>2</sup> em estufa de CO<sub>2</sub> Thermo Scientific™ Forma Series 3 Water Jacketed em 5% a 37°C utilizando meio de manutenção DMEM (*do inglês* Dulbecco's Modified Eagle Medium) LGC Biotecnologia® suplementado com antibiótico (100 µl estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino LGC Biotecnologia®. A manutenção das células era realizada a cada 72 horas por meio de subcultivos. Nesta etapa, o meio era desprezado, e a monocamada recebia tratamento com solução de tripsina LGC Biotecnologia® por tempo máximo de 3 minutos na estufa à 37°C, sempre avaliando a opacidade que a solução gera na monocamada quando está ocorrendo a separação das células. Transcorrido o tempo de reação da tripsina, as garrafas eram levemente batidas para auxiliar no desprendimento das células. Em seguida repassava-se a célula cultivada (500 µl) a uma nova garrafa. Repetiu-se o processo até a obtenção de 5 garrafas 25cm<sup>2</sup> mantidas em cultivo celular até obterem 70-80% de confluência.

Para a realização da inoculação do vírus o meio de monocamada era removido, realizava-se a sua troca e aguardava-se 2 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> como finalidade das células se aderirem à monocamada e, em seguida, era introduzido 600 µl de cada vírus em cada garrafa, sendo 3 garrafas destinadas às vacinas experimentais e 2 garrafas destinadas ao grupo controle (1 controle positivo e 1 controle negativo), devidamente identificadas (Figura 6). Em seguida, as garrafas eram inseridas novamente a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, permanecendo durante 72 horas a fim de se obter efeito citopático. Após 72 horas as garrafas eram submetidas ao congelamento de -20°C e, logo após esta etapa, era realizado o descongelamento rápido. O processo de congelamento e descongelamento foi realizado por três vezes com a finalidade de romper as células e liberar as partículas virais, a fim de seguir para a próxima etapa de titulação viral em teste de hemaglutinação (HA) (PARTHIBAN, S. et al, 2011).

**Figura 6.** Garrafas de cultivo celular devidamente identificadas com os respectivos vírus e o controle da sua passagem.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

#### **4.3.4. Teste de Hemaglutinação (HA)**

A titulação viral dos vírus previamente isolados em cultivo celular foi realizada através do teste de hemaglutinação adaptado de Senda, et al. (1986). Para a realização do teste foram utilizados eritrócitos da espécie *Sus scrofa domesticus* (Suíno). O sangue foi coletado em tubos de citrato e lavado previamente ao seu uso, três vezes, com solução salina, sendo armazenado posteriormente a 4°C. Foram utilizados eritrócitos de suínos 0,5% (diluídos em BBS - do inglês *Borate Buffer Solution*). Para a realização das diluições seriadas foi utilizada uma solução salina tamponada com borato a pH 6,8 (BBS). Os testes foram realizados em microplacas de plástico (96 poços, tipo V). Foram realizadas diluições seriadas com as amostras em duplicatas. Foi inserido 25 µl de BBS em cada poço e, na sequência 25 µl de cada amostra (diluições seriadas em duplicata) descartando-se os 25 µl no último poço e, por fim, adicionando-se 50 µl de hemácias 0,5% em cada poço. As placas foram incubadas a 4°C durante 16 horas e, na sequência era realizada a leitura dos resultados.

#### **4.3.5. Inativação com formalina e Óleo mineral como adjuvante**

No protocolo do desenvolvimento de imunógeno com cepas brasileiras foram utilizadas formalina como inativante, e óleo mineral, como adjuvante. O vírus previamente isolado em cultivo celular e titulado em HA foi previamente centrifugado para remover todos os debris

celulares, sendo utilizado apenas o seu sobrenadante. O protocolo de inativação do vírus com formalina foi adaptado conforme Roy et al. (1982). Foi adicionado aos vírus previamente isolados em cultivo celular e titulados 0,25% de formalina. Na sequência foi realizada a mistura dos componentes com o auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa, repetindo-se até a emulsão se apresentar homogênea. Segue abaixo o Quadro 2 apresentando as quantidades de reagentes utilizados para cada vírus totalizando 2 mL de cada imunógeno. As quantidades de reagentes foram adaptadas conforme titulação viral realizada no teste de HA.

**Quadro 2.** Quadro apresentando o vírus utilizado, quantidade de vírus, de formalina, de PBS (do inglês *Phosphate Buffer Solution*) e de óleo mineral, totalizando 2 mL de cada imunógeno.

Vírus	Quantidade de vírus	Quantidade de formalina	Quantidade de PBS	Quantidade de óleo mineral
A (CPV-2/W) Acesso NCBI: M19296.1	500µl	13,5µl (0,25%)	486,5µl	1000µl
B (UCS-12/W4) Acesso NCBI: MW934264.1	500µl	13,5µl (0,25%)	486,5µl	1000µl
C (UCS-2/W1) Acesso NCBI: MW648349.1	250µl	13,5µl (0,25%)	736,5µl	1000µl

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2022

A confecção dos imunógenos era realizada no dia antecedente a sua aplicação para que fosse realizado teste de esterilidade previamente à sua aplicação. Por se tratar de três aplicações, o processo de fabricação da vacina foi realizado três vezes, todos eles seguindo os mesmos critérios de processamento.

#### 4.3.6. Teste de esterilidade com meio *Brain Heart Infusion*

O meio *Brain Heart Infusion* (BHI) HIMEDIA® foi utilizado devido a sua ampla variedade em determinar a presença de microorganismos. Após a inativação viral com formalina e inserção do óleo mineral como adjuvante para a fabricação da vacina foi ressuspenso 5 µl do produto final da vacina em cada duran contendo 100 mL de meio BHI previamente autoclavado. O duran foi colocado em uma estufa a 37°C onde permanecia durante 24 horas. Após 24 horas era avaliada a presença de turbidez. Em todas as semanas, no dia antecedente à aplicação dos ratos, era realizada a fabricação de uma nova vacina e eram inseridos os 5 µl do produto final da vacina em cada duran, contendo 100 mL de meio BHI.

#### 4.3.7. Ambiente e procedimento de vacinação dos ratos homogêneos da linhagem tipo *wistar*

Todos os ratos do estudo eram machos homogêneos da linhagem tipo *wistar* e permaneciam em caixas de aproximadamente 22 cm x 40 cm. O “n” de cada grupo incluía 5 animais, sendo que três deles permaneceram em uma caixa e dois em outra, a fim de manter somente os animais que recebiam a mesma vacina, agrupados em cada caixa. Os animais recebiam comida e bebida *ad libitum* e a temperatura do ambiente era controlada para a espécie, permanecendo em torno de 22°C (Figura 7).

**Figura 7.** Local em que os animais permaneceram durante o estudo.



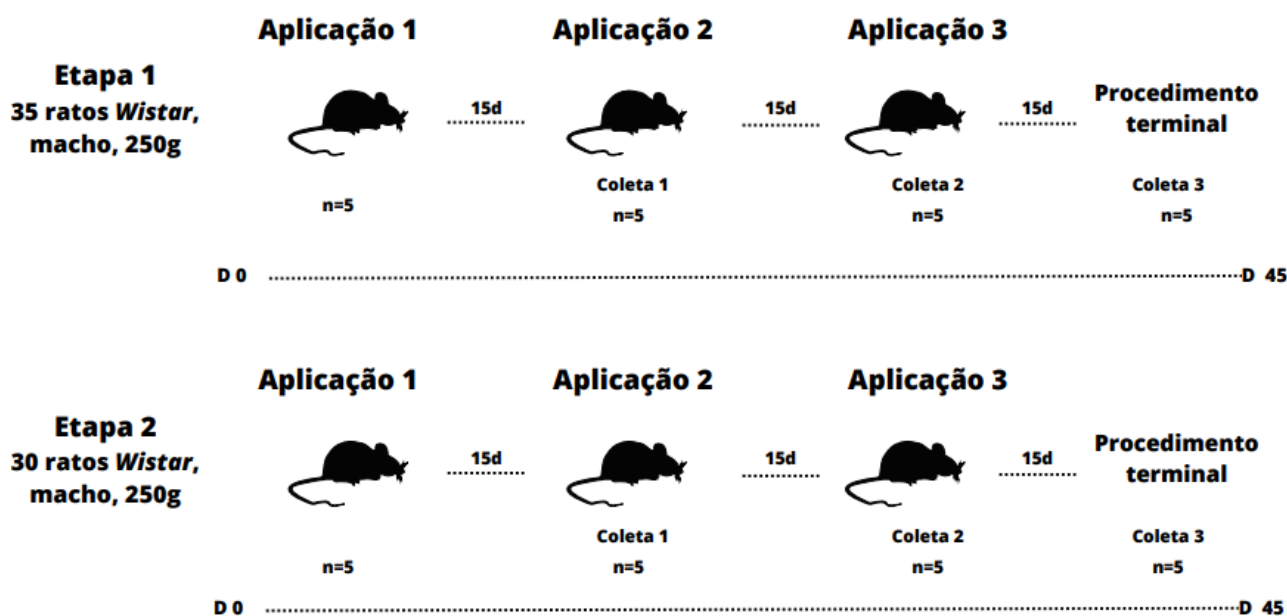
Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Com relação ao protocolo vacinal determinado optou-se pela aplicação de doses com intervalo de 15 dias entre elas. Destes, 40 ratos (8 grupos) receberam as vacinas nacionais e internacionais adquiridas de estabelecimentos da Região Sul do Brasil, sendo 5 ratos para cada tipo de vacina, totalizando-se 8 vacinas. Em outros 15 ratos (3 grupos) foram produzidas vacinas experimentais de cepas de campo através de amostras de suabe retal de caninos positivos para parvovirose canina no “*teste rápido*”, provindas de clínicas parceiras da região da serra gaúcha e por fim foram utilizados 10 ratos de grupo controle (5 para cada etapa). Os procedimentos foram realizados em duas etapas. Em um primeiro momento (etapa 1) foi realizado o procedimento

com um total de 35 ratos, em um segundo momento (etapa 2) foi realizado o experimento com um total de 30 ratos. A Figura 8 representa o delineamento do protocolo das aplicações e coletas realizadas.

Os ratos receberam 0,2 mL via intraperitoneal das vacinas nacionais e internacionais disponíveis em estabelecimentos comerciais e 0,2 mL via subcutânea da vacina experimental, realizada a partir de cepas de campo. Em todas as etapas foram armazenadas a -20°C alíquotas, contendo 200 µl da solução das vacinas para ser realizada a extração do DNA a fim de realizar a quantificação das mesmas através do método de qPCR.

**Figura 8.** Esquema representando o protocolo utilizado.



Fonte: Elaborado pela própria autora (Plataforma Canva, 2023).

#### 4.3.1 Procedimentos anestésicos, manuseio e formas de coleta

A contenção foi realizada pelo médico veterinário responsável técnico pelo biotério e por profissionais capacitados que trabalham no local. Foi realizado um curso prévio para ser obtido o treinamento de procedimentos anestésicos adequados, manuseio e formas de coleta destes animais para a realização de imobilização e contenção, tanto para fins da aplicação das vacinas quanto para fins de coleta de sangue. Os ratos foram imobilizados de forma gentil, porém agindo-se firmemente sobre o seu dorso e a caixa torácica, sendo a cabeça segurada com o polegar com o auxílio do dedo indicador, imediatamente atrás da mandíbula para realização da

aplicação das vacinas (Figura 9A), com seus determinados intervalos de tempo. Para a coleta de sangue era realizada a mesma forma de contenção e os animais, insensibilizados com isoflurano (Figura 9B), permaneciam em decúbito ventral para que fosse realizada a punção da veia gengival dos animais (Figura 9C). Para cada coleta foi utilizada anestesia inalatória com isoflurano, a fim de evitar dor e desconforto dos animais. Na última coleta foi realizada a sobredosagem de anestesia inalatória destes animais, a fim de promover a eutanásia e ser realizada a punção cardíaca para procedimento terminal, sendo esta, a última coleta. Os devidos protocolos foram realizados conforme descrito por Paiva et al. (2005).

**Figura 9A.** Aplicação intraperitoneal de vacina comercial em rato da linhagem *wistar*.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

**Figura 9B.** Animal sendo anestesiado através de anestesia inalatória com isoflurano.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

**Figura 9C.** Coleta de sangue realizada através da veia gengival com o rato da linhagem *wistar*, previamente insensibilizado com isoflurano.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.



#### **4.3.8. Armazenamento das amostras**

As amostras de sangue coletadas foram inseridas em tubo sem anticoagulantes e permaneceram de forma vertical durante 1 hora, a fim de retrain o coágulo previamente à centrifugação. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 8 minutos. Foi removido o sobrenadante e armazenado à -20°C para realização dos testes em sequência.

#### **4.3.9. Preparo do soro dos ratos (inativação do soro)**

Foram aliqotados 600 µl de cada amostra (65 soros) e inseridos em eppendorfs com as suas respectivas identificações. Os 65 eppendorfs, contendo 600 µl, foram inseridos em bloco térmico a 56°C, durante 30 minutos, para ser realizada a inativação, a fim de evitar a interferência do sistema complemento na reação.

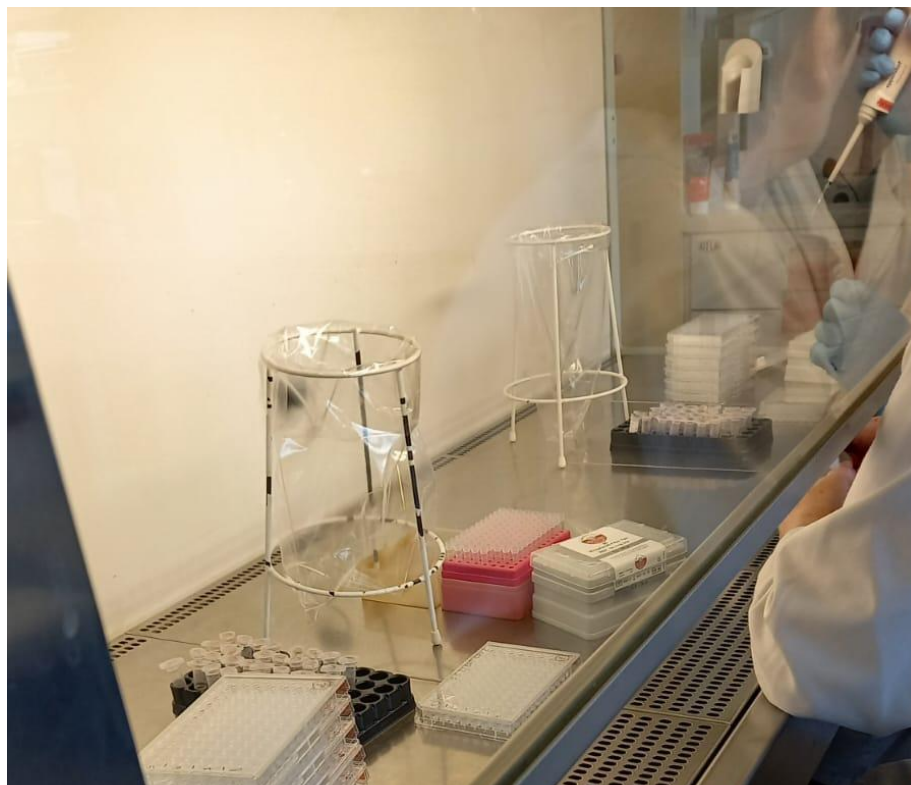
#### **4.3.10. Pesquisa de anticorpos neutralizantes**

Os 60 soros obtidos foram encaminhados para a Universidade de Leipzig, Alemanha, para a realização da técnica de virusneutralização (VN) a fim de ser avaliada a presença de anticorpos neutralizantes através de imunofluorescência.

As amostras foram submetidas a VN em duplicata, com diluição 1:20 até 40.960. No dia antecedente do experimento foram preparadas placas contendo  $1 \times 10^4$  células/mL (CFRK e DMEM 10%). Após 24 horas foi realizada a observação de 60-70% de confluência. O vírus utilizado foi o CPV-2 cepa 265, o qual foi diluído em 1:500. Em seguida, todos os soros diluídos (1:20) foram homogeneizados e inseridos 6 µL em cada poço e diluídos serialmente em base 2, em duplicata. Por fim, foi adicionado 60 µL do vírus diluído em cada poço. Também foi realizada uma placa controle a fim de validar o experimento, contendo o controle positivo utilizando-se um soro previamente titulado com anticorpos anti-CPV e um controle negativo, com um soro previamente avaliado que não apresentava anticorpos anti-CPV, ambos em duplicata. Adicionalmente, também foi realizada a titulação viral (utilizando a cepa 265 de CPV-2) em duplicata a fim de avaliar a sua força com o vírus puro e outra contendo somente o vírus diluído 1:500, também em duplicata realizando-se diluições seriadas. As placas permaneceram incubadas durante 6 dias à 37°C até a realização da imunofluorescência. As amostras foram consideradas sororreagentes quando promoveram neutralização de TCDI 100. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da maior diluição em que foi

verificada a neutralização viral, e o título final foi resultante da média dos títulos encontrados nas duplicatas (Figura 10).

**Figura 10.** Técnica de vírusneutralização (VN) realizada na Universidade de Leipzig, Alemanha.



Fonte: Tamiris Lopes, 2023 (Universidade de Leipzig, Alemanha)

#### **4.3.11. Extração do DNA com sílica a partir das amostras das vacinas e PCR em tempo real (qPCR)**

Em cada aplicação era realizado o armazenamento de uma alíquota do produto final de cada vacina, tanto das comerciais quanto das experimentais, para a realização da extração do DNA dessas amostras a fim de ser realizada a técnica de PCR em tempo real para quantificar o DNA de cada uma delas possibilitando correlacionar com os resultados da VN. O DNA total foi extraído com sílica, utilizando-se kit comercial (NewGene® SIMBIOS Biotecnologia), seguindo recomendações do fabricante para posteriormente submeter ao teste de PCR.

As reações de PCR foram realizadas em duplicata a fim de ser feita a média dos resultados obtidos. A reação de qPCR ocorreu com os *primers* For 5'TGGAAGTAGTGACACCAA3' (número de posições nucleotídica 3456-3473, de acordo com as cepas de parvovírus canino de referência CPV-N, GenBank número de acesso M19296): Rev 5'AAATGGTGGTAAGCCCAATG3'(3636-655): e uma sonda

5'CAGGTGATGAATTTGCTACAGG3'(3555-3576). O volume total da reação foi de 14 µl dos quais 9 µl corresponde à GoTaq®, Hot Start Master Mixes: 0,25 µl de primers Rev e For, respectivamente (ambos a 5 pmol) e 0,25 µl de sonda (5 pmol). O Rox (CXR - Dye - PROMEGA®) foi utilizado como corante de referência, sendo acrescido volume de 0,25 µl por reação. Por fim, foram adicionados 2 µl do DNA viral extraído. Como condições termométricas, estabeleceu-se a temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, precedidos de 38 ciclos de desnaturação em 95° C por 40 ciclos, hibridização à 56° C por 30s, seguido da etapa final de extensão a 72° C por 30s.

Os resultados foram expressos em número de cópia por mL e na sequência os resultados obtidos na qPCR foram correlacionados com a virusneutralização através do teste de correlação de Spearman pelo Software JASP Team Version 0.17.2 2023 a fim determinar se os frascos que continham maior quantidade de DNA estavam relacionados à maior virusneutralização.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE DAS CEPAS DE CAMPO DE CPV-2

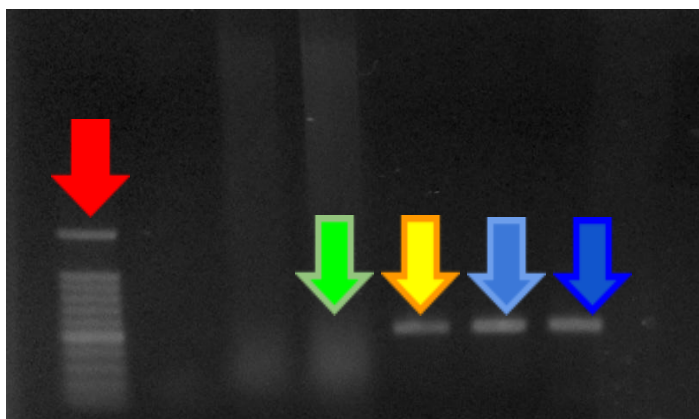
#### 5.1.1. Amostras de campo

Foram recebidas 32 amostras de caninos positivos para parvovirose canina no teste rápido das clínicas parceiras da região da serra gaúcha e região metropolitana de Porto Alegre. Das fichas de anamnese preenchidas os animais apresentavam sinais clínicos como êmese, hematoquezia, apatia e anorexia e não apresentavam protocolo vacinal completo em seu histórico clínico.

#### 5.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Na técnica de PCR convencional somente 14 das 32 amostras amplificaram nos *primers* 555', H' e M' para parvovirose canina tipo 2. Com relação à localização das amostras que amplificaram, sete destas amostras são da região metropolitana de Porto Alegre, três de Bento Gonçalves e quatro de Caxias do Sul. A Figura 11 representa a amplificação das amostras em gel de agarose sempre utilizando-se um marcador de peso molecular a fim de avaliar os pares de base amplificados de acordo com os primers utilizados, um controle negativo (seta verde) e um controle positivo (seta amarela). Estas amostras permanecem armazenadas no LDMV/UCS para a realização das próximas análises, como o sequenciamento genético e análise molecular.

**Figura 11.** Gel de agarose após coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta. A seta vermelha representa o marcador de peso molecular e as setas azuis indicam as amostras em que o DNA alvo (primer 555' proteína VP2 do parvovírus canino) foi amplificado.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

## 5.2. ANÁLISE MOLECULAR E ESTRUTURAL DE CEPAS DE CAMPO DE CPV-2 E VACINAS COMERCIAIS

Do total das 79 sequências inseridas no alinhamento realizado no programa MEGA11, 70 eram amostras de cepas de parvovírus canino isoladas no Brasil, oito sequências eram de vacinas comerciais nacionais e importadas e estas foram alinhadas em conjunto com a cepa ancestral (M19296.1), cujo foi utilizada para a determinação das alterações entre os aminoácidos e seus respectivos sítios. Com relação às regiões do Brasil cinquenta e cinco destas amostras estavam localizadas na Região Sul, quatro na Região Norte, uma na Região Centro-oeste e onze destas amostras não apresentaram esta informação. Os resultados das cepas circulantes estão detalhados conforme a cidade no Quadro 3 em que observa-se os seguintes resultados: Ananindeua n=4 (4/4 CPV-2b); Caxias do Sul n= 24 (21/24 CPV-2a; 3/24 CPV-2c); Cuiabá n=1 (1/1 CPV-2c); Parobé n=1 (1/1 CPV-2c), Porto Alegre n=21 (8/21 CPV-2a; 1/21 CPV-2b; 12/21 CPV-2c); Santa Maria n=8 (2/8 CPV2-a; 1/8 CPV-2b; 5/8 CPV-2c); não informado (NI) n= 11 (3/11 CPV-2b; 8/11 CPV-2c).

Todas as vacinas sequenciadas n=8 foram nomeadas como CPV-2 (8/8 CPV-2) por apresentar em seus respectivos sítios e aminoácidos os mesmos nucleotídeos que da cepa ancestral. Observou-se a predominância da circulação da variante CPV-2a (31/70) seguida de CPV-2c (30/70) e, posteriormente CPV-2b (9/70). Os resultados se apresentam detalhados no Quadro 3.

**Quadro 3.** Classificação das variantes circulantes no Brasil, realizada a partir das sequências depositadas no GenBank nos últimos 10 anos, separadas de acordo com a cidade (localização) e classificação das cepas das vacinas comerciais nacionais e importadas utilizadas no Brasil.

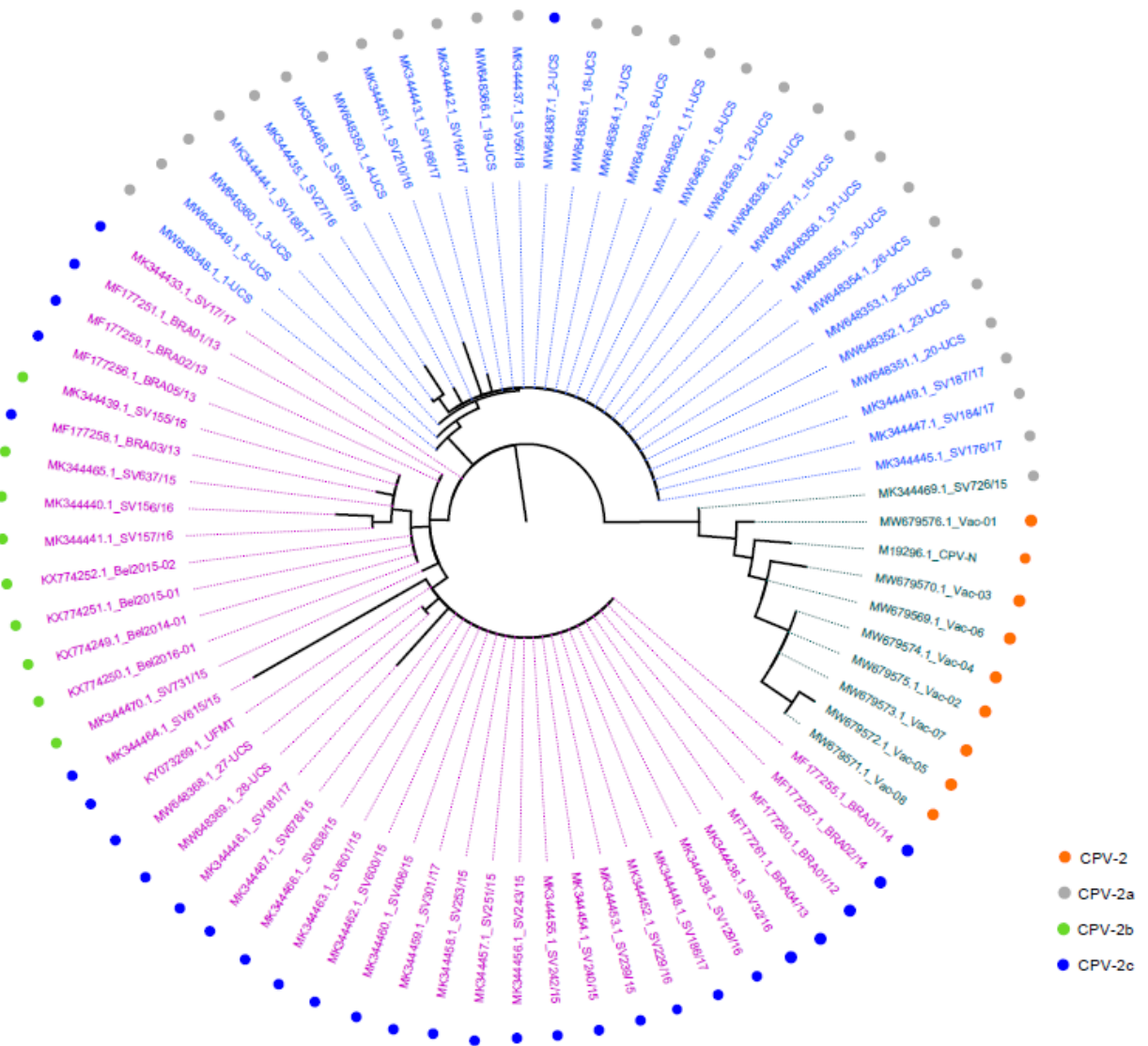
LOCALIZAÇÃO	"N" amostral	NOMENCLATURA		
		CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
Ananindeua	4	0	4	0
Caxias do Sul	24	21	0	3
Cuiabá	1	0	0	1
Parobé	1	0	0	1
Porto Alegre	21	8	1	12
Santa Maria	8	2	1	5
NI	11	0	3	8
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>31</b>	<b>9</b>	<b>30</b>

\*NI: Não informado

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

Na análise filogenética foram observados três agrupamentos em clados distintos, o G1 está em azul, G2 está em roxo e as vacinas (GVac) estão em ciano (junto da cepa ancestral). Foram inseridas as classificações das variantes ao lado de cada sequência e estão demonstradas conforme demonstrado na Figura 12.

**Figura 12.** Árvore filogenética pelo método da máxima verossimilhança (ML), envolvendo 79 sequências da proteína VP2, depositadas no GenBank nos últimos 10 anos, sendo 8 destas sequências de vacinas. Cada sequência foi identificada de acordo com o número de acessos do GenBank. Na árvore, G1 está em azul, G2 está em roxo e as vacinas (GVac) estão em ciano (junto da cepa ancestral). A história evolutiva foi inferida utilizando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo baseado na matriz JTT(JONES D.T., TAYLOR W.R., AND THORNTON J.M., 1992).



\* A nomenclatura de referência de “Vac’s” ao lado do número de acesso do GenBank não está correlacionada à nomenclatura utilizada das vacinas aplicadas nos ratos deste estudo.

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

Em seguida foram alinhadas as sequências de acordo com cada clado, separadamente, a partir da observação da árvore filogenética a fim de avaliar a percentagem de substituições dos aminoácidos e seus respectivos sítios comparados à cepa ancestral (número de acesso no GenBank: M19296.1).

**Quadro 4.** Alterações observadas no clado G1, G2 e GVac em comparação à cepa ancestral de acordo com cada sítio e seus respectivos aminoácidos.

Sítio	44	101	267	297	300	305	324	375	426	440
<b>CPV-2 M19296.1 (Referência)</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>T</b>
Sequências do clado G1	-	T (100%)	Y (100%)	A (100%)	G (100%)	Y (100%)	I (100%)	-	-	A (100%)
Sequências do clado G2	-	T (100%)	F (100%)	A (86,7%) N (13,3%)	G (100%)	Y (100%)	L (20%)	-	E (73,3%) D (26,7%)	-
Sequências do clado GVac	A (87,5%)	-	-	-	D (25%)	-	-	N (87,5%)	-	-

\* T (Treonina); I (Isoleucina); F (Felilalanina); S (Serina); A (Alanina); D (Aspartato); Y (Tirosina); L (Leucina); N (Asparagina); V (Valina); G (Glicina); E (Glutamato).

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

Desta forma, conforme apresentado no Quadro 4 foram observadas 100% de substituições, no clado G1, dos aminoácidos: I101T, F267Y, S297A, A300G, D305Y, Y324I e T440A. Já no clado G2 foram observadas 100% de substituições dos aminoácidos nos seguintes sítios: I101T, A300G e D305Y. O sítio 297 apresentou S297A (86,7%) e S97N (13,3%) e o sítio 324 apresentou 20% de alteração de Y324L. Por fim, no clado GVac observou-se as seguintes substituições dos sítios: T44A (87,5%), A300D (25%), D375N (87,5%). O Quadro 4 apresenta os aminoácidos presentes em cada sítio em seus respectivos clados comparados à cepa ancestral.

Na sequência, após a elaboração das sequências consenso, destacaram-se alterações nos sítios 44, 101, 267, 297, 300, 305, 324, 375, 426 e 440, conforme apresentadas no Quadro 5. Estas vacinas foram previamente sequenciadas e depositadas no GenBank por Lencina et al. (2023).

**Quadro 5.** Principais sítios com substituições de AA das sequências consenso.

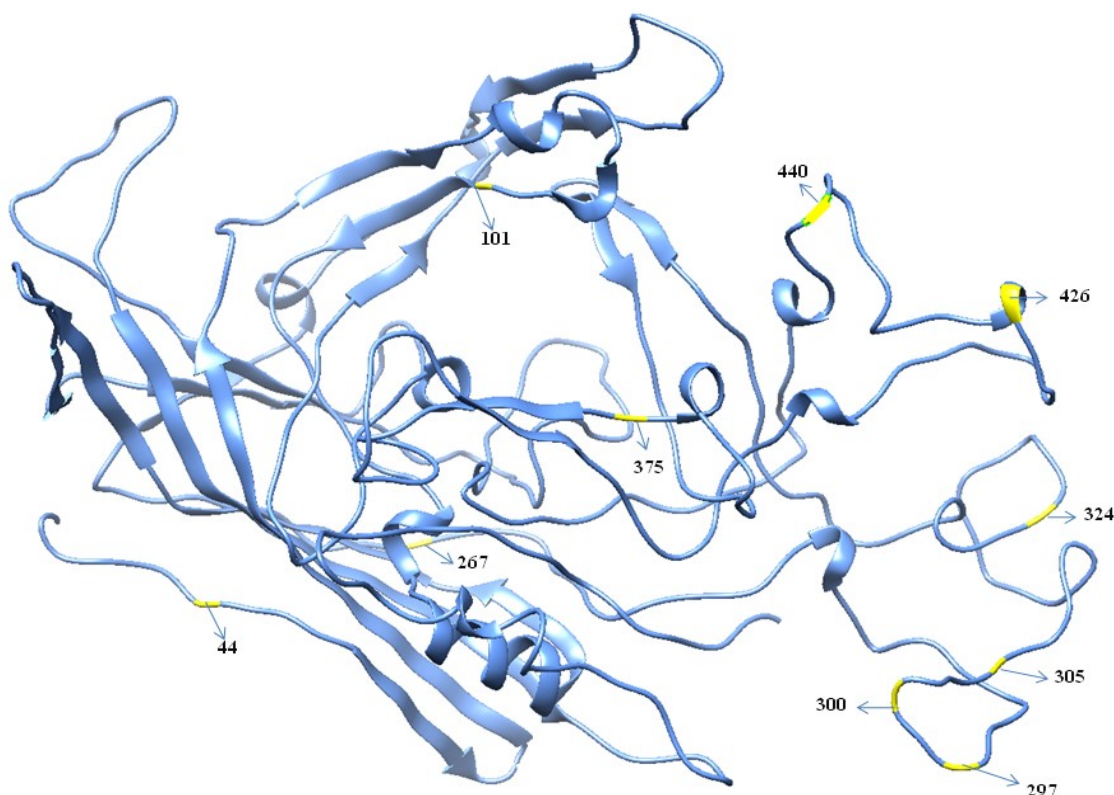
Sítio	44	101	267	297	300	305	324	375	426	440
<b>CPV-2 M19296.1 (Referência)</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>T</b>
CONSENSO G1	T	T	Y	A	G	Y	I	D	N	A
CONSENSO G2	T	T	F	A	G	Y	Y	D	E	T
CONSENSO GVac	A	I	F	S	A	D	Y	N	N	T

\* T (Treonina); I (Isoleucina); F (Felilalanina); S (Serina); A (Alanina); D (Aspartato); Y (Tirosina); N (Asparagina); G (Glicina); E (Glutamato).

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

Apesar do grupo G2 apresentar-se mais semelhante aos aminoácidos do grupo da G-Vac em seus respectivos sítios observa-se a presença do aminoácido E (glutamato) no sítio 426 do grupo G2, caracterizando-o como CPV-2c. Os sítios contendo alterações entre os aminoácidos estão apresentados Figura 13 utilizando a técnica *cartoon*, com setas indicando as respectivas numerações dos aminoácidos.

**Figura 13.** Imagem em *cartoon* da proteína VP2 (M19296-1), apresentando os principais sítios de aminoácidos substituídos. A coloração amarela indica a sua localização na proteína e a seta indica qual o sítio do aminoácido presente naquele local.

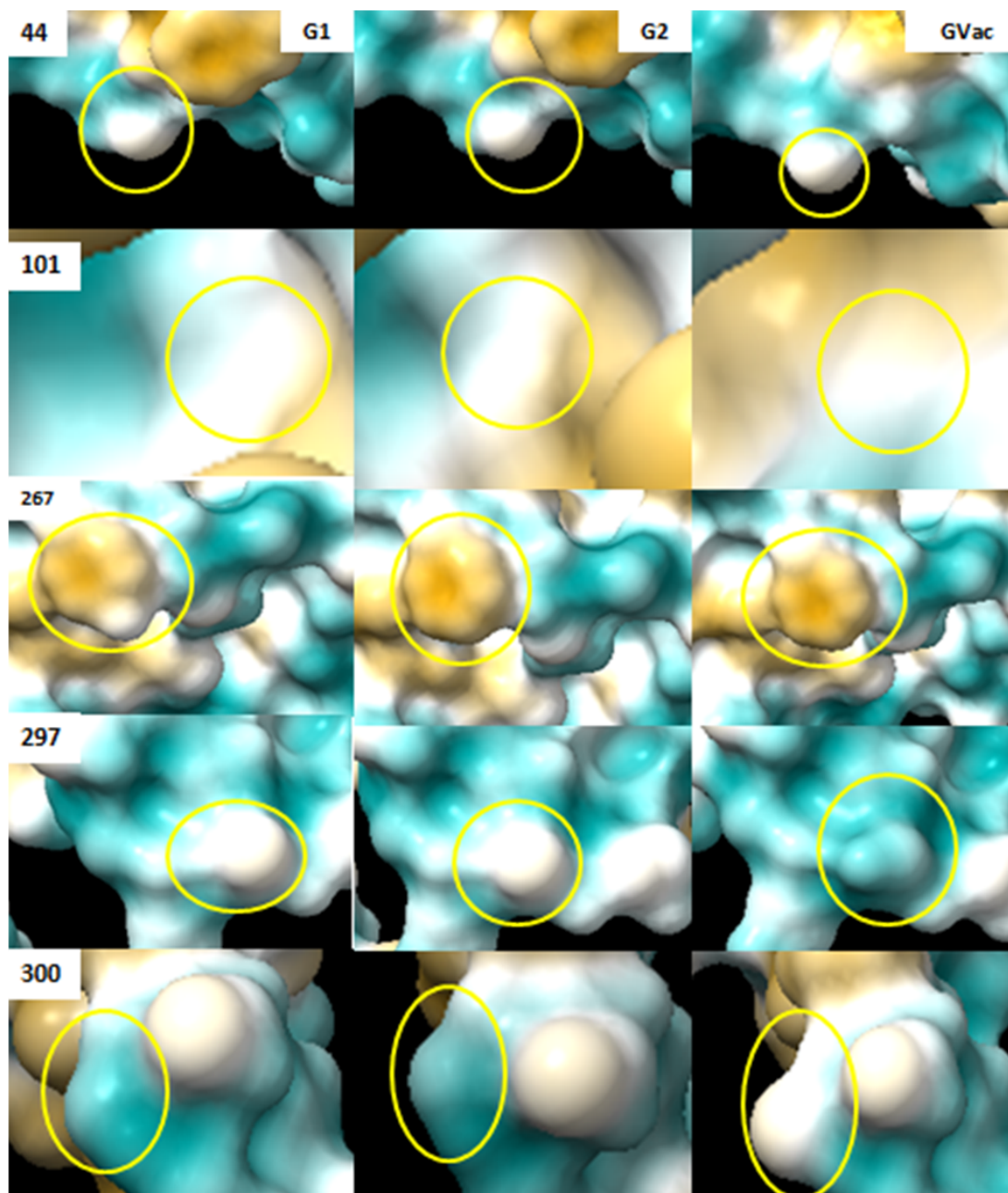


Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023 através do programa UCSF ChimeraX version: 1.6.1.

Foram observadas variações de hidrofobicidade nos aminoácidos dispostos nos sítios 44, 101, 267, 297, 300 (Figura 14), 305, 324 e 440 (Figura 15). Evidenciou-se também alterações conformacionais dos aminoácidos situados nos sítios 44, 267, 297, 300 (Figura 14), 305, 324, 375, 426 e 440 (Figura 15).



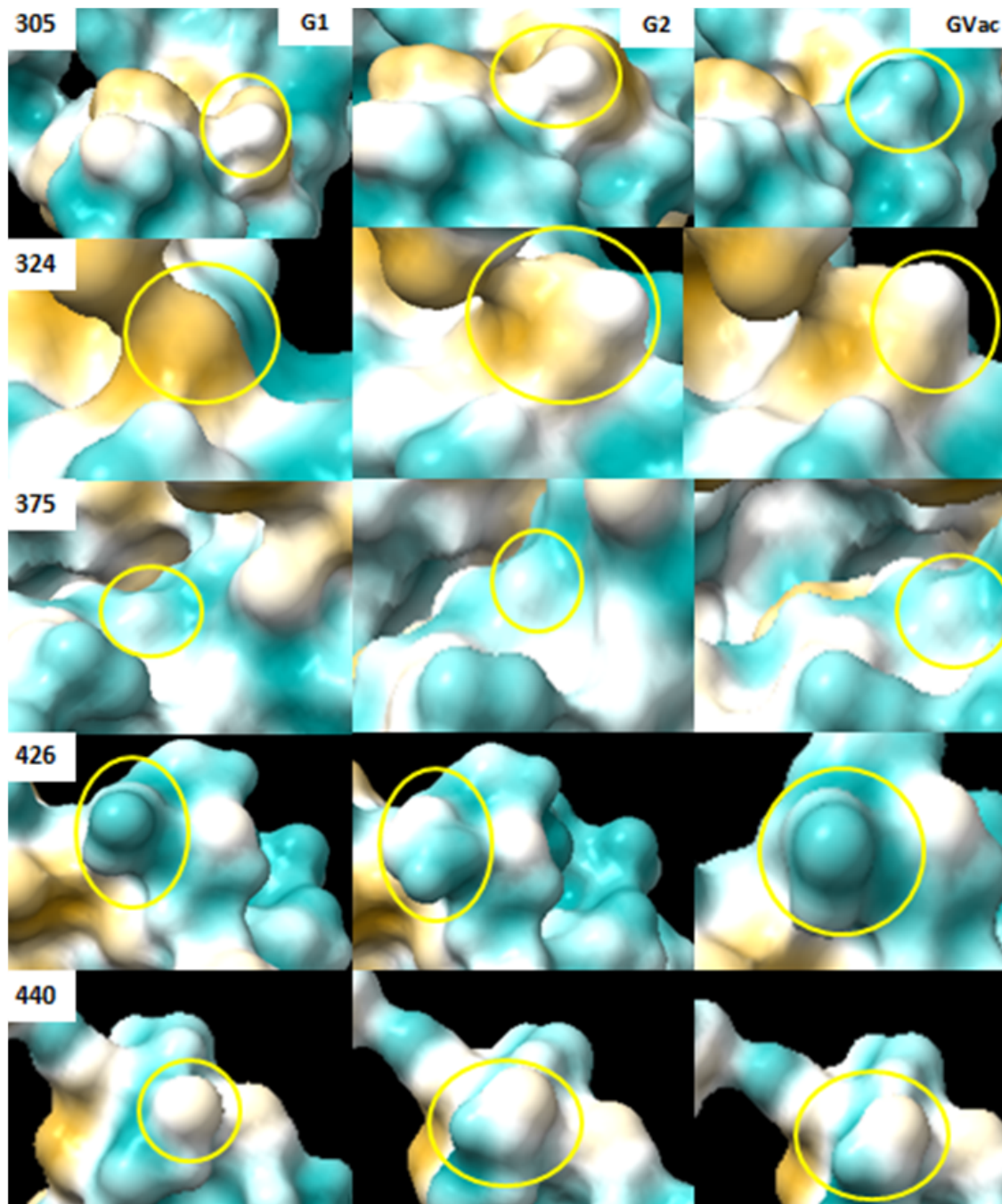
**Figura 14.** Imagem ampliada referente à análise de hidrofobicidade dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (44, 101, 267, 297 e 300) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente.



\*O azul representa os resíduos mais polares, o vermelho alaranjado os mais hidrofóbicos e o branco exibe a polaridade intermediária.

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023 através do programa UCSF ChimeraX version: 1.6.1

**Figura 15.** Imagem ampliada referente à análise de hidrofobicidade dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (305, 324, 375, 426 e 440) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente.

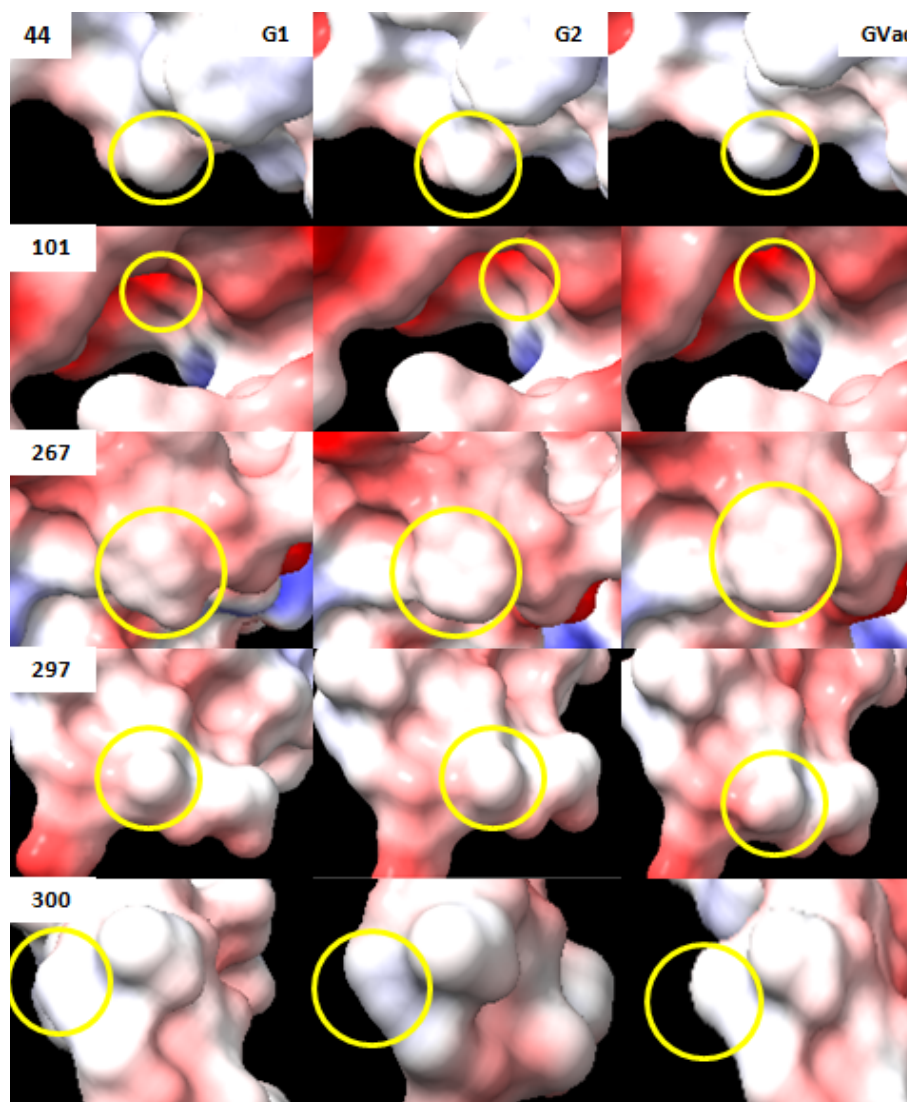


\*O azul representa os resíduos mais polares, o vermelho alaranjado os mais hidrofóbicos e o branco exibe a polaridade intermediária.

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023 através do programa UCSF ChimeraX version: 1.6.1

Foram observadas variações de cargas nos aminoácidos 300 (Figura 16), 305, 324, 375 e 426 (Figura 17). Evidenciou-se também alterações conformacionais dos aminoácidos situados nos sítios 44, 267, 297, 300, (Figura 16) 305, 324, 375, 426 e 440 (Figura 17).

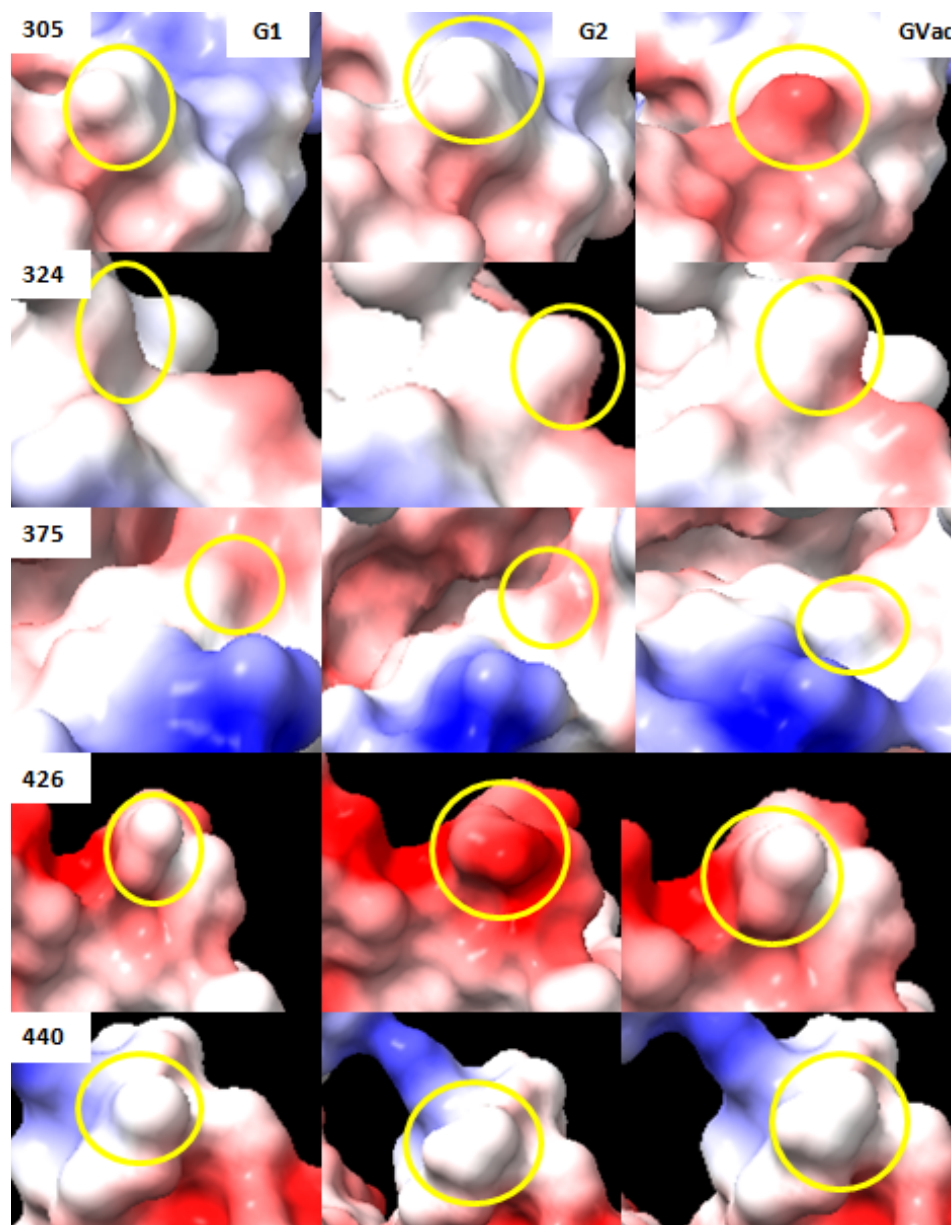
**Figura 16.** Imagem ampliada referente aos pontos eletrostáticos dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (44, 101, 267, 297 e 300) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente. Em azul representa-se carga positiva e em vermelho cargas com potencial eletrostático negativo.



\* O azul representa carga positiva, o vermelho carga negativa e o branco exibe carga neutra, onde o vermelho representa 284 (kcal/mol), o branco é 0 (kcal/mol) e o azul é 10 (kcal/mol).

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023 através do programa UCSF ChimeraX version: 1.6.1

**Figura 17.** Imagem ampliada referente aos pontos eletrostáticos dos respectivos sítios com substituições dos aminoácidos (305, 324, 375, 426 e 440) entre as sequências consenso G1, G2 e GVac da proteína VP2 . O círculo em amarelo indica a sua localização do sítio na proteína. A nomenclatura indicada na coluna superior direita indica o grupo correspondente às imagens e no canto superior esquerdo de cada linha indica o sítio correspondente. Em azul representa-se carga positiva e em vermelho cargas cargas com potencial eletrostático negativo.



\* O azul representa carga positiva, o vermelho carga negativa e o branco exibe carga neutra, onde o vermelho representa 284 (kcal/mol), o branco é 0 (kcal/mol) e o azul é 10 (kcal/mol).

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023 através do programa UCSF ChimeraX version: 1.6.1

Após observar as imagens projetadas no *software* ChimeraX 1.6.1 e visualizadas importantes alterações em pontos eletrostáticos e hidrofobicidade das proteínas, a ferramenta HOPE (do inglês *Have yOur Protein Explained*) constatou que as substituições T44A, I101T,

F267Y, D297A/N, A300G, D305Y, T324I/L e T440A apresentam alterações de hidrofobicidade e que as alterações A300D, D305Y, D375N e N426E apresentam alterações de carga.

As substituições T44A e T440A apresentam em seu resíduo original maior hidrofobicidade quando comparado a cepa ancestral, desta forma, observa-se a perda da hidroxila. Com relação à alteração I101T o resíduo da cepa ancestral é mais hidrofóbico do que o resíduo mutante, com a presença de hidroxila. Na alteração F267Y o resíduo da cepa ancestral é mais hidrofóbico do que o resíduo mutante. Na substituição D297A o resíduo mutante é mais hidrofóbico do que o resíduo da cepa ancestral; já na alteração S297N o resíduo da cepa ancestral é mais hidrofóbico do que o resíduo mutante. Na substituição A300G o resíduo do tipo da cepa ancestral é mais hidrofóbico do que o resíduo mutante. Nas alterações D305Y e T324I/L o resíduo mutante apresenta-se mais hidrofóbico do que o resíduo da cepa ancestral

Além disso foi possível observar alterações de carga nas seguintes substituições: A300D, D305Y, D375N e N426E. Na substituição A300D o resíduo mutante apresenta uma carga negativa e o resíduo da cepa ancestral demonstra uma carga neutra. A substituição D305Y demonstra que a carga do resíduo da cepa ancestral era negativa e a carga do resíduo mutante é neutra. Na substituição D375N a carga do resíduo da cepa ancestral é negativa e a carga do resíduo mutante, neutra. Já na modificação N426E a carga do resíduo da cepa ancestral era neutra e a carga do resíduo mutante apresentava-se negativa. O Quadro 6 apresenta todas as alterações de polaridades observadas entre os sítios, comparando-os com a cepa ancestral (Acesso no GenBank: M19296.1). A Figura 18 é o esquema das estruturas dos aminoácidos originais (à esquerda) e mutantes (à direita) a fim de se observar as alterações entre a cepa ancestral e a mutante.

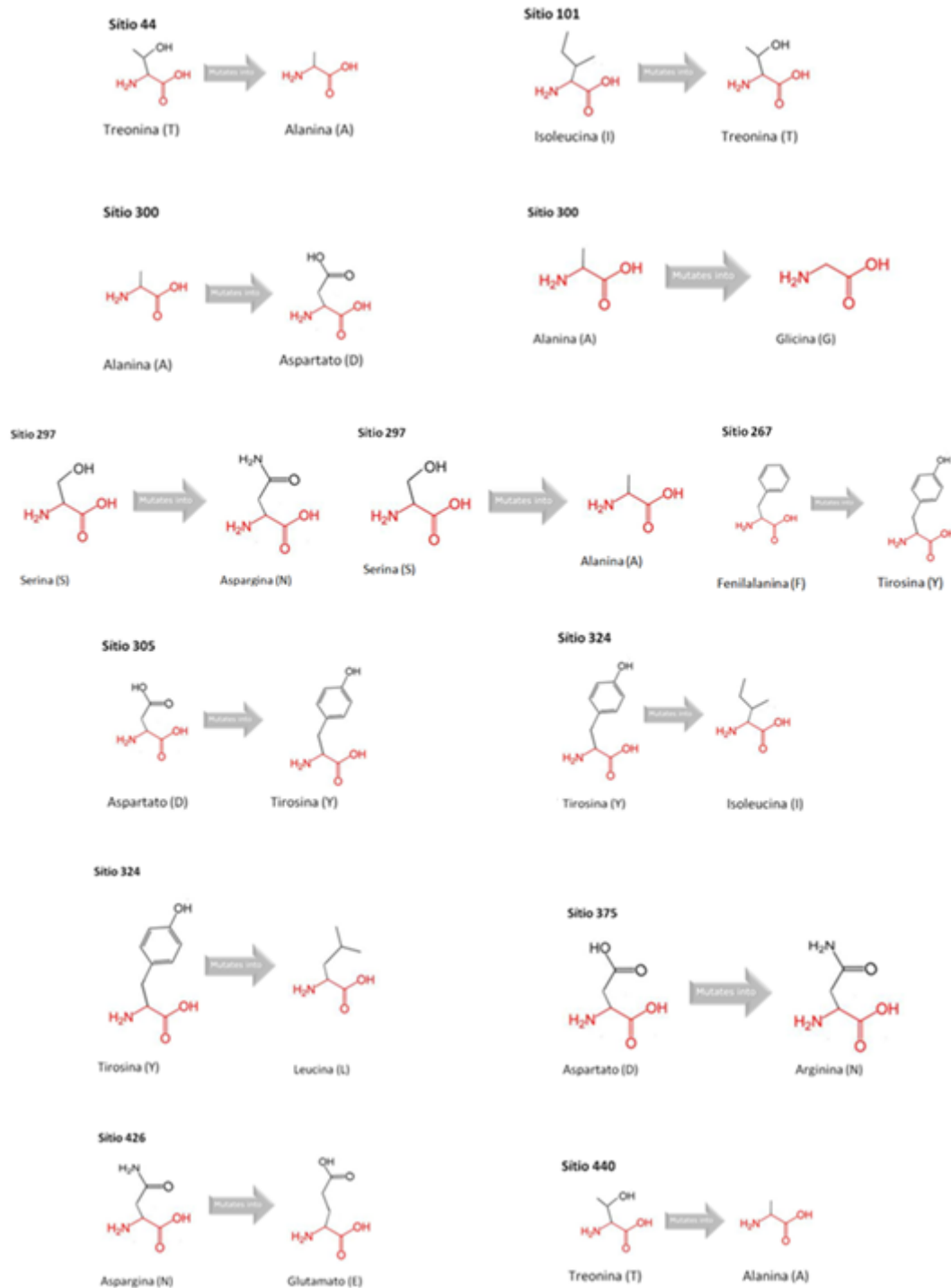
**Quadro 6.** Alterações de polaridade observadas a partir das sequências consenso após a substituição dos aminoácidos comparados à cepa ancestral CPV-2 (Acesso no GenBank: M19296.1).

Sítio	44	101	267	297	300	305	324	375	426	440
CPV-2 M19296.1 (Cepa referência)	<b>T: POLAR NEUTRO</b>	<b>I: APOLAR</b>	<b>F: APOLAR</b>	<b>S: POLAR NEUTRO</b>	<b>A: APOLAR</b>	<b>D: POLAR CARREGADO</b>	<b>Y: POLAR NEUTRO</b>	<b>D: POLAR NEUTRO</b>	<b>N: POLAR NEUTRO</b>	<b>T: POLAR NEUTRO</b>
Alterações de aminoácidos observadas	A: APOLAR	T: POLAR NEUTRO	Y: POLAR NEUTRO	A: APOLAR N: POLAR NEUTRO	D/G: POLAR CARREGADO	Y: POLAR NEUTRO	I/L: APOLAR	N: POLAR	E: POLAR CARREGADO	A: APOLAR
Substituições	<b>T44A</b>	<b>I101T</b>	<b>F267Y</b>	<b>S297A/N</b>	<b>A300D/G</b>	<b>D305Y</b>	<b>Y324I/L</b>	<b>D375N</b>	<b>N426E</b>	<b>T440A</b>

\* T (Treonina/Polar neutro); I (Isoleucina/Apolar); F (Fenilalanina/Apolar); S (Serina/Polar neutro); A (Alanina/Apolar); D (Aspartato/Polar carregado); Y (Tirosina/Polar neutro); N (Asparagina/Polar); G (Glicina/Apolar); E (Glutamato/Polar carregado).

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

**Figura 18.** A figura apresenta as estruturas esquemáticas dos aminoácidos originais (à esquerda) e mutantes (à direita) e seus respectivos sítios. A espinha dorsal, que é a mesma para cada aminoácido, é colorida de vermelho. A cadeia lateral, única para cada aminoácido, é colorida de preto.



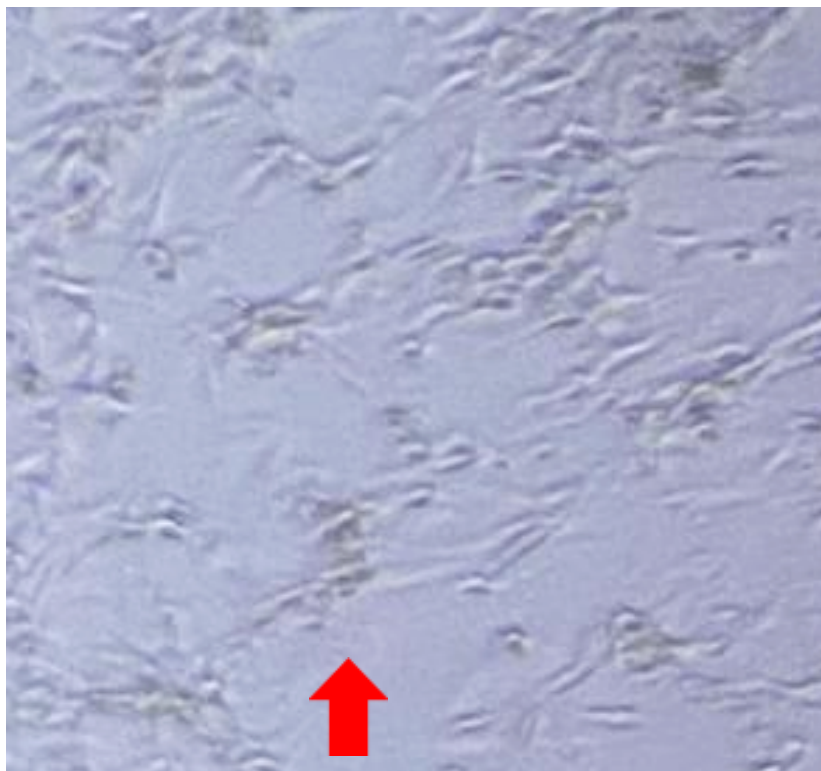
Fonte: Resultados obtidos na plataforma HOPE (do inglês *Have yOur Protein Explained*), 2023

### 5.3. ANÁLISE DE EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS E CEPAS DE CAMPO DE CPV-2

#### 5.3.1. Cultivo viral

Foram observados efeitos citopáticos nas células da linhagem CFRK, após 72 horas da introdução dos vírus utilizados para a fabricação da vacina experimental e também do controle positivo. A seta vermelha indica espaços entre as células, caracterizando morte celular (apoptose) (Figura 19). O controle negativo apresentou 80% de confluência das células cultivadas.

**Figura 19.** Observação de efeito citopático 72 horas após a inserção do vírus na célula de linhagem CFRK. A seta vermelha indica espaços entre as células, caracterizando morte celular (apoptose).

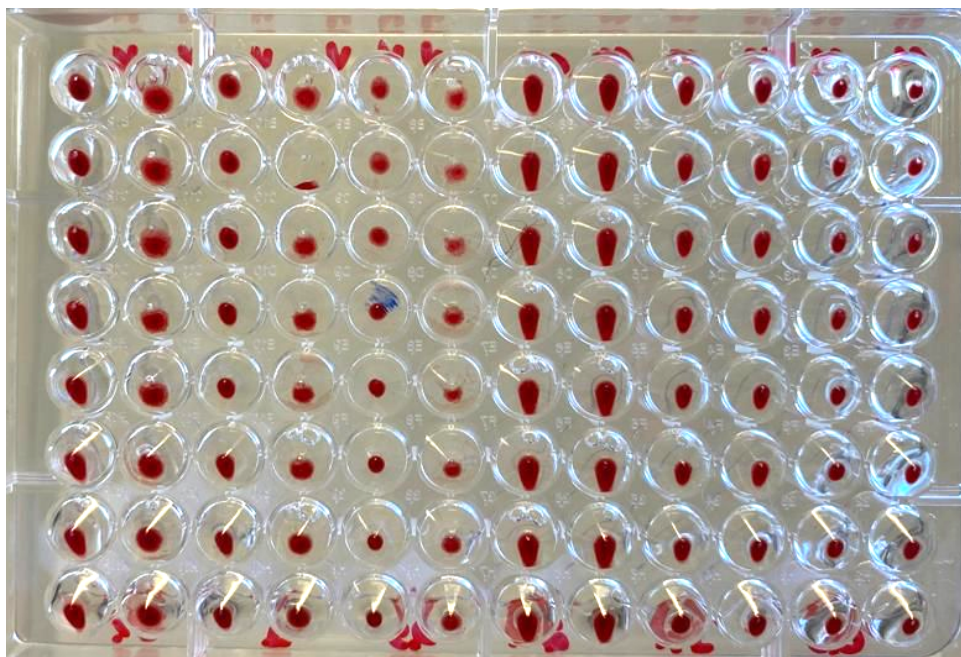


Fonte: Arquivo pessoal, 2022

#### 5.3.2. Teste de Hemaglutinação (HA)

Leitura do HA realizado após 16 horas das amostras incubadas a 4°C, sendo o título de HA apresentado na Figura 20 expresso como o recíproco da maior diluição de antígeno. Seus respectivos resultados estão representados no Quadro 7.

**Figura 20.** Imagem representativa do teste de hemaglutinação (HA), realizado após o isolamento do vírus em cultivo celular a fim de determinar a quantidade de unidades hemaglutinantes (UHA) presente em cada amostra. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

**Quadro 7.** Resultado do teste de hemaglutinação dos vírus utilizados para a fabricação da vacina experimental.

<b>Vírus</b>	<b>Titulação HA</b>
A CPV-2 Acesso NCBI: M19296.1	1 : 16.384
B UCS-12 Acesso NCBI: MW934264.1	1 : 16.384
C UCS-2 Acesso NCBI: MW648349.1	1 : 32.768

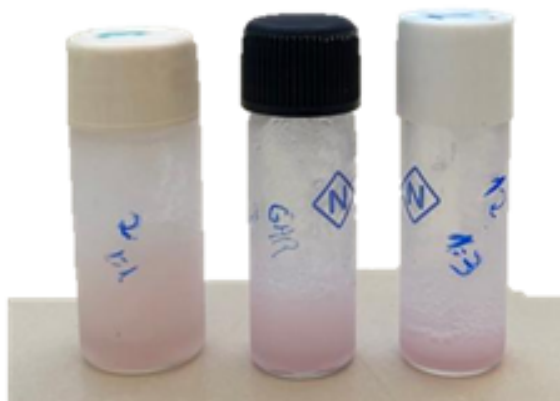
Fonte: Arquivo pessoal, 2022.



### 5.3.3. Inativação com formalina e óleo mineral como adjuvante

Nas três vezes que procedeu-se ao processo de homogeneização das vacinas os resultados foram satisfatórios. A imagem representando o produto final da vacina experimental está apresentada na Figura 21.

**Figura 21.** Produto final da vacina experimental contendo o vírus isolado em cultivo celular, inativado com formalina e óleo mineral como adjuvante.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

### 5.3.4. Teste de esterilidade com meio *Brain Heart Infusion* (BHI)

Em nenhuma das três vezes observou-se a presença de turbidez, descartando-se contaminação de microorganismos nas amostras das vacinas experimentais.

### 5.3.5. Procedimentos e manuseios realizados

O manuseio e procedimento dos ratos da linhagem tipo *wistar* foram considerados satisfatórios visto que foi realizada a coleta de todos os animais, obtendo-se a quantidade de soro necessária para a realização das próximas análises.

### 5.3.6. Pesquisa de anticorpos neutralizantes

Os resultados do teste de virusneutralização (VN) e imunofluorescência estão representados no Quadro 8 e Quadro 9 de acordo com os respectivos grupos e resultados de cada vacina. Também foi realizada análise estatística da média, desvio padrão, valor mínimo e máximo de cada grupo de vacina (n=5), através do software JASP Team 0.17.2 (2023), demonstrados na Tabela 1 e a distribuição em Boxplot dos resultados obtidos através da VN e imunofluorescência.

**Quadro 8.** Apresentação dos resultados obtidos a partir do teste de VN com Imunofluorescência dos soros obtidos da coleta do procedimento terminal dos ratos da linhagem tipo *wistar* incluindo os grupos *Vac1*, *Vac2*, *Vac3*, *Vac4* e *Vac5*.

Grupo das vacinas	VN	Grupo das vacinas	VN
VAC1	1:640	VAC2	1:1280
VAC1	1:320	VAC2	1:320
VAC1	1:640	VAC2	1:640
VAC1	1:320	VAC2	1:160
VAC1	1:640	VAC2	1:640
Grupo das vacinas	VN	Grupo das vacinas	VN
VAC3	1:80	VAC4	0
VAC3	1:640	VAC4	0
VAC3	1:640	VAC4	0
VAC3	1:160	VAC4	1:80
VAC3	1:1280	VAC4	0
Grupo das vacinas	VN	Grupo das vacinas	VN
VAC5	1:1280	VAC6	1:160
VAC5	1:1280	VAC6	0
VAC5	1:640	VAC6	1:640
VAC5	1:1280	VAC6	1:160
VAC5	1:640	VAC6	1:80

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

**Quadro 9.** Apresentação dos resultados obtidos a partir do teste de VN com Imunofluorescência dos soros obtidos da coleta do procedimento terminal dos ratos da linhagem tipo *wistar* incluindo os grupos *Vac7*, *Vac8*, *UCS2*, *UCS12*, *CPV2* e *Grupo controle*.

Grupo das vacinas	VN	Grupo das vacinas	VN
VAC7	1:40	VAC8	1:160
VAC7	1:160	VAC8	1:640
VAC7	1:20	VAC8	1:640
VAC7	0	VAC8	1:160
VAC7	0	VAC8	1:160
Grupo das vacinas	VN	Grupo das vacinas	VN
UCS2	1:320	UCS12	1:80
UCS2	1:20	UCS12	1:80
UCS2	1:160	UCS12	1:160
UCS2	1:80	UCS12	1:160
UCS2	1:320	UCS12	1:160
Grupo das vacinas	VN	Grupo das vacinas	VN
CPV2	1:640	Controle	0
CPV2	1:160	Controle	0
CPV2	1:160	Controle	0
CPV2	1:160	Controle	0
CPV2	1:320	Controle	0

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2023

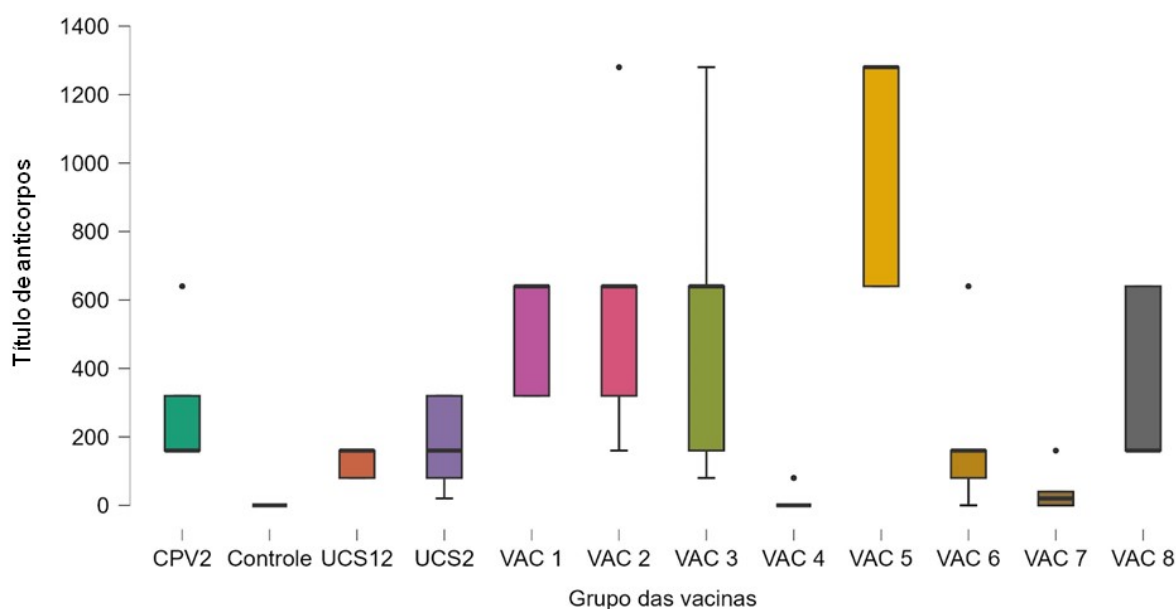
**Tabela 1.** Tabela apresentando o N amostral de cada grupo (n=5) exibindo os resultados da moda, média, mediana e desvio padrão do teste de VN das amostras do soro dos ratos da linhagem *wistar*, imunizados com as oito vacinas comerciais, três vacinas experimentais e o grupo controle contra TCDI 100 submetidos à cepa 265:CPV-2.

	GRUPOS E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES											
	Vac1	Vac2	Vac3	Vac4	Vac5	Vac6	Vac7	Vac8	CPV-2	UCS12	UCS2	Controle
<b>N amostral</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Média</b>	22,34	23,39	21,6	1,79	31,59	11,91	4,69	17,71	12,37	11,17	16,23	0
<b>Moda</b>	25,3	25,3	25,3	0	35,78	12,65	0	12,65	17,89	12,65	12,65	0
<b>Mediana</b>	25,3	25,3	25,3	0	35,78	12,65	4,48	12,65	12,65	12,65	12,65	0
<b>Desvio Padrão</b>	4,06	8,76	10,83	4	5,74	9,1	5,25	6,93	5,82	2,03	5,56	0

\*Os valores foram reduzidos em  $\log_2$

**Fonte:** Elaborado pela própria autora , 2023

**Gráfico 1.** Distribuição em BoxPlot dos resultados obtidos através da virusneutralização (VN) e imunofluorescência submetidos ao vírus 265:CPV-2 utilizando os soros coletados no procedimento terminal dos 60 ratos da linhagem *wistar*; após aplicação das três doses das vacinas comerciais nacionais e importadas comercializadas no Brasil e as vacinas experimentais realizadas. A linha mais baixa representa o resultado mais baixo, a linha mais alta representa o resultado mais alto, a linha do meio representa a mediana, o quartil inferior mostra a mediana da metade inferior do conjunto de dados e o quartil superior à mediana da metade superior do conjunto de dados. Os pontos pretos representam os outliers.



Fonte: Elaborado pela própria autora, JASP Team (2023). JASP (Version 0.17.2) [Computer software], 2023.

#### **5.4. Correlação de Spearman do resultado da análise de Virusneutralização e qPCR das amostras provenientes das vacinas**

A realização da análise de correlação de Spearman entre as variáveis quantitativas da virusneutralização e da amplificação de DNA das amostras extraídas a partir das vacinas utilizadas apresentaram  $p > 0,05$ , aceitando-se a hipótese nula, ou seja, não apresentaram significância estatística entre elas, logo, a quantidade de DNA amplificado nas amostras das vacinas aparenta não estar relacionado com a produção de anticorpos (JASP Team (2023). JASP (Version 0.17.2) [Computer software]).

## 6. DISCUSSÃO

O principal controle da parvovirose canina é realizado através da vacinação, sendo considerado importante na proteção dos caninos contra as cepas circulantes. No entanto, este vírus apresenta elevadas taxas de mutações, comparadas a vírus de RNA, observando-se substituições que conferem vantagens adaptativas (MIRANDA; THOMPSON, 2016; VOORHEES et al., 2020). Algumas pesquisas apontam que as vacinas com subtipo CPV-2 e CPV-2b estimulam a produção de anticorpos contra o CPV-2c (SPIBEY et al., 2008; WILSON et al., 2014). Em controvérsia alguns autores questionam a ocorrência de imunidade cruzada devido a relatos de CPV-2c em cães vacinados (DECARO et al., 2008a; GODDARD; LEISEWITZ, 2010; MIRANDA; THOMPSON, 2016).

Neste trabalho foram obtidas amostras de campo de CPV-2 recebidas de clínicas parceiras da região da serra gaúcha e da região metropolitana de Porto Alegre. Devido à maior casuística de a parvovirose canina ocorrer em períodos mais quentes, como no verão, foram recebidas amostras das clínicas parceiras somente no período de novembro de 2022 a março de 2023. Além disso, outro fator que impactou para a coleta destas amostras ser somente neste período foi a necessidade da aprovação prévia do CEUA, ocorrida no dia 25 de abril de 2022, que validou o projeto. Sendo assim, efetuaram-se apenas algumas etapas das amostras recebidas: extração do DNA e detecção do CPV-2, através da técnica de PCR, com os *primers* 555', H' e M', sendo selecionadas apenas as amostras que amplificaram nos três *primers*, tendo como perspectiva futura realizar o sequenciamento genético destas amostras, a fim de avaliar os principais sítios com substituições em seus aminoácidos (BUONAVOGLIA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2019).

Na sequência, foram realizadas análises através de ferramentas de bioinformática, que demonstraram a importância do monitoramento da parvovirose canina, a fim de caracterizar seu controle entre as populações suscetíveis. Em um primeiro momento efetuou-se a análise molecular das cepas de campo circulantes no Brasil, depositadas no GenBank nos últimos 10 anos, destacando-se a predominância da variante CPV-2a, seguida de CPV-2c e CPV-2b, concordando com trabalho anterior (ZHOU et al., 2017).

Em seguida foi realizada a análise filogenética, observando-se agrupamentos das cepas circulantes em três cladogramas distintos. No clado G1 notou-se predominantemente o agrupamento das variantes CPV-2a, no clado G2 observou-se tanto o agrupamento das variantes CPV-2b

quanto das CPV-2c e no clado GVac observou-se o agrupamento das vacinas comerciais junto à cepa ancestral que foi sequenciada em meados dos anos 80, cujo se apresentou distinto das cepas circulantes (REED et al., 1988).

Estudos ressaltam que as cepas utilizadas para a produção das vacinas comerciais são semelhantes ao ancestral do CPV-2, o que pode influenciar na resposta adequada de anticorpos (LENCINA et al., 2023). Desta forma foram efetuadas três sequências consenso de acordo com cada clado, para serem determinadas as principais variações entre os aminoácidos. Comparou-se as sequências consenso de cepas circulantes frente às vacinas comerciais, com a finalidade de posteriormente serem observadas variações em pontos eletrostáticos e hidrofóbicos a partir de análise estrutural das proteínas. Na análise molecular realizada entre as sequências consenso destacaram-se alterações nos sítios T44A, I101T, A300G/D, D305Y, T324I/L, D375N e N426E e T440A.

A perda da hidroxila na substituição T44A pode promover alterações externas podendo alterar a interação entre o resíduo e o seu domínio, afetando a função da proteína. A alteração I101T encontra-se em um domínio importante para a atividade da proteína. Sabe-se que o sítio 101 pode gerar consequências, como a falha de reconhecimento de anticorpos monoclonais e a estimulação do sistema imune por se apresentar no primeiro *loop* da proteína VP2, que está próximo a regiões de epítopos (VENSELAAR, H, et al., 2010; CHAPAMN & ROSSMANN, 1993).

A alteração F267Y está localizada na superfície da proteína e a mutação deste resíduo pode perturbar as interações com outras moléculas ou outras partes da proteína. (VENSELAAR, H, et al., 2010). Na alteração D297A o resíduo da cepa ancestral forma uma ligação de hidrogênio com o ácido glutâmico na posição 298. A diferença de tamanho entre o resíduo da cepa ancestral o mutante faz com que o novo resíduo não esteja na posição correta para fazer a mesma ligação de hidrogênio que o resíduo da cepa ancestral original. O resíduo mutante está em uma estrutura secundária, portanto a conformação local fica levemente desestabilizada; já na alteração S297N o resíduo está localizado na superfície da proteína. A mutação deste resíduo pode perturbar as interações com outras moléculas ou outras partes da proteína. O sítio 297 influencia diretamente na interação vírus-hospedeiro e também pode estar relacionado com a especificidade entre as espécies (VENSELAAR, H, et al., 2010; ZHOU et al., 2017; LEE et al., 2019).

A substituição A300D está localizada em um domínio importante para a atividade da proteína e em contato com resíduos de outro domínio esta alteração introduz uma carga nesta posição, o que pode causar repulsão entre o resíduo mutante e os resíduos vizinhos; já a alteração A300G torna a proteína flexível e pode perturbar a rigidez da proteína nesta posição. O sítio 300 está diretamente associado à ligação da Transferrina (TfR) nos hospedeiros, caracterizando o desenvolvimento da infecção. Foi observado em um estudo, através de amostras coletadas e sequenciadas obtidas a partir de gatos domésticos a presença do aminoácido alanina (ALA), nesta posição. Já em cães, nas amostras sequenciadas, observa-se predominantemente o aminoácido glicina (GLI) (VENSELAAR, H, et al., 2010; ALLISON AB et al, 2015).

Neste estudo observou-se a glicina (GLI), predominante nas sequências consenso, obtida a partir dos clados G1 e G2, enquanto que na sequência consenso das amostras das vacinas observou-se a presença da alanina (ALA), assim como na cepa ancestral. Ainda sugere-se que alterações no aminoácido 300 podem promover mudanças em sítios próximos, como os 299, 300 e 301, que podem culminar com mudança na conformação em região de *loop* (VENSELAAR, H, et al., 2010; ALLISON AB et al, 2015). A alteração D305Y forma uma ponte salina com a arginina na posição 313, o que difere em sua carga e possibilita alterações nas interações iônicas feitas pelo resíduo original da cepa ancestral. Neste estudo também foram encontradas alterações no sítio 324. A substituição T324I localiza-se em um domínio importante para a atividade da proteína que está em contato com resíduos de outro domínio. As alterações geradas neste local podem impactar uma variedade de hospedeiros e influenciar diretamente na biologia viral, sendo considerada uma das importantes regiões de epítipo (VENSELAAR, H, et al., 2010; ZHOU et al., 2017). Já na alteração D375N o resíduo de tipo mutante forma uma ligação de hidrogênio com a tirosina na posição 400, que ocorre devido à perda de carga do resíduo observado na cepa ancestral (VENSELAAR et al., 2010)

A substituição N426E pode promover repulsão entre o resíduo mutante e os resíduos vizinhos, sendo que está localizada na superfície da proteína e a perda da hidroxila na substituição T440A pode promover alterações externas, sendo que em ambas podem-se observar alterações na interação entre o resíduo e o seu domínio, afetando a função da proteína. Outro trabalho aponta que os sítios 426 e 440, que estão localizados no “topo” da proteína VP2, são considerados principais sítios antigênicos do capsídeo. Contudo, essas dissimilaridades podem demonstrar que as vacinas, utilizadas hoje, podem não apresentar alguns aminoácidos predominantes a campo, o que pode contribuir para a adaptação e evolução viral. Sendo assim,

esses achados demonstram a necessidade de uma nova vacina que abranja as cepas em circulação nas populações caninas do Brasil, conferindo a uma imunização adequada (VENSELAAR, H, et al., 2010; ZHOU et al., 2017).

As alterações hidrofóbicas e eletrostáticas observadas nos aminoácidos, localizados nos sítios 101, 297, 300, 305, 324, 426 e 440, principalmente as substituições presentes nos *loops* (A300G, D305Y e N426D/E), podem resultar drasticamente no sítio de ligação da proteína e devendo-se levar em consideração que a predominância destes tipos antigênicos pode levar à fuga imune (LENCINA et al., 2023). Tendo em vista estas alterações observadas nas proteínas *in silico* deve-se levar em consideração que estas podem acarretar na capacidade de neutralização viral frente às cepas circulantes de CPV-2.

No delineamento deste experimento foram utilizados *Rattus norvegicus* para a realização de estudos *in vivo*, o qual é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas a vacinas, apresentando resultados satisfatórios devido à facilidade em sua manipulação. Estes animais também apresentam resultados de produção de anticorpos semelhantes aos de outros animais, como é o caso dos caninos (GAO, et al, 2021 ; ROUBIDOUX, et al, 2021). Neste trabalho foi coletado o sangue dos animais para posterior separação do soro e seu preparo a fim de ser realizado o teste de VN e imunofluorescência, sendo determinado que a titulação mínima protetora seria de 1:80 conforme citado em estudo (DALL'ARA et al., 2023). A aplicação *in vivo* realizada neste trabalho utilizou vacinas comerciais e vacinas experimentais, que apresentaram resultados importantes acerca da produção de anticorpos neutralizantes no teste de VN, utilizando a cepa 265:CPV-2. Ainda pretende-se realizar com as amostras de campo de CPV-2 coletadas neste estudo, após a análise de sequenciamento genético, o teste de VN e imunofluorescência submetido a diferentes antígenos de CPV-2 circulantes, que resultará em um painel de anticorpos neutralizantes.

Após a realização do teste de VN o grupo controle não apresentou anticorpos neutralizantes, conforme pode ser observado no Quadro 9 e no Gráfico 1. Os resultados dos anticorpos neutralizantes gerados pelos imunógenos de cepas brasileiras, que totalizaram em 3 imunógenos experimentais, apresentaram neutralização viral maior que 1:80 anti 265:CPV-2, conforme pode ser observado no quadro 9 (Grupos: CPV2, UCS2 e UCS12). No entanto, a formulação utilizada para o desenvolvimento da vacina experimental foi realizada através da inativação viral com formalina, utilizando-se óleo mineral como adjuvante, o que pode ter influenciado na baixa titulação de anticorpos neutralizantes. Sendo assim, são necessários novos



estudos utilizando outros inativantes e adjuvantes, a fim de avaliar a possibilidade de diferentes titulações de anticorpos (ROY et al., 1982).

Das oito marcas de vacinas comerciais utilizadas no estudo a Vac1, Vac2, Vac3, Vac5 e Vac6 apresentaram quantidade mínima de anticorpos neutralizantes frente à 265:CPV-2, exceto em um dos animais da Vac6 que não apresentou a produção de anticorpos neutralizantes. A Vac4 e a Vac7 não apresentaram anticorpos neutralizantes frente à 265:CPV-2, levantando ao questionamento do transporte incorreto destas vacinas, ou até mesmo perfis antigênicos distintos, que podem não conferir a uma boa resposta imune e, conseqüentemente, não gerar anticorpos neutralizantes (LENCINA et al, 2023). Outros estudos também ressaltam a relação da produção das vacinas com cepas inadequadas, erros na atenuação do vírus e armazenamento incorreto (DAY et al., 2007; DECARO et al.,2020), ressaltando-se o questionamento de diversos autores quanto às vacinas produzirem anticorpos protetores contra o subtipo mais recente, o CPV-2c (PRATELLI et al., 2001; DAVIS-WURZLER, 2014; DAY et al., 2016).

Até o momento foram realizados estudos em outros países que avaliaram a produção de anticorpos de vacinas comerciais disponíveis contra CPV-2, apresentando grande variabilidade na titulação de anticorpos entre os animais e entre as marcas das vacinas utilizadas, contudo, em seu delineamento foram realizadas análises através da técnica de ELISA, pela qual não se determinou a presença de anticorpos neutralizantes e, sim, apenas das suas titulações (GAMAGE, B. G. S. et al., 2020; DALL'ARA et al., 2023).

O adjuvante tem como finalidade aumentar a resposta imune gerada pelas vacinas, permitindo utilizar menos antígenos em sua composição, no entanto, existem diferentes tipos de adjuvantes disponíveis para serem utilizados que apresentam mecanismos de ação distintos (COFFMAN et al., 2010). A maioria das vacinas utilizadas neste estudo não apresenta em sua bula qual foi o adjuvante utilizado, o que deve ser levado em consideração em outras análises e estudos realizados, pois estes podem influenciar na indução do sistema imune e devem ser esclarecidos aos seus consumidores. Verificou-se neste experimento que não houve correlação entre a quantidade de DNA viral e a produção de anticorpos nos resultados obtidos da correlação de Spearman. Isto demonstra a importância de ser utilizado um bom adjuvante para a indução da resposta imune dos animais, ressaltando a necessidade de que as indústrias fabricantes de vacinas precisem informar qual o adjuvante utilizado na composição destas, aos seus consumidores, através das bulas. Além disso, resalta-se a importância do monitoramento das cepas circulantes,

assim como a avaliação da capacidade de neutralização viral que as vacinas disponíveis no mercado apresentam quando submetidas às variantes de campo.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram observados diferentes perfis de anticorpos neutralizantes das diferentes vacinas comerciais disponíveis na região Sul do Brasil e, embora as vacinas experimentais sejam contendo vírus inativado, observou-se uma titulação muito semelhante às de vírus atenuado, presentes nas vacinas comerciais. Deve ser levado em consideração que o armazenamento incorreto destas vacinas, em determinados estabelecimentos, podem interferir na resposta imune esperada. Na análise filogenética de amostras de CPV-2, depositadas no GenBank nos últimos 10 anos, observou-se a formação de três clados distintos: as vacinas agrupadas no clado em conjunto à cepa ancestral, as variantes CPV-2b e CPV-2c, agrupadas em um mesmo clado, e a CPV-2a em um clado único. A partir dos estudos realizados foi constatada a predominância da circulação da variante CPV-2a, seguida de CPV-2c e CPV-2b, respectivamente. Além disso, foram observadas substituições de aminoácidos importantes na proteína VP2 que conferem a alteração de carga e hidrofobicidade, podendo afetar interações e, como tal, as funções da proteína, levantando-se o questionamento da eficiência das vacinas contra as diferentes cepas circulantes.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Pretende-se realizar o sequenciamento genético das amostras recebidas de clínicas parceiras a fim de determinar as variantes predominantes na região metropolitana de Porto Alegre e Serra Gaúcha. Além disso, objetiva-se avaliar a capacidade de neutralização viral destas amostras, utilizando os soros obtidos neste trabalho a fim de se obter um painel de anticorpos. Também ressalta-se a importância da realização de novos estudos *in vivo* que contenham um “n” amostral maior de vacinas a fim de se comparar entre os grupos diferentes respostas de anticorpos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, A.B. et al. Single Mutations in the VP2 300 Loop Region of the Three-Fold Spike of the Carnivore Parvovirus Capsid Can Determine Host Range. *Journal of Virology*, v. 90, n. 2, p. 753-767, 2015.
- ALTMAN, K.D.; KELMAN, M.; WARD, M.P. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Vet Microbiol*, v. 210, p. 8-16, 2017.
- ANGELO, et.al., Isolamento de parvovirus canino no Brasil. *Rev. Fac.Med.Vet.Zootec. Univ. 51 Paulo*, 25(1) :123-134,1988.
- APPEL, M. J. et al. Canine viral enteritis. I. Status report on corona-and parvo-like viral enteritidis. *The Cornell veterinarian*, v. 69, n. 3, p. 123-133, 1979.
- BARRS, V.R. Feline panleukopenia: a reemergent disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 49, p. 651-670, 2019.
- BIRD, L.; TAPPIN, S. Canine parvovirus: where are we in the 21st Century. *Companion Animal*, v. 18, n. 4, p. 142-146, 2013.
- BUONAVOGLIA, C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 3021-3025, 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*, v. 15, n. 4, p. 281-283, Oct. 1992.
- CANINE PARVOVIRUS MONOCLONAL ANTIBODY; Disponível em: <https://my.elanco.com/us/parvovirus> Acesso em: 10 de maio de 2023
- CARMICHAEL, L. E., D. H. SCHLAFER, AND A. HASHIMOTO. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet Diagn. Investig.* 6:165-174, 1994.
- CARMICHAEL, L.E. "An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus". *J. Vet Med.* v.52, p.303-311, 2005.

- CARMICHAEL, L.E., JOUBERT, J.C. AND POLLOCK, R.V.H. Hemagglutination by canine parvovirus: serological studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet Res.*, 41: 784--791., 1980.
- CASTRO, T. X.; MIRANDA, S.C.; LABARTHE, N.V.; SILVA, L.E.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.333-339, 2007.
- CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Research in Veterinary Science*. v.90, p.336-340, 2011.
- CHAPMAN MS, ROSSMANN MG. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology*. 1993 Jun;194(2):491-508.
- COFFMAN, Robert L.; SHER, Alan; SEDER, Robert A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, v. 33, n. 4, p. 492-503, 2010.
- COHN, L.A et al. Plasma granulocyte colony-stimulating factor concentrations in neutropenic, parvoviral enteritis-infected puppies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1999. v.13. n. 6. p. 581-586.
- COTMORE, S. F. et al. The Family Parvoviridae. *Archive of Virology*, v. 159, p. 1239-1247, 2014.
- COTMORE ET AL.; ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae, *Journal of General Virology*, 100: 367–368, 2019.
- COTMORE, S.; TATTERSALL, P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Advances in Virus Research*, v. 70, p. 183-232, 2007.
- CRAWFORD, P. C.; SELLON, R. K. Canine Viral Diseases. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, p. 958-962, 2010.
- DALL'ARA, P. et al. Prevalence of Serum Antibody Titers against Core Vaccine Antigens in Italian Dogs. *Life*, v. 13, n. 2, p. 587, 2023.
- DAVIS-WÜRZLER, G. M. Update On Current Vaccination Strategies in Puppies and Kittens. *Veterinary Clinics of North America - Small Animals*, v. 44, p. 253-263, 2014.

DAY, M. et al. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 57, p. E1-E45, 2016.

DAY, M. J.; HORZINEK, M. C.; SCHULTZ, R. D. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Prato.*, v. 51, p. e1, 2010.

DE OLIVEIRA PSB, CARGNELUTTI JF, MASUDA EK, WEIBLEN R, FLORES EF. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Arch Virol*, v. 164, n. 5, p. 1361–1369, May 2019.

DE OLIVEIRA SANTANA, W. et al. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 98, p. 105225, 2022.

DE OLIVEIRA, P. S. B. et al. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Archives of virology*, v. 164, n. 5, p. 1361-1369, 2019.

DE OLIVEIRA, Pablo Sebastian Britto et al. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. *Archives of virology*, v. 164, p. 1361-1369, 2019.

DECARO, N. et al. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiologica*, v. 31, p. 125-130, 2008.

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

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. B. V. R.; BARRS, V. R. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Veterinary microbiology*, v. 247, p. 108760, 2020.

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

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

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

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Sistema Gastrointestinal. In: *Tratado de Medicina Interna Veterinária*, 4.ed., v. 2, Editora Manole, p. 1663-1666, 1997.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária: doença do cão e gato*, 5.ed., Guanabara, 2004.

FERREIRA, M.O. Diferentes abordagens terapêuticas em cães com parvovirose – caracterização do uso de antibióticos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

FIROOZJAI, H.A.; SHOORIJEH, S.J.; MOHAMMADI, A.; TAMADON, A. Characterization of Iranian isolates of canine parvovirus in fecal samples using polymerase chain reaction assay. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 9, p. 63-68, 2011.

GAMAGE, B. G. S. S.; DISSANAYAKE, D. R. A.; SILVA, I. D. Effect of maternal antibodies on the immune response to different canine parvovirus vaccines and antibody response to selected vaccines. *Sri Lanka Veterinary Journal*, v. 67, n. 1-2, 2020.

GAO, Q. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, v. 369, n. 6499, p. 77-81, 2020.

GHAJARI, M.; POURTAGHI, H.; LOTFI, M. Phylogenetic analysis of canine parvovirus 2 subtypes from dogs with diarrhea in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 22, n. 4, p. 347, 2021.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A.L. Canine Parvovirus. *Veterinary Clinics of North America – Small Animals*, v. 40, p. 1041-1053, 2010.

GOODMAN, L.B. et al. Binding site on the transferrin receptor for the parvovirus capsid and effects of altered affinity on cell uptake and infection. *Journal of Virology*, v. 84, n. 10, p. 4969-4978, maio 2010.



- GOVINDASAMY, L. et al. Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvovirus and mutants. *Journal of Virology*, v. 77, n. 22, p. 12211-12221, 2003.
- GRECCO, Sofia et al. Inter-and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evolution*, v. 4, n. 1, p. vey011, 2018.
- GREENE, C.E.; DECARO, N. Canine Viral Enteritis in *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed. Elsevier, St Louis, Missouri, p. 67-74, 2012.
- GUILFORD, W. Gastrointestinal Tract Infections, Parasites and Toxicoses. In: GUILFORD, W.; STROMBECK, D.; WILLIAMS, D.; MEYER, D. (ed). *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, 3ª edição. Philadelphia: WB Saunders, 1996, cap. 21, p. 411-432.
- HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAYASHI, H.; LOGRIPPO, G.A. Inactivation of Vacuolating Virus (SV 40) By Betapropiolactone I. Evaluation in Tissue Culture. *Henry Ford Hospital Medical Journal*, v. 10, n. 3, p. 463-470, 1962.
- HOELZER, K.; PARRISH, C.R. The emergence of parvovirus of carnivores. *Veterinary Research*, v. 41, p. 39-42, 2010.
- HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TANNER, P., PARDO, M.C.; SANCHEZ, S.; W Se 0 Co BUONAVOGLIA, C.; SALIKI, J.T. Ocomence of canine parvovirus type 2c in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, n. 19, p. 535-539, 2007
- HOUSTON, D.; RIBBLE, C.; HEAD, L. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases. *J Am Vet Med Assoc*, v. 208, p. 542-546, 1996.
- HUEFFER, K.; PARRISH, C.R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol*, v. 6, n. 4, p. 392-398, 2003.
- HUMM, K.E.; HUGHES, D. Canine Parvovirus Infection. In: SILVERSTEIN, D.; HOPPER, K. (eds). *Small Animal Critical Care*. Missouri: Saunders, cap. 112, p. 482-485, 2009.

- JONES, D.T. et al. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, v. 8, p. 275-282, 1992.
- JÓZWIK, A. et al. Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. *Journal of General Virology*, v. 90, p. 2437-2441, 2009.
- KELLEY, L. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, v. 10, p. 845-858, 2015.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LEE, H. et al. Transferrin receptor binds virus capsid with dynamic motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 41, p. 20462-20471, 2019.
- LENCINA, M.M. et al. Canine parvovirus type 2 vaccines in Brazil: Viral load in commercial vaccine vials and phylogenetic analysis of the vaccine viruses. *Biologicals*, v. 82, p. 101676, 2023.
- LOPEZ DE TURIZO, J., CORTES, E.; RANZ, A. et al. Fine Mapping of Canine Parvovirus B Cell Epitopes. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 2445-2456, 1991
- MACINTIRE, D.K.; SMITH-CARR, S. Canine parvovirus. Part II. Clinical Signs, diagnosis, and treatment. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 1997, vol. 19, n. 3, p. 291-302.
- MACK, J.V.N.; CHOTISEW, A. The Use of Beta-Propiolactone for The Preparation of Virus Vaccines. *Journal of General Virology*, 1956, *Proc. Soc. Esptl. Biol. Med.*, v. 91, p. 288-290.
- MAZZAFERRO, E.M. Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v. 50, n. 6, p. 1307-1325, 2020.
- MCCAWE, D.; HOSKINS, J. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2006, cap. 8, p. 63-71.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MEUNIER, P. et al. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Veterinary Pathology*, v. 22, p. 617-624, 1985.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*, v. 97, p. 2043-2057, 2016.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R. Parvoviridae. In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. 2nd ed. Santa Maria: UFSM, 2007.

NASCIMENTO, et al., Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 67, p. 7-19, 2010.

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

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients*.

NIKBAKHT, G.H.; JAMSHIDI, S.H.; MOHYEDINI, S.H. Detection of a new canine parvovirus mutant in Iran. *Iran J. Vet Med.*, v. 12, p. 1-7, 2018.

NUNES, M.V. et al. Comparação Do Perfil De Anticorpos Anti-Imunoglobulina G Em Murinos Imunizados Com Igg Humana Associada A Diferentes Adjuvantes. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, n. 1, 2009.

OHSHIMA, T. et al. Chronological Analysis of Canine Parvovirus Type 2 Isolates in Japan. *Journal of Veterinary Science*, v. 70, n. 8, p. 769-775, 2008.

PAIVA, M.E.S.; SANTOS, Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

- PARKER, J.; PARRISH, C. Canine Parvovirus host range is determined by specific conformation of an additional region of the capsid. *Journal of Virology*, v. 71, n. 12, p. 9214-9222, 1997.
- PARRISH, C. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Advances in Virus Research*, v. 38, p. 403-450, 1990.
- PARRISH, C. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 29-40, 1999.
- PARTHIBAN, S. et al. Isolation and typing of canine parvovirus in CRFK cell line in Puducherry, South India. *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 456-460, 2011.
- PEREIRA, C.A.D. Parvovirose Canina. In: JERICÓ, M.M.; KOGIKA, M.M.; NETO, J.P.A. *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. Rio de Janeiro: Roca, 2015, p. 788-794.
- PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L. First detection of canine parvovirus type 2e in South America. *Veterinary Microbiology*, n. 124, p. 147-152, 2007
- PETTERSEN, E.F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, v. 30, n. 1, p. 70-82, 2021.
- POLLOCK, R.H.; CARMICHAEL, L.E. Canine Viral Enteritis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animals*, v. 13, p. 551-566, 1983.
- POLLOCK, R.V.H.; CARMICHAEL, L.E. Dog Response to Inactivated Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus Vaccines. *The Cornell Veterinarian*, v. 72, Suppl. 9, 1982.
- PRATELLI, A.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b. modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. n. 3, v. 8, p. 612-615, 2001
- PRATELLI, C.R. et al. Canine Parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, p. 612-615, 2001.

- PRITTIE, J. Canine Parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 14, n. 3, p. 167-176, 2004.
- RAMBAUT, A. FigTree v1.3.1. Computer program available from: <URL>. 2010
- REDDY, K.B. et al. Diagnosis of canine parvoviral (CPV) infection in dogs. *Intas Polivet*, v. 16, n. 2, p. 441-442, 2015.
- REED, A. Paul; JONES, ELAINE V.; MILLER, TIMOTHY J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of virology*, v. 62, n. 1, p. 266-276, 1988.
- ROUBIDOUX, E.K. et al. Mutations in the Hemagglutinin Stalk Domain Do Not Permit Escape from a Protective, Stalk-Based Vaccine-Induced Immune Response in the Mouse Model. *mBio*, vol. 12, n. 1, e03617-20, 16 Feb. 2021.
- SANTANA, W.O. et al. Parvovírus canino: uma abordagem evolutiva e clínica. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, Recife, v. 13, n. 4, p. 526-533, out./dez. 2019.
- SCHOEMAN, J. et al. Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *N Engl J Med*, v. 1, p. 1-6, 2013.
- SENDA, M. et al. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, v. 12, p. 1-6, 1986.
- SHACKELTON, L. et al. High rate of viral evolution associated with the emergence of canine parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 2, p. 379-384, 2005.
- SIMON, A. et al. Hematological analysis of reagent dogs to the immunochromatographic test for canine parvovirus. *Revista Interação Interdisciplinar*, v. 3, n. 1, p. 16-36, Jan-Jun., 2019.
- SIMPSON, A. et al. The structure of Porcine Parvovirus: Comparison with related viruses. *Journal of Molecular Biology*, v. 315, p. 1189-1198, 2002.
- SIMPSON, A.A. et al. Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *Journal of Molecular Biology*, v. 300, p. 597-610, 2000.

- SMITH-CARR, S. et al. Canine parvovirus: Part 1. Pathogenesis and Vaccination. *Compend Contin Educ Pract Vet*, v. 19, n. 2, p. 125-133, 1997.
- SPIBEY, N. et al. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary Microbiology*, v. 128, p. 48-55, 2008.
- STEINEL, A. et al. Genetic characterization of feline parvovirus sequence from various carnivores. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 345-350, 2000.
- STRECK, A. Detecção e caracterização de amostras de parvovírus suíno. Dissertação com vista à obtenção do grau de Mestre – Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Faculdade de Medicina Veterinária. Brasil, 2009.
- STRECK, A. et al. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 465-469, 2009.
- STROTTMANNI, D.M. et al. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 38, n. 2, p. 400-405, mar-abr. 2008.
- TAMS, T.R. Update on management of parvoviral enteritis. *Atlantic Coast Veterinary Conference Proceedings Online*, 2007.
- TIMONEY, J.F. et al. Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals. 8th ed. Ithaca; London: Cornell University Press, p. 832-846, 1988.
- TOOHEY-KURTH, Kathy et al. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 32, n. 6, p. 802-814, 2020.
- TRUYEN, U. et al. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Veterinary Record*, v. 138, n. 15, p. 365-366, 1996.
- TRUYEN, U. et al. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of Virology*, v. 69, n. 5, p. 4702-4710, 1995.

TRUYEN, U. et al. Survey in viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infection*, v. 121, p. 433-440, 1998.

TURISO, J. et al. Recombinant vaccine or canine parvovirus in dogs. *Journal of Virology*, v. 66, n. 5, p. 2748-2753, 1992.

UCSF ChimeraX version: 1.6.1 (2023-05-09) © 2016-2023 Regents of the University of California. All rights reserved.

VENSELAAR, H, et al. VRIEND G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics.*, 2010.

VOORHEES, I.E.H. et al. Limited intrahost diversity and background evolution accompany 40 years of canine parvovirus host adaptation and spread. *J. Virol.*, 2020.

WANER, T. et al. Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, n. 4, p. 427-432, 1996.

WANG, D. et al. Nonstructural protein-2 and replication of Canine Parvovirus. *Virology*, v. 240, p. 273-281, 1998.

WANG, J. et al. Large-scale manufacture of VP2 VLP vaccine against porcine parvovirus in *Escherichia coli* with high-density fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 9, p. 3847-3857, 2020.

WILLARD, M.D. Canine parvoviral enteritis. In: R.W. Nelson e C.G. Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine*, 2009. p. 443-445. St. Louis: Mosby Elsevier.

WILSON, S. et al. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV2c. *Vaccine*, v. 32, p. 5420-5424, 2014.

YIP, H.Y.E. et al. Diagnostic challenges in canine parvovirus 2c in vaccine failure cases. *Viruses*, v. 12, n. 9, p. 980, 2020.

ZEEUW, E.J.L. et al. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 420–427, 2007.

ZHOU, P. et al. The genetic evolution of canine parvovirus - A new perspective. *PLOS One*, v. 12, p. e0175035, 2017.



## 10. ANEXOS

### Anexo I



**PROJETO: ANÁLISE ANTIGÊNICA DE CEPAS DE CAMPO DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO 2 E EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS**

Responsável: Prof. André Felipe Streck  
Mestranda em Saúde Animal: Brenda Picoli Gheno

#### FICHA DE ANAMNESE

**Clínica(Nome/Cidade/Estado):** \_\_\_\_\_

**Nome do canino:** \_\_\_\_\_ **Raça:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_

**Acesso à rua:** ( ) SIM ( ) NÃO

**Vacinado:** ( ) SIM ( ) NÃO **Qual vacina?** ( ) V8 ( ) V10

( ) 1ª dose ( ) 2ª dose ( ) 3ª dose

**Qual a marca da vacina?** \_\_\_\_\_

**Foi realizado teste para parvovírus canino?** ( ) SIM ( ) NÃO

**"SnapTest"?** ( ) SIM ( ) OUTRO Qual? \_\_\_\_\_

**O animal tem contato com outros animais?** ( ) SIM ( ) NÃO

**Se sim, canino ou felino?** ( ) CANINO ( ) FELINO **Outros:** \_\_\_\_\_

#### SINAIS CLÍNICOS APRESENTADOS PELO ANIMAL

Considere 0- Não apresenta; 1- leve; 2- Moderado; 3- Severo/Intenso

**Diarreia:** ( ) 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 **Diarreia hemorrágica:** ( ) 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3

**Vômito:** ( ) 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 **Caracterize:** \_\_\_\_\_ **Letargia:** ( ) Sim ( ) Não

**Hiporexia:** ( ) Sim Não ( ) **Linfonodos aumentados:** ( ) Sim ( ) Não **Temperatura:** \_\_\_\_\_ °C

O animal apresentou outro(s) sinal(is) clínico(s) ao realizar o exame físico? Se sim, qual(is)?

\_\_\_\_\_

Foi administrada alguma medicação neste período? Se sim, qual?

\_\_\_\_\_

O animal apresentou melhora do quadro com a medicação? Se sim, descreva.

\_\_\_\_\_



## Anexo II

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

NOME: \_\_\_\_\_

RG ou CPF: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

BAIRRO: \_\_\_\_\_ CIDADE: \_\_\_\_\_

TELEFONE: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME DO ANIMAL: \_\_\_\_\_

ESPÉCIE: \_\_\_\_\_ RAÇA: \_\_\_\_\_

SEXO : M  F  DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### DADOS SOBRE A PESQUISA

**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:** Análise antigênica de cepas de campo de parvovírus canino tipo 2 e eficiência de neutralização viral de anticorpos gerados por vacinas comerciais

**PESQUISADOR:** André Felipe Streck CARGO/FUNÇÃO: Médico Veterinário e professor pesquisador da Universidade de Caxias do Sul

**AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:** Risco mínimo

Eu, \_\_\_\_\_, estou sendo convidado a participar deste estudo, cujos objetivos e justificativas são: realizar a análise antigênica de cepas de campo de parvovírus canino tipo 2 e eficiência de neutralização viral de anticorpos gerados por vacinas comerciais, para auxiliar nos estudos epidemiológicos avaliando a eficácia das vacinas e as cepas de campo do parvovírus canino tipo 2. A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a de suabe retal do animal positivo para parvovirose canina no “*SnapTest*”. Recebi os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos para realizar a coleta, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, fui informado que o animal pode ser exposto a estresse durante os procedimentos de coleta.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Assinatura do tutor do animal

## Anexo III

### **PROJETO: ANÁLISE ANTIGÊNICA DE CEPAS DE CAMPO DE PARVOVÍRUS CANINO TIPO 2 E EFICIÊNCIA DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL DE ANTICORPOS GERADOS POR VACINAS COMERCIAIS**

Responsável: Prof. André Felipe Streck  
Mestranda em Saúde Animal: Branda Picoli Gheno

#### **Motivação**

As vacinas comercializadas no sul do Brasil demonstraram em estudos recentes uma grande variação na quantidade de DNA viral de suas unidades, sendo que algumas apresentam a ausência de DNA viral detectável em estudos in vitro. Além do citado, realizada a análise filogenética destas vacinas verificou-se um clado distinto dos vírus circulantes no Brasil, que também apresentou um perfil de capsídeo distinto das cepas vacinais, levando a possíveis falhas na eficácia.

#### **Objetivos**

- Avaliar a capacidade neutralizante de anticorpos gerados pelas vacinas comerciais do parvovírus canino tipo 2 disponíveis no Brasil.
- Obter vírus de campo isolados nos últimos anos da região sul do Brasil.
- Gerar anticorpos em sistema murino contra as vacinas comerciais disponíveis no Brasil.
- Avaliar a capacidade neutralizantes destes anticorpos contra cepas de campo circulantes e cepas padrões.

#### **Resultados esperados**

- Determinação da qualidade das vacinas quanto a sua eficácia
- Identificação das cepas de parvovirose canina presentes na Região Sul do Brasil a partir dos testes de PCR e sequenciamento genético

#### **Com o que você pode me ajudar**

- Termo de consentimento que deve ser preenchido e assinado pelo tutor dos caninos positivos no "Teste rápido" para parvovirose canina.
- Ficha de anamnese preenchida com os dados e sinais clínicos de cada animal.
- Coleta de suabe retal armazenado em tubos contendo solução salina que serão fornecidos para realização dos testes de Isolamento em cultivo celular, Hemaglutinação (HA), PCR e Sequenciamento genético.

#### **Metodologia resumida**

