

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MURIEL BECKER ABREU**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: MEDICINA  
VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
VIROLOGIA VETERINÁRIA**

**CAXIAS DO SUL**

**2020**

**MURIEL BECKER ABREU**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: MEDICINA  
VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
VIROLOGIA VETERINÁRIA**

Relatório de estágio curricular obrigatório  
apresentado como requisito para obtenção de  
título de bacharel em Medicina Veterinária na  
Área do Conhecimento de Ciências da Vida pela  
Universidade de Caxias do Sul.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

**CAXIAS DO SUL**

**2020**

**MURIEL BECKER ABREU**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: MEDICINA  
VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
VIROLOGIA VETERINÁRIA**

Relatório de estágio curricular obrigatório  
apresentado para obtenção de título de bacharel  
em Medicina Veterinária na Área do  
Conhecimento de Ciências da Vida pela  
Universidade de Caxias do Sul.

Aprovado em: 31/08/2020

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Eduardo Conceição de Oliveira  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

---

Médica Veterinária Michele Lencina  
Mestranda no Programa de Pós-graduação em Saúde Animal  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

---

Prof. Dra. Antonella Souza Mattei  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força para que eu pudesse realizar esse sonho, que é a graduação em Medicina Veterinária.

Agradeço aos meus pais, Amarildo e Rejane pela educação e pelo incentivo, por acreditarem neste sonho comigo e não medirem esforços para que ele se tornasse real. Sou grata pelo apoio emocional e financeiro que me deram e por permanecerem ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao Bruno, que esteve presente durante toda minha graduação, agradeço pelo companheirismo, compreensão e por sempre me motivar, acreditar em mim e me ajudar, quando necessário.

Aos meus amigos e colegas, que me acompanharam nessa trajetória. Levarei um pouco de cada um de vocês comigo, em meu coração. Aos meus familiares, principalmente minha tia Solange, por toda ajuda e por se fazer presente.

A UCS, que me proporcionou oportunidades ao longo da graduação, e principalmente aos meus professores, pela paciência, amizade, ensinamentos e conhecimentos repassados, contribuindo para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu professor, orientador e amigo André Streck, pelos ensinamentos durante a graduação e iniciação científica, pela oportunidade de estagiar durante 2 anos no LDMV e por me permitir concluir o estágio curricular nesse laboratório. Agradeço pelo tempo e pela dedicação depositada durante a realização deste relatório. Além de ser um ótimo professor, sempre me incentivou e é minha inspiração profissional.

Agradeço ao SV/UFSM e ao LDMV e suas respectivas equipes, por toda contribuição, amizade e ensinamentos passados durante o estágio. Ao meu supervisor Rudi Weiblen, por me permitir realizar o estágio no SV/UFSM.

Por fim, agradeço ao meu cão Bob, por todas as demonstrações de amor e por ser minha companhia em diversos dias de estudo.

Sou grata a todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse concluir a graduação em Medicina Veterinária.

*“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”*

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária, no Setor de Virologia na Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM) e no Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária (LDMV) na Universidade de Caxias do Sul. O estágio no SV/UFSM foi realizado no período de 03 de fevereiro a 19 de março de 2020, contabilizando um total de 232 horas, sob supervisão do Professor Dr. Rudi Weiblen. Durante este período, foi possível acompanhar a rotina laboratorial, auxiliando os pós-graduandos na realização dos exames, como a soroneutralização (SN), isolamento em cultivo celular (ICC), reação em cadeia da polimerase (PCR), imunofluorescência (IFA), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), resultando no diagnóstico de diversas doenças infecciosas, e a confecção de vacinas experimentais. A segunda etapa do estágio, realizada no LDMV ocorreu no período de 11 de maio a 22 de julho de 2020, sob supervisão do Professor Dr. André Felipe Streck. No LDMV, foi possível acompanhar e realizar diagnósticos e o desenvolvimento de projetos de pesquisa, relacionados ao parvovírus suíno e canino, além de auxiliar os pós-graduandos. O Estágio Curricular em Medicina Veterinária foi uma excelente oportunidade de aprendizagem e aprimoramento dos conhecimentos obtidos ao longo da graduação e possui extrema importância para a formação profissional e pessoal do médico veterinário.

**Palavras-chave:** Diagnóstico. Virologia. Parvovírus. BVDV.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura física do Setor de Virologia na Universidade Federal de Santa Maria.....	14
Figura 2- Sala de diagnóstico (A), sala de lavagem e esterilização (B), sala de equipamentos (C) e laboratório de biologia molecular (D).....	14
Figura 3- Laboratório de cultivo celular (A e B), vírus (C) e realização de imunofluorescência e imunoperoxidase (D).....	15
Figura 4- Sala escura.....	15
Figura 5- Mapas do primeiro (A) e segundo (B) andares.....	16
Figura 6- Estrutura física do Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária...	17
Figura 7- Sala de cultivo celular.....	18
Figura 8- Laboratório da sala 302.....	18
Figura 9- Cultivo celular de células MDBK (A). Células MDBK infectadas com BVDV-1 após 48 horas de inoculação (B).....	22
Figura 10- Células MDBK coradas pela técnica de imunofluorescência indireta para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Células negativas, não infectadas (A), células positivas, infectadas e marcadas em verde (B).....	23
Figura 11- Cultivo de células de rim suíno (PK-15) (A) e células de rim felino (CRFK) (B).....	27
Figura 12- Visualização da câmara de Neubauer no microscópio para a contagem de células.....	28
Figura 13- Feto suíno proveniente de um aborto, enviado para diagnóstico.....	29
Figura 14- Amostras de CPV confirmadas por PCR convencional em gel de agarose.....	31
Figura 15- Garrafas plásticas de cultivo celular de CRFK com isolamento viral de CPV.....	32
Figura 16- Ausência de micoplasma em cultivo celular de rim canino (A) e presença de micoplasma em cultivo de células de rim suíno (B).....	33
Figura 17- Gel de agarose, corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividades acompanhadas e realizadas durante o estágio no SV/UFSM.....	19
Tabela 2- Atividades acompanhadas e realizadas durante o estágio no LDMV.....	26
Tabela 3- Resultados obtidos no isolamento viral em células PK-15 e PCR das amostras suspeitas para parvovírus suíno.....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
Ac	Anticorpo
BVDV-1	Bovine viral diarrhea vírus/ vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 1
°C	grau Celsius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPV	Parvovírus canino
CPV-2	Parvovírus canino tipo 2
CRFK	Crandell-Reese Feline Kidney/ célula de rim felino
CRIB	Células resistentes a infecção pelo vírus da diarréia viral bovina
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
g	Gramas
HI	Inibição da hemaglutinação
ICC	Isolamento em cultivo celular
IFA	Imunofluorescência
IPX	Imunoperoxidase
LDMV	Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária
MDBK	Madin Derby Bovine Kidney/ célula de rim bovino
MDCK	Madin Derby Canine Kidney/ célula de rim canino
ME	Microscopia eletrônica
MEM	Meio essencial mínimo
mL	Mililitro
OE	Ovos embrionados
PBS	Phosphate buffered saline/ tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PK-15	Porcine Kidney Cell / célula de rim suíno
PPV	Parvovírus suíno
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
SN	Soroneutralização
SRRS	Síndrome respiratória e reprodutiva do suíno
SV	Setor de Virologia
SV/UFSM	Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria
TCID	Tissue culture infection dose
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UI	Unidade internacional
uL	Microlitro
VERO	Verda Reno/ célula de rim de macaco-verde-africano

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....</b>	<b>13</b>
2.1 SETOR DE VIROLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA.....	13
2.2 LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	16
<b>3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....</b>	<b>19</b>
3.1 SETOR DE VIROLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA.....	19
3.1.1 Cultivo celular.....	20
3.1.2 Descongelamento celular.....	21
3.1.3 Amplificação viral.....	21
3.1.4 Imunofluorescência.....	22
3.1.5 Produção de vacina autógena para papiloma.....	24
3.1.6 Soroneutralização quantitativa para BVDV.....	24
3.1.7 Titulação viral em microplacas de 96 cavidades.....	25
3.2 LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	26
3.2.1 Cultivo celular e isolamento viral.....	27
3.2.2 Coloração de DNA pelo DAPI.....	32
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
3.2.4 Purificação.....	35
3.2.5 PCR em tempo real.....	35
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1 PARVOVIRIDAE.....	37
4.1.1 Parvovírus suíno.....	37

4.1.1.1	Epidemiologia.....	37
4.1.1.2	Patogenia.....	38
4.1.1.3	Manifestações clínicas.....	39
4.1.1.4	Diagnóstico.....	39
4.1.1.5	Controle e prevenção.....	40
<b>4.1.2</b>	<b>Parvovírus canino.....</b>	<b>41</b>
4.1.2.1	Epidemiologia.....	41
4.1.2.2	Patogenia.....	41
4.1.2.3	Manifestações clínicas.....	42
4.1.2.4	Diagnóstico.....	43
4.1.2.5	Tratamento.....	44
4.1.2.6	Controle e prevenção.....	44
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório é uma etapa da graduação de extremo aprendizado, onde o estagiário consegue praticar e aprimorar todo o conhecimento teórico obtido ao longo da graduação. Além de acompanhar a rotina de trabalho dos profissionais na área de interesse escolhida.

O estágio curricular, pré-requisito para obtenção de título de bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade de Caxias do Sul, foi realizado no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (SV/UFSM), sob supervisão do Prof. Dr. Rudi Weiblen durante o período de 03 de fevereiro à 19 de março de 2020 e no Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária (LDMV) na Universidade de Caxias do Sul, supervisionado pelo Prof. Dr. André Felipe Streck, do dia 11 de maio à 22 de julho de 2020, totalizando 444 horas.

O estágio no SV/UFSM foi escolhido por ser um laboratório de referência na virologia veterinária, possuir alta casuística, excelente estrutura e por ser um laboratório-escola, onde estão disponíveis estagiários, residentes, pós-graduandos e professores da área para auxiliar e ensinar as técnicas necessárias para a realização dos exames. Durante o estágio, foi possível a vivência da rotina laboratorial, a qual agregou o conhecimento de diversas técnicas de diagnóstico virológico. Foi possível acompanhar desde a recepção de amostras biológicas, o acondicionamento, manipulação e processamento até a interpretação dos resultados, que foram debatidos com os colegas, proporcionando o aprendizado teórico e prático.

O LDMV foi escolhido por possuir excelentes linhas de pesquisa, as quais foi possível acompanhar e participar, aprofundando o conhecimento. O laboratório dispõe de uma ótima estrutura e de uma equipe composta por estagiários, pós-graduandos e pelo Professor André Streck, que ensinavam os procedimentos realizados a cada etapa para obtenção de resultados.

Este relatório tem como objetivo descrever a estrutura dos dois locais, relatar as atividades desenvolvidas, bem como apresentar duas doenças infecciosas de grande importância estudadas no estágio.

## 2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

### 2.1 SETOR DE VIROLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (SV/UFSM)

Iniciou-se o estágio curricular obrigatório no Setor de Virologia da UFSM (SV/UFSM), pertencente a Universidade Federal de Santa Maria e localizado na Avenida Roraima, número 1000, no prédio 63 A do Parque de Exposições no bairro Camobi, cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul. O horário de funcionamento do local era das 8:00 às 12:00 e das 13:00 às 17:30, de segunda à sexta-feira. O estágio curricular foi supervisionado pelo Professor Dr. Rudi Weiblen, durante o período de 03 de fevereiro a 19 de março de 2020, com carga horária diária de 8 horas, totalizando 232 horas.

O Setor de Virologia contava com uma equipe composta por um residente, dois mestrandos, seis doutorandos e cinco estagiários, juntamente aos professores Dr. Eduardo Furtado Flores e Dr. Rudi Weiblen. Sua infraestrutura é composta por três andares (Figura 1), onde, ao adentrar os limites do SV/UFSM observamos a recepção, sala apoio, sanitários, sala de diagnóstico (Figura 2-A), sala de lavagem e esterilização (Figura 2-B), sala de equipamentos (Figura 2-C), almoxarifado, sala dos estudantes, laboratório de biologia molecular (Figura 2-D), sala de meios e mix, laboratório de cultivo celular (Figura 3-A e B), vírus (Figura 3-C) e realização de imunofluorescência (IFA) e imunoperoxidase (IPX) (Figura 3-D) e sala escura (Figura 4). No primeiro andar encontram-se refeitório, cozinha, sanitários, sala dos pós-graduandos e sala dos professores Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores (Figura 5-A). No segundo andar observamos anfiteatro, almoxarifado, biotério e sanitários (Figura 5-B).

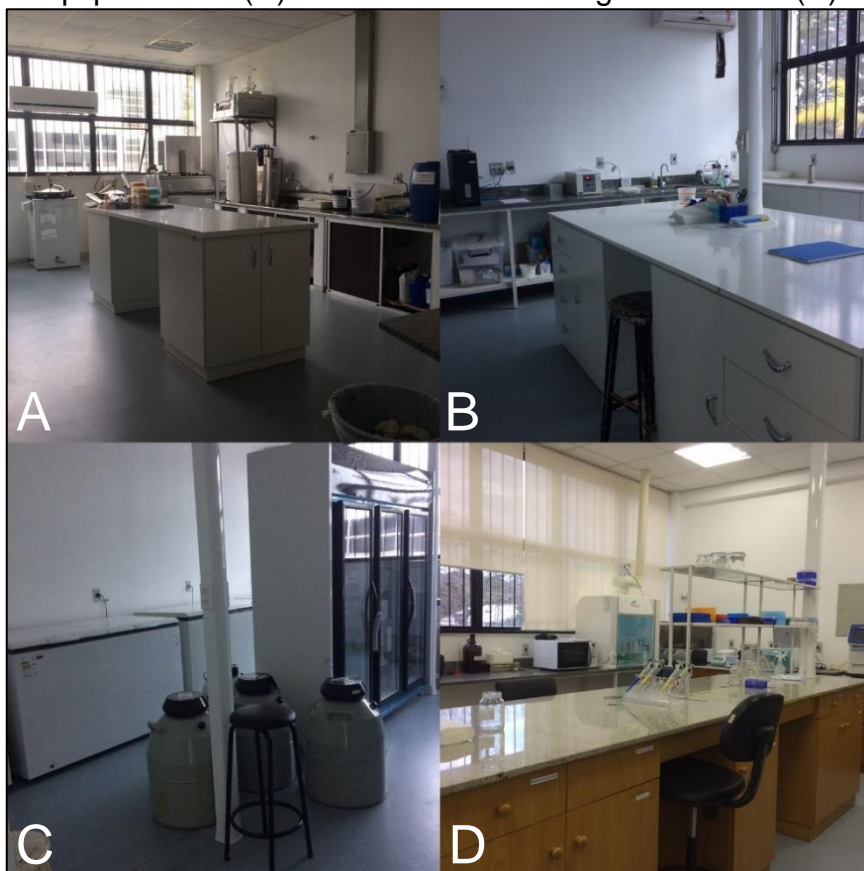
No SV/UFSM ocorrem aulas das disciplinas da graduação e pós-graduação, atividades de pesquisa e diagnóstico de doenças infectocontagiosas de pequenos e grandes animais. Os exames realizados são: soroneutralização (SN), isolamento em cultivo celular (ICC), reação em cadeia da polimerase (PCR), imunofluorescência (IFA), ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), imunocromatografia, inibição da hemaglutinação (HI), microscopia eletrônica (ME) e a confecção de vacinas autógenas.

Figura 1- Estrutura física do Setor de Virologia na Universidade Federal de Santa Maria.



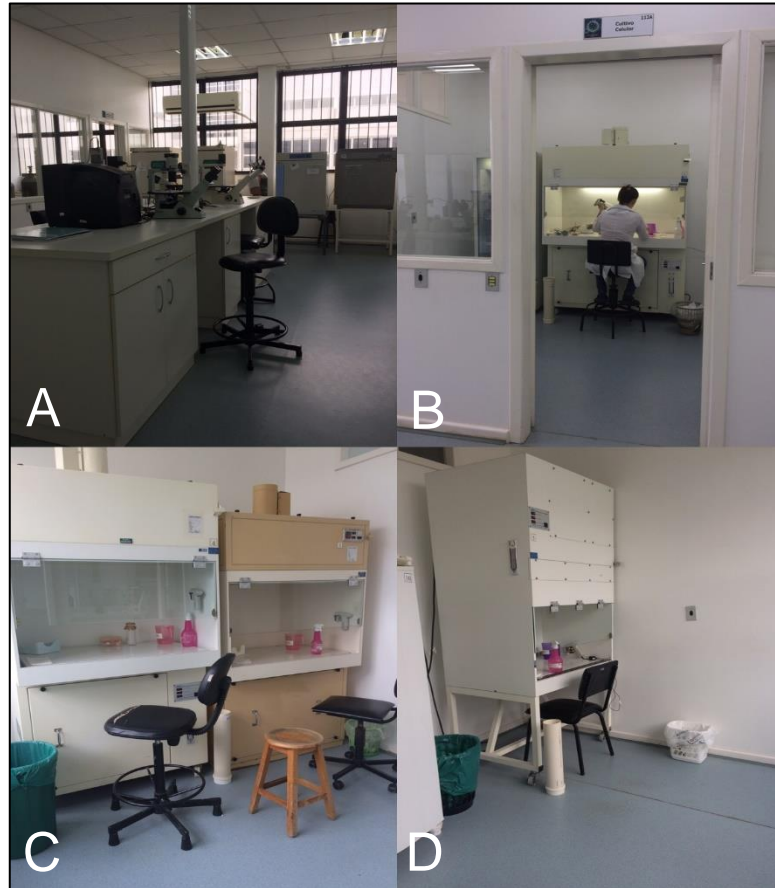
Fonte: Muriel Becker (2020).

Figura 2- Sala de diagnóstico (A), sala de lavagem e esterilização (B), sala de equipamentos (C) e laboratório de biologia molecular (D).



Fonte: Muriel Becker (2020).

Figura 3- Laboratório de cultivo celular (A e B), vírus (C) e realização de imunofluorescência e imunoperoxidase (D).



Fonte: Muriel Becker (2020).

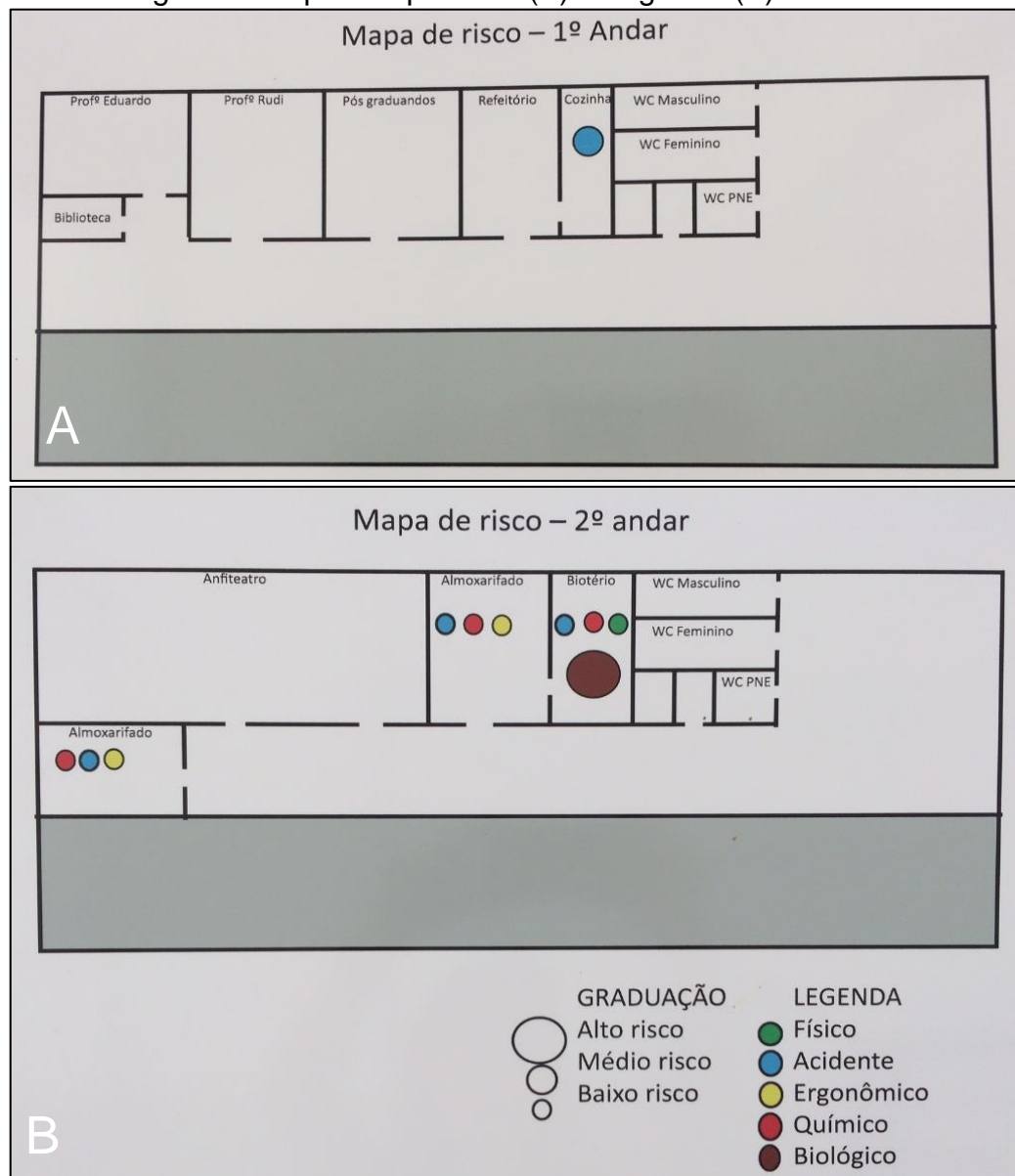
Figura 4- Sala escura.



Fonte: Muriel Becker (2020).



Figura 5- Mapas do primeiro (A) e segundo (B) andares.



Fonte: Muriel Becker (2020).

## 2.2 LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO EM MEDICINA VETERINÁRIA

O Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária (LDMV) pertencente a Universidade de Caxias do Sul, estava situado na Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, no bloco 57 no bairro Petrópolis, cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. O período de estágio curricular no LDMV foi supervisionado pelo Professor Dr. André Felipe Streck, do dia 11 de maio à 22 de julho de 2020, das 8:30 às 12:30, com carga horária diária de 4 horas, totalizando 212 horas. A equipe do laboratório era composta

por cinco mestrandos, um doutorando e seis estagiários, além de uma técnica do laboratório e o professor Dr. André Felipe Streck.

A infraestrutura do bloco 57, onde localizava-se o laboratório é composta por três andares (Figura 6), constituídos por diversas salas de aula, sanitários, recepção, secretaria, anfiteatro, além dos múltiplos laboratórios, dos quais, dois foram utilizados durante o estágio. No laboratório da sala 208, realizávamos o cultivo celular e isolamento viral em uma sala restrita, onde tomávamos todos os cuidados necessários para evitar possíveis contaminações bacterianas ou fúngicas (Figura 7). No laboratório da sala 302, eram realizados procedimentos de lavagem e esterilização dos materiais, extração de DNA e a técnica de PCR qualitativa (Figura 8).

Figura 6- Estrutura física do Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária.



Fonte: Muriel Becker (2020).

Figura 7- Sala de cultivo celular.



Fonte: Muriel Becker (2020).

Figura 8- Laboratório da sala 302.



Fonte: Muriel Becker (2020).

### 3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

#### 3.1 SETOR DE VIROLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (SV/UFSM)

O Setor de Virologia desenvolvia atividades de ensino, pesquisa, extensão e possuía uma rotina laboratorial intensa e diversificada, conforme os exames solicitados por tutores, proprietários e médicos veterinários. As amostras eram recebidas na recepção, verificando-se a viabilidade da amostra e após era efetuado o cadastro do paciente/tutor através de um sistema informatizado, onde era realizado o registro dos exames laboratoriais solicitados e gerado um código de identificação das amostras. Após, elas são processadas, identificadas e acondicionadas em refrigeradores com a temperatura ideal para cada amostra. A partir destas amostras foi possível acompanhar as atividades de pesquisa e realização das técnicas empregadas na rotina do laboratório para diagnóstico. Assim, será abordado as diferentes técnicas observadas e realizadas durante o período de estágio. As atividades são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Atividades acompanhadas e realizadas durante o estágio no SV/UFSM.

<b>Atividades</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Amplificação viral	4	9,1
Apresentação de mestrado	2	4,5
Apresentação de doutorado	1	2,3
Coleta de sangue equino para obtenção de soro	1	2,3
Cultivo celular	*	-
Descongelamento celular	1	2,3
Elisa	2	4,5
Imunofluorescência	5	11,4

Lavagem e esterilização	**	-
Produção de vacina autógena para papiloma	6	13,6
Purificação e envio para sequenciamento	1	2,3
Reação da cadeia em Polimerase	3	6,8
Soroneutralização quantitativa	14	31,8
Soroneutralização Screening	1	2,3
Titulação viral	3	6,8
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>100</b>

\* O cultivo celular era uma atividade de rotina realizada diariamente, não sendo possível quantificar.

\*\* A lavagem e esterilização também fazia parte da rotina do laboratório, realizada conforme a necessidade do laboratório, não sendo possível contabilizar.

### 3.1.1 Cultivo celular

As células costumam ser cultivadas em meios de cultura, possibilitando o estudo do metabolismo e comportamento celular, como movimentos e ações de substâncias sobre as células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). As culturas são feitas em frascos de plástico, onde as células ficam suspensas em uma solução que fornece os nutrientes e fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento celular. As células necessitam de uma superfície sólida, como a parede dos frascos de plásticos para se aderir e reproduzir, formando uma monocamada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

No estágio no SV/UFSM foi possível cultivar e acompanhar o cultivo de algumas linhagens celulares, dentre elas pode-se citar: células resistentes a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (CRIB), célula de rim de macaco-verde-africano (VERO), célula de rim bovino (MDBK) e célula de rim felino (CRFK). As células eram mantidas em garrafas plásticas de cultivo celular, com meio essencial mínimo (MEM) ou Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), dependendo do tipo celular cultivado, e adicionado 5-10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro equino. Conforme a necessidade de uso da célula ou quando a monocamada atingisse estágio de confluência total, realizava-se a manutenção das células.

A manutenção consistia na remoção do meio de cultivo para um recipiente de descarte e lavagem da monocamada de células com tripsina, desprezando-a no final. Adicionava-se solução de tripsina novamente, para a etapa de tripsinização e mantinha na estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 5-7 minutos para que haja o desprendimento e individualização das células. Com as células individualizadas, descartava-se a quantidade necessária para que o volume final seja 1:4, ou seja, 1,25 mililitro (mL) de células para um frasco T25 onde mantínhamos 5 mililitros. Após, acrescentava-se meio de cultivo (MEM ou RPMI) e 5-10% de soro (soro fetal bovino ou soro equino). A cada processo de manutenção das células, considerava-se que elas sofreram uma passagem, que servia como indicativo para identificação dos frascos.

### **3.1.2 Descongelamento celular**

As células encontravam-se armazenadas em botijões de nitrogênio líquido, dentro de ampolas que deviam ser descongeladas rapidamente em banho-maria à 37°C. Após o descongelamento, o microtubo era centrifugado por dois minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente. Desprezava-se o sobrenadante, ressuspendendo o pellet de células em um mililitro (mL) de meio de cultivo próprio para as células e posteriormente, transferia-se para uma garrafa de cultivo T25, completando o volume com meio e 10% de soro fetal bovino ou soro equino.

### **3.1.3 Amplificação viral em cultivo celular**

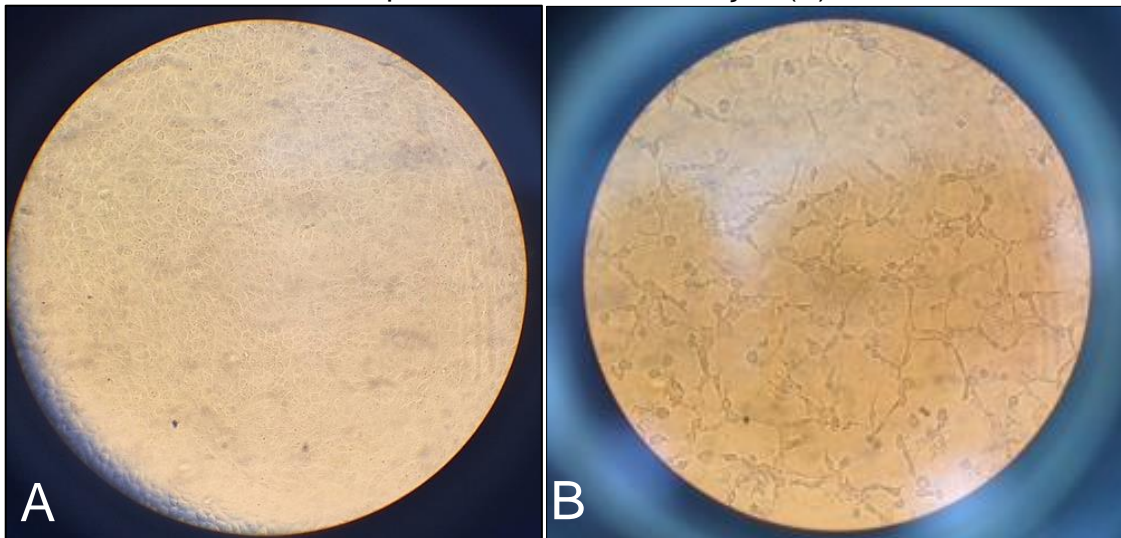
São necessárias grandes quantidades de vírus para a realização de alguns procedimentos virológicos, sendo essencial sua amplificação em sistemas biológicos, através da inoculação em: animais susceptíveis, ovos embrionados de galinha (OE) e cultivos celulares. A replicação viral em cultivo celular costuma ser realizada para obter estoque viral, utilizado para isolamento, testes sorológicos, caracterização biológica e molecular, estudos de patogenia, produção vacinas e de antígeno para a imunização de animais. Com quantidades mínimas de partículas víricas, é possível detectar e amplificar o vírus (BRUM; WEIBLEN, 2007).

No SV/UFSM, a amplificação foi realizada com o vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1 Singer) em células da linhagem MDBK. A amplificação viral, iniciava-se com a preparação de uma garrafa com células suscetíveis ao vírus (Figura 9-A),



obrigatoriamente preparada no dia anterior a inoculação, para que haja confluência de 60-70% na monocamada. Preparava-se a solução de vírus para ser inoculada, utilizando o menor volume possível como inóculo (250 µL a 3 mL). Era removido o meio de cultivo presente na garrafa e adicionado o inóculo, colocando a garrafa na estufa a 37°C durante 1 a 2 horas, agitando-a cada 15 minutos. Após o período na estufa, removia-se o inóculo e era adicionado o meio de cultivo contendo entre 2-5% de soro. A partir da inoculação, o cultivo era observado diariamente sendo possível visualizar o efeito citopático (Figura 9-B), até estar próximo de 100%, quando deve-se congelar o frasco a -80°C.

Figura 9- Cultivo celular de células MDBK (A). Células MDBK infectadas com BVDV-1 após 48 horas de inoculação (B).



Fonte: Muriel Becker (2020).

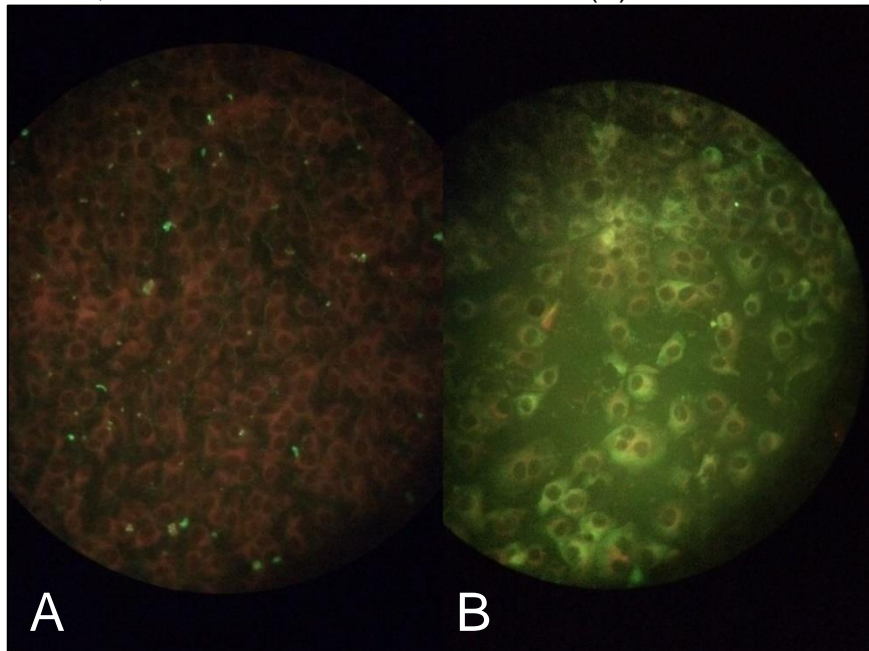
### 3.1.4 Imunofluorescência (IFA)

A imunofluorescência tem sido utilizada para a detecção de antígenos e de anticorpos contra diversos vírus. É considerada uma técnica rápida e de fácil execução, porém costuma apresentar reações inespecíficas, dificultando a interpretação do resultado (FLORES, 2007).

Iniciava-se a técnica com a preparação das lâminas e do material a ser utilizado, sendo possível ser impressões de tecidos, suabes de tecido ou cultivo celular. A partir do cultivo celular infectado, adicionava-se tripsina para individualização das células, solução de MEM e 10% de soro e incubava-se de 50-100 µL da suspensão por poço em lâmina de aderência celular durante duas horas

em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para formação de monocamada celular. Após, as lâminas eram fixadas em acetona gelada (4°C) por 5 minutos para possibilitar a formação de poros na membrana celular que permitirão o reconhecimento dos antígenos pelo anticorpo. As lâminas eram lavadas em PBS e depois em água destilada com movimentos suaves para evitar o descolamento da monocamada, secando-as em seguida. A seguir, era adicionado o anticorpo (Ac) primário em quantidade suficiente para cobrir o poço da lâmina, incubando-se a lâmina por 1 hora em estufa à 37°C. Repetia-se as etapas de lavagem e secagem, adicionando o Ac secundário e levando a estufa à 37°C por mais uma hora. Realizava-se a lavagem e secagem das lâminas, em seguida, corava-as em corante negativo (Evans Blue) durante 5 minutos, lavando e secando após corar. Para leitura das lâminas em microscópio de epifluorescência, pingava-se uma gota de glicerol e colocava uma lamínula sobre a gota. A figura a seguir exemplifica células negativas e células positivas para o teste de IFA para BVDV (Figura 10).

Figura 10- Células MDBK coradas pela técnica de imunofluorescência indireta para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Células negativas, não infectadas (A), células positivas, infectadas e marcadas em verde (B). Aumento de 400X.



Fonte: Muriel Becker (2020).



### **3.1.5 Produção de vacina autógena para papiloma (Bovino, Equino e Canino)**

No SV, foi possível acompanhar a produção de vacinas autógenas para bovinos e caninos. Foram produzidas 6 vacinas para papilomatose bovina e 1 vacina para papilomatose canina. Em bovinos, as vacinas devem ser administradas em três doses de 15 mL em intervalos de 21 dias entre as aplicações. Para a produção da vacina são necessários 4,5 g de tecido com lesões típicas papilomatosas para bovinos e 0,6 g deste material para cães. As amostras de tecido eram lavadas em água corrente e maceradas, quando necessário utilizava-se areia estéril. Após a maceração adicionava-se 10% do material de solução de Hanks, ou seja, 1 vacina = 4,5 gramas = 45 mL de solução de Hanks, 4,5 mL de clorofórmio e congelava-se a solução em -20°C durante a noite. No dia seguinte, o material era descongelado, agitado suavemente por 30 minutos e centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada. Após, o sobrenadante era coletado e acrescentava-se ao volume final 0,25% de formol (puro), 1% de penicilina e estreptomicina. Por fim, a vacina era aliquoteada em frascos de 45mL (uma dose/animal) e uma amostra era submetido ao exame bacteriológico. Após o resultado do exame negativo, a vacina era liberada para utilização.

### **3.1.6 Soroneutralização quantitativa para BVDV**

A soroneutralização quantitativa era realizada em uma microplaca de 96 cavidades, onde, reservava-se as quatro primeiras colunas da primeira placa para controle do vírus e de célula com 50 µL de meio. Nas linhas A e B (colunas 5 até 12, na primeira placa e em todas as linhas das demais placas) adicionava-se 60 µL de meio e 40 µL de soro para testes, nas demais colunas 50 µL de meio. Os poços das colunas 11 e 12 eram reservados para o soro controle positivo e soro controle negativo.

Com auxílio da pipeta multicanal diluía-se as amostras. A linha "A" permanecia como controle de toxicidade do soro, iniciando a diluição do soro na linha "B", transferindo 50 µL da linha B para a linha C, e assim por diante até a linha H. O vírus utilizado era diluído em 100 TCID ou 200 TCID 50/mL (conforme cepa utilizada) e adicionava-se 50 µL do vírus em todos os poços da coluna 5 a 12, na primeira placa, e em todas as colunas das demais placas, com exceção da linha A, que é o controle

de toxicidade. A diluição final do soro seria 1:5, na linha B, 1:10 na linha C e assim sucessivamente até a linha H onde a diluição seria de 1:320. Para fazer a titulação do vírus utilizado no teste, são 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000, adicionando 50 µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das linhas 3, 2 e 1. Na coluna 4 adicionava-se 50 µL de meio.

As placas eram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 2 horas. Durante o processo de incubação, preparava-se as células MDBK, tripsinizando uma garrafa e ressuspendendo em MEM acrescido de 5% de soro equino. Uma garrafa confluenta de células é suficiente para 4 placas. Um volume de 5mL era preparado por placa e adicionava-se 50 µL em cada poço. A contagem de células, sendo adicionado 20.000 células por poço ou  $2 \times 10^6$  células por placa. A placa ficava na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas e o título neutralizante era dado pela maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático.

### **3.1.7 Titulação viral em microplacas de 96 cavidades**

Para realização da titulação, o material era preparado anteriormente na capela e iniciávamos adicionando 50 µL de meio nos poços de uma placa de 96 cavidades. Após, eram preparadas as diluições, geralmente  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ , podendo variar. Adicionava-se 900 µL de MEM em sete microtubos com identificação de -1 a -7 e 100 µL da solução de vírus a ser titulada, transferindo para o tubo -1, agitando no vórtex, pipetando 100 µL para o tubo -2, passando no vórtex e assim por diante, até a última diluição. Era adicionado 50 µL de cada diluição em uma coluna da placa, iniciando pela maior até a menor diluição, deixando uma linha como controle, sem adição de vírus. As células eram preparadas e adicionava-se 50 µL em cada cavidade da placa, incubando-a por 96 horas na estufa de CO<sub>2</sub>. Para completar o volume necessário, utilizávamos MEM acrescido de 10% de soro.

Os efeitos citopáticos eram visualizados no microscópio e a validação da técnica dependia da ausência de efeitos no controle celular e da diminuição do número de efeitos com a progressão da diluição, sendo possível calcular o título.

### 3.2 LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO EM MEDICINA VETERINÁRIA

O LDMV realizava atividades de ensino e extensão, como aulas práticas de diversas disciplinas e cursos presenciais ministrados pelos professores. Além de executarem múltiplos projetos de pesquisa, realizados pela equipe composta pelos estagiários, bolsistas de iniciação científica, mestrandos e doutorandos. Serão abordadas as diferentes técnicas observadas e realizadas durante o período de estágio. As atividades são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Atividades acompanhadas e realizadas durante o estágio no LDMV.

<b>Atividades</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Análise das sequências de DNA	10	17,8
Confecção de meios de cultivo celular	5	8,9
Congelamento celular	3	5,4
Cultivo celular	*	-
DAPI	2	3,6
Descongelamento celular	5	8,9
Extração de DNA	10	17,8
Isolamento viral	5	8,9
Lavagem e esterilização	*	-
Plaqueamento de células	3	5,4
Purificação e envio para sequenciamento	1	1,8
Reação da cadeia em polimerase	8	14,3
RT-PCR	3	5,4
Titulação viral	1	1,8
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>100</b>

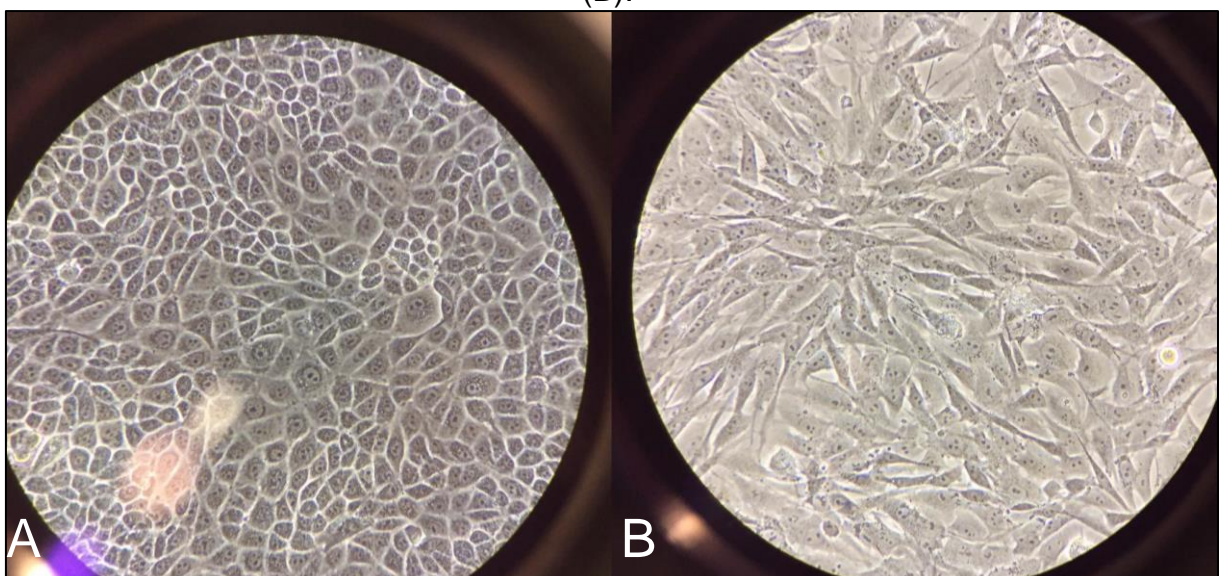
\* O cultivo celular, lavagem e esterilização eram parte da rotina do laboratório, realizados conforme a necessidade, não sendo possível contabilizar.

### 3.2.1 Cultivo celular e isolamento viral

Segundo Flores (2007), a identificação de vírus, após o seu isolamento em cultivo celular é o método direto mais utilizado em diagnóstico virológico. A amostra suspeita é inoculada em células animais cultivadas *in vitro* e a replicação viral é percebida pela produção de efeito citopático (ECP) ou pela detecção de proteínas ou ácidos nucléicos virais nas células.

No estágio no LDMV foi possível cultivar as linhagens celulares: célula de rim suíno (PK-15), célula de rim felino (CRFK), célula de rim canino (MDCK) e célula de rim de macaco-verde-africano (VERO). Inicialmente, realizou-se o cultivo de PK-15 e CRFK (Figura 11-A e B), que eram mantidas em garrafas plásticas de cultivo, com Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) acrescido de 10% ou 20% de SFB. Quando a monocamada atingisse 100% de confluência ou iríamos utilizar as células para inoculação viral, realizava-se a passagem celular, removendo o meio de cultivo da garrafa e lavando-a com PBS duas vezes. Em seguida, era adicionada a solução de tripsina para a etapa de tripsinização, mantendo-a na estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 5 minutos para que houvesse o desprendimento e individualização das células. Com as células individualizadas, se estivéssemos apenas realizando a manutenção das mesmas, mantínhamos a quantidade necessária de células e o restante era descartado, acrescentando o DMEM para completar o volume final.

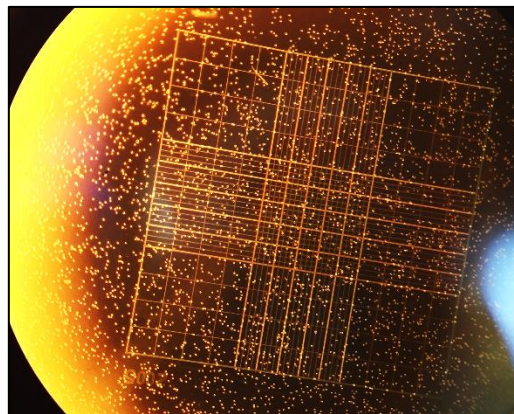
Figura 11- Cultivo de células de rim suíno (PK-15) (A) e células de rim felino (CRFK) (B).



Fonte: Muriel Becker (2020).

Caso fossemos realizar o plaqueamento das células em placa de 24 poços, mantínhamos toda solução de tripsina com as células e acrescentávamos 3 mL de DMEM com 10% ou 20% de SFB na garrafa, passando toda solução para um tubo plástico de 15 mL, após homogeneizar, retirando uma alíquota de 10  $\mu$ L, colocando-a na câmara de Neubauer, onde era realizada a contagem de células em cada quadrante no microscópio (Figura 12). O resultado era utilizado para calcular o volume de meio e de células que eram utilizados para nova semeadura. Após, a placa de 24 poços ficava na estufa por duas horas e depois deste período, era realizada a inoculação das amostras.

Figura 12- Visualização da câmara de Neubauer no microscópio para a contagem de células.



Fonte: Muriel Becker (2020).

As amostras isoladas nas células PK-15, eram provenientes da maceração de fetos suínos abortados (Figura 13), que já haviam sido testadas na técnica de PCR para parvovírus suíno (PPV) e obtido resultado positivo. Foram isoladas 38 amostras em placas de 24 poços, já contendo 400  $\mu$ L de células da linhagem PK-15 em DMEM acrescido de 10% de SFB, mantendo-as na estufa. Eram realizadas avaliações diárias com o intuito de detectar a presença de efeito citopático, causado pela replicação do vírus. Todas as amostras demonstraram efeito citopático na camada celular, de 24 a 96 horas após a primeira passagem, como mostra na Tabela 3. Na segunda passagem, observou-se ECP em 24 horas em todas as amostras.

Figura 13- Feto suíno proveniente de um aborto, enviado para diagnóstico.



Fonte: Muriel Becker (2018).

Tabela 3- Resultados obtidos no isolamento viral em células PK-15 e PCR das amostras suspeitas para parvovírus suíno.

<b>Amostras</b>	<b>P1</b>	<b>Efeito citopático</b>	<b>P2</b>	<b>Efeito citopático</b>	<b>PCR</b>
1	72H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
2	48H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
3	48H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
4A	-	-	-	-	Positivo
4B	Inconclusivo	-	-	-	Positivo
6 <sup>a</sup>	48H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
6B	48H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
8	72H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
9	96H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
10	96H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
12	96H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
14	96H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
20	48H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
22	72H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
39	72H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
40	72H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
41	72H	Positivo	24H	Positivo	Negativo

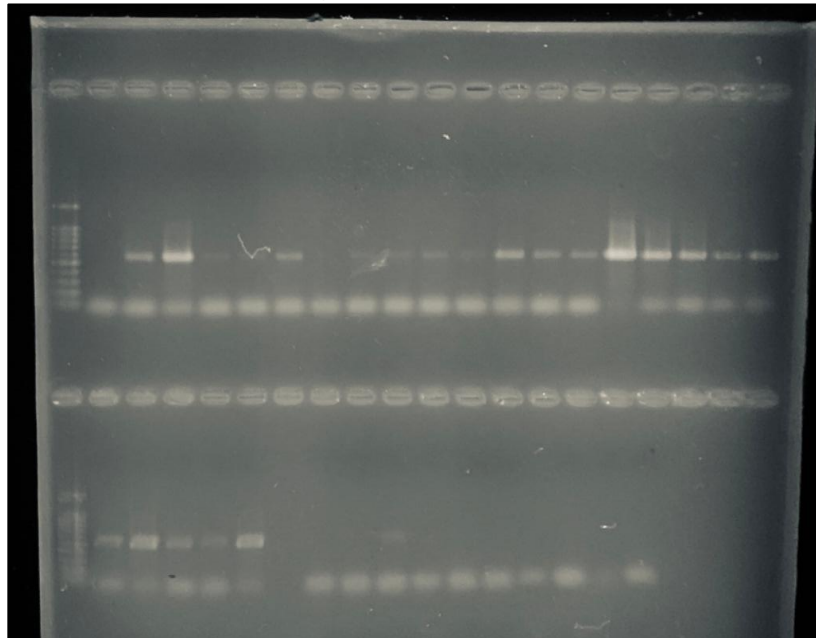
42	72H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
47	72H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
51	96H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
56	72H	Positivo	24H	Positivo	Negativo
57	72H	Positivo	24H	Positivo	Positivo
58	72H	Positivo	-	-	Positivo
70	72H	Positivo	-	-	Negativo
75	72H	Positivo	-	-	Negativo
76	96H	Positivo	-	-	Positivo
77	72H	Positivo	-	-	Positivo
78	72H	Positivo	-	-	Positivo
79	48H	Positivo	-	-	Positivo
83	72H	Positivo	-	-	Negativo
85	72H	Positivo	-	-	Positivo
87	96H	Positivo	-	-	Positivo
88	96H	Positivo	-	-	Negativo
91	96H	Positivo	-	-	Negativo
92	72H	Positivo	-	-	Negativo
93	96H	Positivo	-	-	Positivo
95	72H	Positivo	-	-	Positivo
96	72H	Positivo	-	-	Negativo
97	96H	Positivo	-	-	Positivo

Após, iniciamos o isolamento viral de parvovírus canino (CPV) em garrafas, onde realizávamos o cultivo celular de CRFK. As amostras de parvovírus canino eram obtidas através de suabe retal de animais com sinais clínicos compatíveis com parvovirose e testados no teste imunocromático para CPV, onde obtiveram resultado positivo. Foram isoladas 23 amostras de CPV confirmadas por PCR convencional em gel de agarose (Figura 14). As garrafas eram preparadas e observadas ao microscópio, para verificar se a monocamada celular apresentava 60 a 80% de confluência. Objetivava-se assim que a infecção do vírus ocorresse em um momento onde as células encontravam-se em estágio de plena atividade de multiplicação celular, favorecendo a replicação do vírus intracelularmente. Posteriormente, era



adicionado 100  $\mu$ L do inóculo (amostra positiva) e a garrafa era mantida em estufa contendo CO<sub>2</sub>. Diariamente realizávamos avaliações para detecção de efeito citopático, onde percebia-se morte celular e destruição da monocamada. Na monocamada celular era possível observar efeito citopático do parvovírus canino a partir de 72 horas, quando eram congeladas em ultrafreezer à -80°C e reservadas até a próxima passagem (Figura 15). O objetivo das passagens simultâneas era de aumentar o título viral para a utilização futura destas cepas. Por fim, estas amostras eram congeladas para posterior sequenciamento e testes subsequentes.

Figura 14- Amostras de CPV confirmadas por PCR convencional em gel de agarose.



Fonte: Weslei Santana (2020).



Figura 15- Garrafas plásticas de cultivo celular de CRFK com isolamento viral de CPV.



Fonte: Weslei Santana (2020).

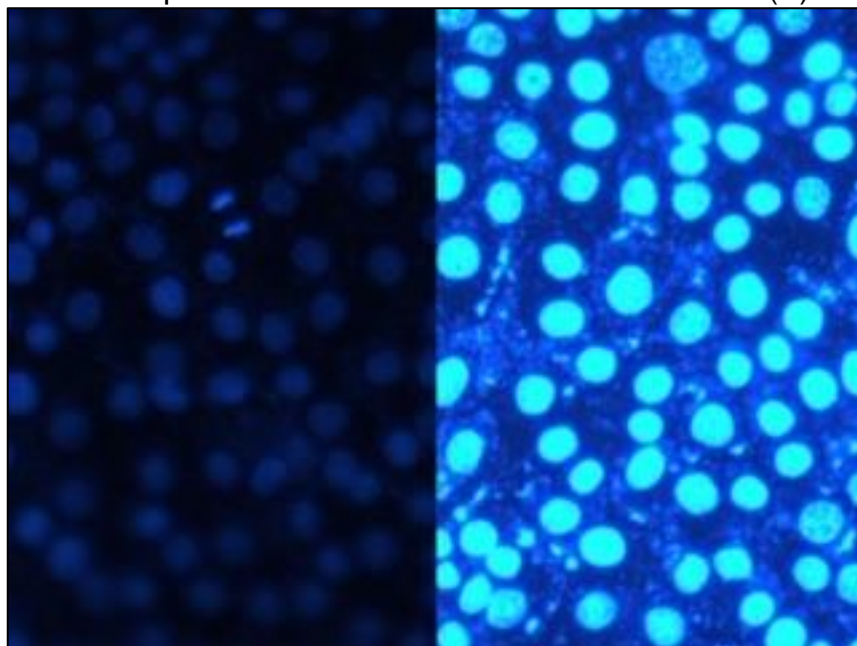
### 3.2.2 Coloração de DNA pelo DAPI

No cultivo celular, ao realizarmos a manutenção das células evita-se qualquer forma de contaminação, através da utilização de meios de cultura apropriados, esterilização adequada do material, técnicas seguras de manipulação e adição de antibióticos e antifúngicos aos meios, mas em algumas garrafas pode ocorrer contaminação por micoplasmas. Este contaminante não causa necessariamente alterações morfológicas, mas as culturas contaminadas podem apresentar diversas consequências como: taxa de crescimento alterada, citopatologias, aberrações cromossômicas, alterações no metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos, dentre outras (PERECMANIS et al., 2000).

Os micoplasmas não são visíveis ao microscópio óptico, necessita-se de testes específicos para que possamos detectá-lo. No LDMV, o teste que realizávamos era a Coloração de DNA pelo DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), um marcador fluorescente que emite a cor azul brilhante. Iniciávamos o teste, utilizando uma pinça para colocar uma lamínula em um poço da placa de 24 poços. Concomitante, era realizada a passagem celular, onde retirava-se todo meio de cultivo presente na garrafa e adicionava-se tripsina para a etapa de tripsinização. Após, era colocado 1 mL de DMEM suplementado na garrafa, homogeneizando todo conteúdo e era retirada uma alíquota de células. Essa alíquota era colocada sobre a lamínula que está dentro do poço da placa de 24 poços. Em seguida, era colocado imediatamente, 300  $\mu$ L de DMEM suplementado em cada poço onde foram colocadas as células. Após 24 horas do plaqueamento, o meio era retirado da placa, descartado e o poço

lavado com 300  $\mu$ L de PBS. Acrescentava-se 300  $\mu$ L de formaldeído 10% ou metanol que agia por 10 minutos e repetia-se a lavagem com PBS. Colocávamos 300  $\mu$ L do corante DAPI para agir por 4 minutos, depois era retirado e a lavagem realizada novamente. Por fim, a lamínula era retirada e sobreposta em uma lâmina, virada para baixo. Com o auxílio de um microscópio de fluorescência, verificava-se a presença de contaminação por micoplasma, sendo perceptível através de grânulos ao redor do núcleo das células (Figura 16).

Figura 16- Ausência de micoplasma em cultivo celular de rim canino (A) e presença de micoplasma em cultivo de células de rim suíno (B).



Fonte: Weslei Santana (2020).

### 3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

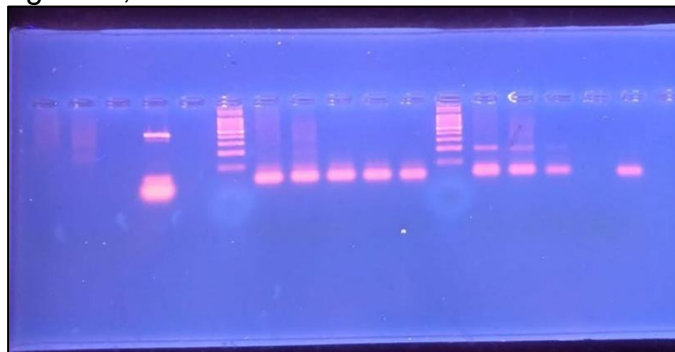
A reação em cadeia da polimerase é uma técnica de biologia molecular com alta sensibilidade e especificidade, com capacidade de detectar quantidades mínimas do ácido nucléico-alvo em amostras e amplificar o número de moléculas a partir da molécula-alvo original (BRUM; WEIBLEN, 2007; FLORES, 2007; GREENE, 2015).

No LDMV, o DNA era extraído das amostras suspeitas de parvovírus suíno ou canino utilizando-se o kit New Gene, contendo os reagentes necessários para realizar a extração de DNA por sílica. Após, realizávamos a PCR, utilizando Master mix, água purificada, os primers Wilhelm P1 for 5'-ctccctgagactctgccatc-3' e P2 rev 5'-gctgcctctttccacagaa-3' para parvovírus suíno, utilizados para amplificar uma porção

do genoma, acrescentando o DNA da amostra. A reação de PCR ocorria com a utilização do termociclador, com ciclagem constituída de uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 38 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento de 56°C por 30 segundos, extensão de 72°C por 30 segundos e, por fim, um anelamento final de 72°C por 2 minutos. Das 39 amostras suspeitas para parvovírus suíno analisadas, 22 delas, amplificaram seus fragmentos para a sequência de primers utilizados, como mostra na Tabela 3.

Para amostras suspeitas de parvovírus canino, os primers utilizados foram o 555 rev 5'-ggtgctagttgatatgtaataaaca-3' e 555 for 5'-caggaagatatccagaagga-3', VP2M for 5'- gccggtgcaggacaagtaaa-3', VP2M rev 5'- ggtgtaagcccaatgctct-3', H rev 5'- ttggataaactggtggt- 3' e H for 5'- caggtgatgaattgctaca-3. A reação era constituída de uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento de 55°C por 30 segundos, extensão de 72°C por 1 minuto e, por fim, um anelamento final de 72°C por 2 minutos. A cada ciclo duplica-se o número de moléculas correspondentes à sequência-alvo e, ao concluir a reação, obtêm-se milhões de cópias idênticas (BRUM; WEIBLEN, 2007). Essas moléculas foram visualizadas através da eletroforese em géis de agarose, corados com brometo de etídio, sob luz ultravioleta (Figura 17).

Figura 17- Gel de agarose, corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.



Fonte: Muriel Becker (2019).

### 3.2.4 Purificação

A purificação das amostras positivas era realizada com o kit Mebep Bioscience. As amostras utilizadas na purificação são oriundas da amplificação utilizando os três pares de primers que compreendem toda a sequência genotípica do capsídeo do parvovírus canino CPV-2.

Iniciávamos a purificação, separando um eppendorf contendo a amostra, onde adicionávamos três vezes o volume da amostra de solução Buffer DD e homogeneizávamos o conteúdo, que em seguida era transferido para a coluna, onde descansava por 1 minuto em temperatura ambiente. Realizávamos a centrifugação por 1 minuto e o eppendorf contendo o líquido era descartado. Em um novo eppendorf de 2 mL, encaixávamos a coluna e era adicionado 600 µL de solução WB, centrifugando-o por 1 minuto. A solução era descartada do eppendorf por inversão e o eppendorf era novamente centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm. Adicionava-se 30 µL de solução de eluição (EB) morna, no fundo da coluna que permanecia em descanso por 3 minutos e era centrifugada por 1 minuto. Por fim, descartava-se a coluna e o eppendorf era congelado e enviado para sequenciamento.

### 3.2.5 PCR em tempo real (RT- PCR)

A PCR em tempo real é uma técnica que amplifica uma sequência nucleotídica específica de uma amostra e permite que as etapas de amplificação sejam monitoradas durante o processo, utilizando sondas marcadas com substâncias indicadoras que são liberadas a cada ciclo de amplificação. Existem diversas sondas fluorescentes, incluindo Sybrgreen, sondas de hidrólise (sondas 5'-nuclease ou Taqman), brometo de etídio, sondas de hibridização, entre outras. Cada sonda possui características diferentes, mas todas emitem fluorescência a cada ciclo de amplificação. O sinal emitido a cada ciclo é, então, captado e quantificado por um software acoplado a um microcomputador. A RT-PCR permite o acompanhamento da reação, a quantificação dos ácidos nucléicos presentes na amostra e reduz significativamente o tempo de realização comparada a PCR convencional (FLORES, 2007; TIZARD, 2014). Além de serem mais sensíveis e específicas, evitam a manipulação com brometo de etídio, utilizado na PCR convencional (VIEIRA, 2011).

No LDMV, utilizávamos a técnica de RT-PCR para quantificar o DNA de

vacinas de parvovírus canino. Para quantificação das amostras utilizou-se uma qPCR, utilizando o Primer For 5'-TGGAAGTAGTGGCACACCAA (número de posição nucleotídea 3456–3473, de acordo com as cepas de parvovírus canino de referência CPV-N, GenBank número de acesso: M19296), Primer Rev 5'-AAATGGTGGTAAGCCCAATG (3636–3655) e sonda 5'-CAGGTGATGAATTTGCTACAGG (3555–3576). Como curva padrão, um plasmídeo (265) contendo sequência alvo do CPV-2, obtido através da introdução de um material amplificado e purificado, precedidos de clonagem em células de *Escherichia coli*. O material obtido através da clonagem foi purificado e diluído sucessivamente em base 10, estabelecendo pontos de uma curva padrão. A reação totalizou 14 µL sendo 7 µL 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 utilizado 0,25 µL por reação. O volume de DNA extraído (kit New Gene- SIMBIOS) foi de 2 µL e o restante foi completado com água ultrapurificada.

Como condições termométricas, estabeleceu-se a temperatura de desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, precedidos de 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, hibridização à 56 °C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos. O material amplificado desta reação foi equivalente a 202 pb. A unidade escolhida para a apresentação dos resultados foi o número de cópias por material amplificado, sendo a unidade calculada através da utilização do método fluorimétrico quantitativo, Qubit, utilizando Qubit dsDNA BR Assay Kit, ThermoFisher.

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1 PARVOVIRIDAE**

Os parvovírus são pequenos, esféricos, não apresentam envelope e tendem a ser específicos para uma espécie. Dependem de células em divisão para a sua replicação, pois utilizam a maquinaria celular para a síntese de DNA e replicação do genoma viral. As infecções por parvovírus costumam afetar órgãos com células em multiplicação, como a medula óssea e o epitélio intestinal. São muito estáveis no ambiente e em determinadas condições, conseguem manter-se viáveis por meses (MORAES; COSTA, 2007).

#### **4.1.1 Parvovírus suíno**

A infecção pelo parvovírus suíno (PPV) é uma das causas mais importantes de falhas reprodutivas em suínos, ocasionando morte fetal, mumificação, natimortos, além da diminuição da eficiência produtiva e perdas econômicas (SOBESTIANSKY et al., 1999; ABREU et al., 2018). Em animais adultos não-gestantes, a infecção pelo PPV resulta no desenvolvimento de resposta imune rápida e vitalícia contra o vírus, sem manifestações clínicas.

##### **4.1.1.1 Epidemiologia**

O parvovírus suíno está amplamente distribuído na população suína mundial, sendo enzoótico praticamente em todos rebanhos (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007). A introdução do PPV em uma criação pode ocorrer através da aquisição de reprodutores infectados, podendo haver transmissão do vírus pelo contato com secreções nasais, genitais, placenta, fetos e fezes dos animais infectados. O cachaço pode infectar-se na cobertura de fêmeas infectadas e disseminar o vírus, através do sêmen (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007; ALVARENGA, 2013; ABREU, 2018).

Em geral, a maioria das instalações de uma granja podem estar contaminadas, mas as maiores concentrações de PPV são encontradas nas baias das porcas em reprodução, sendo uma fonte constante de infecção (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007). A transmissão do vírus ocorre de forma horizontal e vertical. A horizontal ocorre, principalmente, pelo contato oronasal entre animais e com secreções e excreções de animais infectados. A transmissão vertical acontece através da fêmea suína gestante para a leitegada (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007; ALVARENGA, 2013).

#### 4.1.1.2 Patogenia

Após a infecção dos animais, o PPV irá se replicar em células em alta atividade mitótica como as células de tecidos linfoides, tecidos embrionários ou fetais, glândulas salivares, pulmões, medula óssea e criptas intestinais (MORAES; COSTA, 2007; ALVARENGA, 2013; TRUYEN; STRECK, 2019). A viremia ocorre de dois a cinco dias após a infecção e os anticorpos contra o parvovírus podem ser detectados de cinco a sete dias, atingindo níveis máximos quatorze dias depois do animal se infectar (SOBESTIANSKY et al., 1999; BORDIN, 2010). Nas porcas não prenhes, o PPV provoca uma infecção que não apresenta sinais clínicos aparentes, mas produz uma potente resposta imune. Persistindo a infecção, ocorrerá a replicação viral nas criptas intestinais e consequente excreção do agente nas fezes, contribuindo para a contaminação ambiental (MORAES; COSTA, 2007; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). Essas fêmeas infectadas pelo parvovírus suíno mantêm a concentração de anticorpos muito elevada, os quais, consegue transferir a sua prole através da ingestão de colostro. Os leitões se tornam resistentes à infecção pelo PPV, até que a imunidade passiva diminua, por volta de 3 a 6 meses de idade tornando-os susceptíveis à infecção (MORAES; COSTA, 2007; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016; SANTOS; ALESSI, 2017).

A infecção das porcas durante a prenhez frequentemente resulta em infertilidade nas fêmeas, morte embrionária, aborto, mumificação e suínos natimortos. Caso a infecção ocorra no início da prenhez, na fase embrionária (até 30 dias depois da concepção) geralmente resulta na morte do embrião e reabsorção, o que pode ser interpretado de forma errônea como infertilidade generalizada e retorno ao cio. Se não sobreviverem embriões suficientes para estimular a produção de hormônios que mantenham a gestação, a fêmea pode retornar ao cio (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). No entanto, se a infecção fetal ocorrer entre o 30º e o 70º dia de gestação, geralmente ocorrem morte e mumificação fetal. É comum observarmos fetos mumificados em diferentes fases de desenvolvimento juntamente com leitões saudáveis, se a gestação for mantida. Dependendo da quantidade de natimortos e mumificados pode ocorrer retardo na partição (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007). Após os 70 dias de gestação, o vírus não causa efeito sobre os fetos, pois, eles começam ser imunocompetentes, apresentando capacidade de responder imunologicamente com a produção de anticorpos específicos frente à infecção. Neste caso, os anticorpos já

podem ser detectados no soro do neonato (MORAES; COSTA, 2007; BORDIN, 2010; TRUYEN; STRECK, 2019).

#### 4.1.1.3 Manifestações clínicas

A infecção pelo parvovírus suíno costuma passar despercebida nos animais adultos. As únicas manifestações clínicas comumente observadas, são as falhas reprodutivas apresentadas pelas fêmeas nulíparas e caracterizam-se por um aumento na taxa de retorno ao cio, interrupção no ganho de peso no final da gestação, gestação prolongada, leitegadas pequenas, abortos, natimortalidade aumentada ou o nascimento de fetos mumificados em diferentes estágios de desenvolvimento (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007; ABREU et al., 2018; TRUYEN; STRECK, 2019). Nos machos, a infecção é assintomática e não afeta a qualidade do sêmen (SOBESTIANSKY et al., 1999).

#### 4.1.1.4 Diagnóstico

A parvovirose suína deve ser considerada sempre que forem observados os sinais clínicos da doença descritos anteriormente. Porém, é imprescindível fazer o diagnóstico confirmativo, através de exames laboratoriais, devido a outras doenças como leptospirose, toxoplasmose, brucelose, doença de Aujeszky e síndrome respiratória e reprodutiva do suíno (SRRS) provocarem problemas reprodutivos semelhantes (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007; TRUYEN; STRECK, 2019). O diagnóstico da parvovirose suína pode ser realizado através da detecção do vírus ou de anticorpos. O material encaminhado para o laboratório para confirmação do diagnóstico geralmente inclui fetos mumificados, restos fetais e fragmentos de tecidos necróticos. Os fetos e os leitões podem apresentar grande quantidade de antígenos virais ou de anticorpos e pode-se usar diversas técnicas para a confirmação da infecção nesses animais, como imunofluorescência, ELISA, hemaglutinação, soroneutralização, PCR e inibição da hemaglutinação, que é o método de referência e o mais amplamente utilizado para a detecção de anticorpos contra o PPV (SOBESTIANSKY et al., 1999; MORAES; COSTA, 2007).

Segundo Moraes e Costa (2007), para fins de diagnóstico, o exame sorológico para a detecção de anticorpos contra o PPV em rebanhos não é tão eficaz, devido à presença do vírus na maioria das criações de suínos, os animais irão entrar em contato com o agente durante sua vida, obtendo-se maior parte dos resultados positivos.



O isolamento do vírus em cultura celular, também é uma técnica de diagnóstico utilizada devido ao efeito citopático causado pelo PPV. Como ECP, são observadas inclusões intranucleares, núcleo picnótico, forma irregularidade, vacúolos citoplasmáticos, granulações, replicação lenta e morte celular (TRUYEN; STRECK, 2019). No entanto, o cultivo celular exige um maior tempo e os tecidos dos fetos podem ser tóxicos para o cultivo, tornando a técnica inviável (SOBESTIANSKY et al., 1999; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016; TRUYEN; STRECK, 2019). Atualmente, a técnica de reação em cadeia da polimerase é uma das mais eficientes para o diagnóstico do PPV, devido a sua especificidade e sensibilidade é possível a detecção do vírus em tecidos fetais, sêmen, órgãos das matrizes e outras amostras. Associada a PCR em tempo real, possibilita a quantificação dos resultados (MCKILLEN et al., 2007; TRUYEN; STRECK, 2019).

#### 4.1.1.5 Controle e prevenção

Não há um tratamento específico para o parvovírus suíno e devido a isto, medidas de higienização e manejo devem ser implementadas para manter a sanidade da criação. Para uniformização da imunidade do plantel, utilizam-se duas medidas: a vacinação e a retroinfecção. A retroinfecção ou feedback baseia-se no contato direto das leitoas, antes da cobertura, com porcas do plantel ou material supostamente infectado como fezes, restos de placenta e fetos mumificados, para que adquiram imunidade natural (SOBESTIANSKY et al., 1999; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). A vacinação é o método mais utilizado como controle do PPV, tendo como principal objetivo estimular a imunidade do animal, principalmente nas nulíparas, evitando infecção intrauterina (SOBESTIANSKY et al., 1999; DIAS, 2010; ABREU et al., 2018). As vacinas disponíveis são elaboradas com o vírus inativado. Estas vacinas são seguras e eficazes contra o PPV mesmo sendo administradas em conjunto com outros agentes em vacinas polivalentes. A vacinação induz títulos de anticorpos que podem reduzir as manifestações clínicas e prevenir a infecção dos fetos, mesmo quando a fêmea é exposta ao vírus durante a gestação. Os protocolos de vacinação devem ser realizados em todos os reprodutores da granja, podendo ser ajustados conforme a categoria animal (MORAES; COSTA, 2007; DIAS, 2010; ABREU et al., 2018; TRUYEN; STRECK, 2019).

### 4.1.2 Parvovírus canino

A parvovirose canina é uma enterite viral causada pelo parvovírus canino (CPV) e é considerada uma das principais causas de diarreia em cães. Consiste em uma enfermidade altamente contagiosa, comumente diagnosticada em animais jovens. É caracterizada por episódios de hematoquezia, vômitos, febre, anorexia, apatia e desidratação. Apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo maior em filhotes que em adultos (MORAES; COSTA, 2007; VIEIRA, 2011; SANTANA et al., 2019).

#### 4.1.2.1 Epidemiologia

A parvovirose canina é causada pelo parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), que apresenta três variantes antigênicas, denominadas de CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, surgidas a partir de mutações na proteína do capsídeo viral (GREENE; DECARO, 2015; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). O CPV-2 consegue infectar cães domésticos de todas as raças e também, outros canídeos, como lobos, cachorros-domato, raposas e coiotes (HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016; GUEDES et al., 2017).

A infecção pelo CPV pode ocorrer por diversas vias, sendo a orofecal a mais comum, como resultado do contato dos cães com fezes contaminadas no ambiente. Segundo Hesse, Trible e Rowland (2016), cães infectados pelo CPV podem excretar o vírus nas fezes por até 10 dias após o início da infecção. Os seres humanos, instrumentos veterinários, roedores, insetos e demais objetos podem servir como vetores ou fômites. Nos animais acometidos, a infecção pelo parvovírus canino não resulta necessariamente em doença aparente, não desenvolvendo, nem apresentando sinais clínicos, em especial quando existem anticorpos maternos residuais (GREENE; DECARO, 2015; SANTANA et al., 2019). Quando há apresentação clínica, geralmente é mais grave em caninos filhotes em crescimento rápido e coinfetados com outros patógenos (GREENE; DECARO, 2015).

#### 4.1.2.2 Patogenia

Após a exposição oronasal a secreções e excreções de animais infectados, o vírus entra no organismo e inicia o período de incubação, que varia de 7 a 14 dias e em testes experimentais, um período relativamente menor que varia de 4 a 5 dias (SANTANA et al., 2019). Depois deste período, o vírus se replica nos tecidos linfoides e, em seguida, atinge a corrente sanguínea. A replicação viral requer a infecção de células em constante replicação, com rápida divisão celular, como a medula óssea,

criptas intestinais e os tecidos linfoides, principalmente o timo, as tonsilas, os linfonodos e o baço (MORAES; COSTA, 2007; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). Observa-se viremia intensa do primeiro ao sexto dia após a infecção e cessa por volta do quinto ou sexto dia, quando apresenta anticorpos neutralizantes no soro. Os animais que possuem imunidade parcial, apresentam apenas infecção subclínica ou formas clínicas mais brandas (MORAES; COSTA, 2007). A excreção do vírus nas fezes inicia-se no terceiro dia após a exposição e geralmente antes do aparecimento dos sinais clínicos. Na maioria dos cães, o CPV é eliminado nas fezes de 7 a 12 dias após a infecção (GREENE; DECARO, 2015; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016).

#### 4.1.2.3 Manifestações clínicas

A infecção pelo parvovírus canino foi associada a três tecidos principais, sendo eles, o trato gastrointestinal, medula óssea e miocárdio. Observa-se acentuada variação na manifestação clínica frente à infecção intestinal, que vai desde infecção subclínica a doença aguda fatal. Ocorre infecção subclínica na maioria dos cães, principalmente em filhotes caninos com títulos de anticorpos de origem materna, que podem protegê-los da doença, mas não da infecção (GREENE; DECARO, 2015).

O sinal clínico representativo da infecção por CPV-2 é a enterite hemorrágica aguda, que pode progredir rapidamente, conforme condição imunológica do animal e de fatores ambientais. Os principais sinais clínicos observados são anorexia, letargia, hipertermia, desidratação, vômitos, seguidos por diarreia sanguinolenta decorrente da extensa destruição de epitélio intestinal acompanhada de leucopenia por linfopenia (PEREIRA, 2015; GREENE; DECARO, 2015; SANTOS; ALESSI, 2017). Os animais podem apresentar outras complicações clínicas decorrentes de infecção secundária e juntamente com a infecção viral no trato intestinal podem levar ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, culminando em choque séptico e morte (GREENE; DECARO, 2015; PEREIRA, 2015).

A forma miocárdica da doença pode ocorrer em neonatos, após a infecção intrauterina ou nas primeiras seis semanas de idade. Geralmente todos os filhotes de uma ninhada são acometidos e apresentam morte súbita ou sinais inespecíficos e, posteriormente demonstram sinais de insuficiência cardíaca. Essa forma clínica da doença atualmente é raramente encontrada em cães infectados por parvovírus, diminuindo desde a disseminação pandêmica original do CPV-2 no final da década de 1970. Após esse período, a maioria das cadelas foi vacinada ou exposta a cepas do CPV, tendo desenvolvido respostas imunológicas, passando o alto título de anticorpos

de origem materna para os filhotes lactentes. Através da ingestão do leite, evita-se a ocorrência de infecção neonatal com o vírus no início da vida do animal, quando está ocorrendo a replicação de células miocárdicas (MORAES; COSTA, 2007; VIEIRA, 2011; GREENE; DECARO, 2015; PEREIRA, 2015).

#### 4.1.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico presumível para parvovirose canina é feito pelo histórico, sinais clínicos e hemograma. A apresentação de diarreia sanguinolenta de odor fétido em cães jovens é indicativa de infecção por CPV-2. Porém, nem todos os cães que apresentarem essa manifestação clínica estão necessariamente infectados, e a infecção por CPV-2 pode produzir diarreia não hemorrágica (MORAES; COSTA, 2007; GREENE; DECARO, 2015; SANTANA et al., 2019). No hemograma poderá ser observado leucopenia, proporcional à gravidade e ao estágio da doença no momento da coleta do sangue do animal. Cães com sintomatologia grave, em geral, apresentam contagens leucocitárias totais iguais ou inferiores a 1030 células por microlitro (GREENE; DECARO, 2015).

O diagnóstico definitivo de parvovirose canina exige a identificação do vírus por testes específicos. Os testes antigênicos de ELISA para detecção de antígenos nas fezes são específicos, porém pouco sensíveis para detectar infecção pelo CPV e o período de eliminação fecal costuma ser curto, correspondendo aos primeiros dias de doença clínica (GREENE; DECARO, 2015). Pode-se realizar outras técnicas, como a identificação do vírus por teste de hemaglutinação (HA), imunofluorescência, imunocromatografia, inibição da hemaglutinação ou soroneutralização podem ser utilizados para diagnóstico definitivo (VIEIRA, 2011; GREENE; DECARO, 2015; PEREIRA, 2015). Segundo Greene e Decaro (2015), a sorologia não é o melhor método para diagnosticar infecção pelo CPV, pois a maioria dos cães são vacinados ou já foram expostos ao agente. Em contrapartida, os testes sorológicos podem ser úteis para avaliar os títulos de anticorpos maternos em filhotes caninos ainda não vacinados.

Pode-se realizar o isolamento do vírus a partir de amostras teciduais ou fecais, em cultivo celular das linhagens MDCK e A-72 de origem canina ou em células CRFK de origem felina (MORAES; COSTA, 2007). O isolamento viral apresenta desvantagens, como o tempo necessário para realização da técnica e a baixa sensibilidade (VIEIRA, 2011). Os métodos moleculares para detecção do DNA viral, como a reação em cadeia da polimerase, apresentam alta sensibilidade para detecção

do vírus e permitem obter resultados em pouco tempo e com grande precisão. Juntamente, com a utilização da PCR em tempo real, pode-se estimar a carga viral presente na amostra clínica (VIEIRA, 2011; STRECK et al., 2013).

#### 4.1.2.5 Tratamento

Não há um tratamento específico para o parvovírus canino, sendo a prevenção da infecção, a melhor maneira para o controle dessa doença. O tratamento realizado é baseado na reposição hidroeletrólítica e na sintomatologia clínica apresentada pelo animal, associados a prevenção de uma infecção bacteriana secundária. O tratamento hídrico é muito importante para o tratamento clínico e deve prosseguir enquanto os vômitos ou a diarreia persistirem (GREENE; DECARO, 2015; PEREIRA, 2015; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). Hipoglicemia e hipopotassemia podem ser diagnosticadas e devem ser corrigidas por via intravenosa (GREENE; DECARO, 2015).

O uso de antibióticos é recomendado, já que a infecção intestinal por parvovírus canino acaba suscetibilizando o paciente a entrada de bactérias resultando em infecções secundárias intestinais. Nesse caso, os antibióticos de amplo espectro são empregados, os que desempenham ação contra as bactérias Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, como as enterobactérias que são comuns nas infecções intestinais (GREENE; DECARO, 2015; SANTANA et al., 2019). Os antieméticos são úteis para reduzir a perda de líquido através do vômito e ajudam a diminuir o desconforto do paciente. Costuma-se realizar restrição da ingestão de sólidos e líquidos, que é mantida até dois dias após suspensão do vômito e redução da diarreia. Inicia-se, então, o fornecimento de pequenas quantidades de água, e, introdução gradual da dieta (PEREIRA, 2015).

#### 4.1.2.6 Controle e prevenção

Os surtos de enterite causados pelo CPV são de difícil controle. O vírus é bastante resistente no ambiente, consegue manter sua virulência por meses e devido a isso, deve-se dar atenção ao habitat dos animais. A vacinação, o isolamento dos cães infectados e a descontaminação das instalações que abrigavam os animais acometidos são essenciais para conter a disseminação do parvovírus (HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016). Lembrando que cães assintomáticos podem eliminar o CPV-2 em suas fezes e infectar outros animais saudáveis. Para a limpeza rigorosa do ambiente, apenas detergentes e desinfetantes comuns não são capazes de inativar o vírus. No entanto, este pode ser inativado por soluções de hipoclorito de sódio e de

cloro diluído (1:20), auxiliando no controle e prevenção de novas infecções (VIEIRA, 2011; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016).

A maneira mais efetiva de prevenção da parvovirose canina é a vacinação dos filhotes, que deve ser realizada seguindo os diferentes protocolos de aplicação, recomendados nas bulas das vacinas. Os protocolos de vacinação tentam estimular a imunidade ativa dos animais à medida que a imunidade passiva declina, porque a imunidade obtida da transferência materna, pode neutralizar o vírus vacinal, interferindo na sua eficácia e até mesmo inativá-lo até a 18ª semana de idade. Para reduzir a interferência das imunoglobulinas maternas, é recomendado a utilização de vacinas de vírus vivo modificado que contenha altos títulos virais, além das vacinações múltiplas para a imunização do filhote. Recomenda-se também, manter os animais isolados até completarem a fase de imunização, cuidando a higienização do local (MORAES; COSTA, 2007; HESSE; TRIBLE; ROWLAND, 2016).

## 5. CONCLUSÃO

O estágio curricular obrigatório foi de extrema importância para o desenvolvimento profissional, pois possibilitou a vivência e o acompanhamento da rotina de trabalho dos profissionais dos laboratórios de diagnóstico. Foi possível adquirir muito conhecimento em ambos os locais, colocando em prática e aprimorando muitos dos ensinamentos obtidos durante a graduação. Juntamente ao crescimento profissional, destaca-se o crescimento pessoal, compreendendo a importância do trabalho em equipe e do debate sobre o que foi realizado e acompanhado, formando assim, senso crítico.

Em respeito às duas doenças infecciosas discutidas, destaca-se a relevância dos vírus, que apesar de serem os menores e mais simples microrganismos que existem, conseguem causar grandes problemas nos animais, independente da espécie. Percebeu-se também, a importância e dependência das técnicas laboratoriais para determinação do diagnóstico definitivo das doenças. Ressaltando que a prevenção é o melhor método para evitar o parvovírus, que pode levar a perdas econômicas e ao óbito dos animais.

Portanto, o estágio serviu para reforçar a certeza da profissão escolhida e o interesse na área da virologia em medicina veterinária.

## REFERÊNCIAS

ABREU, Muriel Becker *et al.* O que há de novo sobre a parvovirose em suínos. *In:* BORTOLOZZO, Fernando Pandolfo *et al.* **Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos III: anais do XI sinsui-simpósio internacional de suinocultura.** Porto Alegre: Ufrgs, 2018. Cap. 10. p. 69-76.

ALVARENGA, Thales Coelho de. **PESQUISA DE PARVOVÍRUS SUÍNO E *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS COM CIRCOVIROSE SUÍNA DO ESTADO DE GOIÁS.** 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária e Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

BORDIN, Roberto de Andrade. **Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira spp.* na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos.** 2010. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BRUM, Mário Celso S.; WEIBLEN, Rudi. DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS. *In:* FLORES, Eduardo Furtado. **VIROLOGIA VETERINÁRIA.** Santa Maria: Editora Ufsm, 2007. Cap. 3. p. 59-86.

DIAS, Alessandra Silva. **CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E PARVOVÍRUS SUÍNO: ESTUDO DO ENVOLVIMENTO EM ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS EM MARRÃS E PORCAS DE PRIMEIRO A TERCEIRO PARTO.** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

EVERMANN, James F. *et al.* Diagnóstico Laboratorial de Infecções Causadas por Vírus e Riquétsias e Epidemiologia Clínica das Doenças Infeciosas. *In:* GREENE, Craig E.. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos.** 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. Cap. 1. p. 1-10.

FLORES, Eduardo Furtado. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES VÍRICAS. *In:* FLORES, Eduardo Furtado. **VIROLOGIA VETERINÁRIA.** Santa Maria: Editora Ufsm, 2007. Cap. 11. p. 297-326.

GREENE, Craig E.; DECARO, Nicola. Enterite Viral Canina. *In:* GREENE, Craig E.. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 8. p. 69-82.

GREENE, Craig E.. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos.** 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. 1370 p.

GUEDES, Roberto Maurício Carvalho; BROWN, Corrie C.; SEQUEIRA, Júlio Lopes; REIS JUNIOR, Janildo Ludolf. Sistema Digestório. *In:* SANTOS, Renato de Lima; ALESSI, Antonio Carlos. **Patologia Veterinária.** 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. Cap. 3. p. 86-180.



HESSE, Richard A.; TRIBLE, Benjamin R.; ROWLAND, Raymond R. Parvoviridae e Circoviridae. *In*: MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M. M.. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. Cap. 49. p. 360-369.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 364 p.

MCKILLEN, John; HJERTNER, Bernt; MILLAR, Andrena; MCNEILLY, Francis; BELÁK, Sandor; ADAIR, Brian; ALLAN, Gordon. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. **Journal Of Virological Methods**. Amsterdam, v. 140, p. 155-165, mar. 2007.

MORAES, Mauro Pires; COSTA, Paulo Renato dos Santos. PARVOVIRIDAE. *In*: FLORES, Eduardo Furtado. **VIROLOGIA VETERINÁRIA**. Santa Maria: Editora Ufsm, 2007. Cap. 14. p. 377-395.

PERECMANIS, Simone; LIBERAL, Maira Halfen Teixeira; ANDRADE, Claudio de Moraes; PEREIRA, Luiz Otavio Barroso; OLIVEIRA, Luiz Claudio Motta de. Utilização de técnicas direta (cultivo) e indireta (coloração de DNA pelo DAPI) para detecção de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p. 171-174, dez. 2000. Editora Cubo.

PEREIRA, César Augusto Dinóla. Parvovirose Canina. *In*: JERICÓ, Márcia Marques; ANDRADE NETO, João Pedro de; KOGIKA, Márcia Mery. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. Cap. 88. p. 2420-2436.

SANTANA, Wesley de Oliveira; LENCINA, Michele Machado; BERTOLAZZI, Sabrina; SILVEIRA, Simone; STRECK, André Felipe. Parvovírus canino: uma abordagem evolutiva e clínica. **Medicina Veterinária (Ufrpe)**, v. 13, n. 4, p. 526-533, 8 jul. 2019. Medicina Veterinaria (UFRPE).

SANTOS, Renato de Lima; ALESSI, Antonio Carlos. **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. 856 p.

SOBESTIANSKY, Jurij; MORES, Nelson; ROEHE, Paulo M.. Parvovirose Suína. **Suinocultura Dinâmica**, v. 21, n. 7, p. 1-5, jun. 1999.

STRECK, André Felipe; RÜSTER, Dana; TRUYEN, Uwe; HOMEIER, Timo. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. **Journal Of Virological Methods**, v. 193, Leipzig, p. 6-8, out. 2013.

TIZARD, Ian R.. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 1217 p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2017. 861 p.

TRUYEN, Uwe; STRECK, André Felipe. Parvoviruses. *In*: ZIMMERMAN, Jeffrey J. *et al.* **Diseases of Swine**. 11. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2019. Cap. 38. p. 611-621.

VIEIRA, Maria João Nobre de Matos Pereira. **PARVOVIROSE CANINA**. 2011. 266 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto, 2011.

WILHELM, Sonja; ZIMMERMANN, Pia; SELBITZ, Hans Joachim; TRUYEN, Uwe. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. **Journal of Virological Methods**, Germany, v. 134, p. 257-260, 9 fev. 2006.