

DIAGNÓSTICO DA PARVOVIROSE CANINA PELA TÉCNICA DE HEMAGLUTINAÇÃO¹

Alexandre do Rosário CASSEB²
Livia Medeiros Neves CASSEB³
Conceição de Maria Almeida VIEIRA⁴
Daniel Stangarlin de CAMARGO⁵
László MOLNÁR⁶
Laszlone Eva MOLNÁR⁷

RESUMO: O objetivo deste trabalho é determinar a presença do CPV (*parvovirus canino*) em cães através da técnica de hemaglutinação (HA), comparando três diferentes tipos de hemácias, primatas não humanos (*Cercopithecus aethiops* e *Cebus apella*) e suínos (*Sus scrofa domestico*). Foram examinadas 146 amostras fecais de animais que apresentavam diarreia e 20 amostras fecais de animais sadios (sem diarreia). Foi diagnosticado CPV em 95 (65.07%) animais doentes, e em nenhum dos animais sadios. Este trabalho demonstra, pela primeira vez, a utilização de hemácias de macaco-prego (*Cebus apella*) para a prova de hemaglutinação, demonstrando sensibilidade de 100% e especificidade de 14.0%; valor preditivo do teste (VPT) positivo de 68.35%, VPT negativo de 0.00% e acurácia de 70.0%. A sensibilidade das hemácias de macaco verde africano é de 98.0% e especificidade de 51.0%, VPT positivo 78.81%, VPT negativo 92.86% e acurácia 82.0%. A sensibilidade das hemácias de suíno é de 94.0% e especificidade de 67.0%, VPT positivo 83.96%, VPT negativo 85.0% e acurácia 84.0%. O teste de hemaglutinação, utilizando hemácias de suínos, tem maior especificidade e acurácia frente às demais hemácias utilizadas para o diagnóstico de CPV.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Hemaglutinação, *Parvovirus canino*, *Cercopithecus aethiops*, *Cebus apella*, *Sus scrofa domestico*.

¹ Aprovado para publicação em 15.01.09

² Médico Veterinário, M. Sc., Professor Adjunto da UFRA, Belém (PA).

³ Médica Veterinária, mestranda em Patologia das Doenças Tropicais pela UFPA, contratada na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua (PA).

⁴ Farmacêutica Bioquímica, Dra., Professora Adjunta da UFRA, Belém (PA).

⁵ Médico Veterinário, mestrando em Patologia das Doenças Tropicais pela UFPA.

⁶ Médico Veterinário, Dr., Professor Aposentado.

⁷ Médica Veterinária, Dra., Professora Aposentada.

DIAGNOSIS OF THE CANINE PARVOVIRUSES THROUGH THE HEMAGGLUTINATION ASSAY

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the presence of the PVC (*canine Parvovirus*) in dogs through hemagglutination (HA) assay, comparing three different types of red blood cells: not human primates (*Cercopithecus aethiops* and *Cebus apella*) and swine (*Sus scrofa domestico*). 146 fecal samples from animals with diarrhea and 20 fecal samples from healthy animals (without diarrhea). CPV was diagnosed in 95 (65.07%) from sick animals, and healthy animals were negative to CPV. This study demonstrates for the first time the use of red blood cells from brown capuchin (*Cebus apella*) to the hemagglutination assay, demonstrated sensitivity of 100% and specificity 14.0%; the positive predictive value test (PVT) 68.35%, negative PVT 0.00% and accuracy 70.0%. The sensitivity of the red blood cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) was 98.0% and specificity 51.0%, positive PVT 78.81%, negative PVT 92.86% and accuracy 82.0%. The sensitivity of the red blood cells from swine (*Sus scrofa domestico*) 94.0% and specificity 67.0%, positive PVT 83.96%, negative PVT 85.0% and accuracy 84.0%. The hemagglutination assay using swine red blood cells has greater specificity and accuracy when compared with the others red blood cells.

INDEX TERMS: Hemagglutination, *Parvovirus canine*, *Cercopithecus aethiops*, *Cebus apella*, *Sus scrofa domestico*.

1 INTRODUÇÃO

O *Parvovirus canino 2* (CPV 2) é um vírus da família *Parvoviridae*, sendo um exemplo de vírus emergente, pois há publicações de estudos sorológicos demonstrando que o CPV não estava nos cães domésticos nos Estados Unidos da América, Japão ou Austrália antes de 1978, mas foi detectado em todos os três países naquele ano, causando gastroenterite aguda em cães (AFSHAR, 1981; PARRISH; CARMICHAEL; ANTCZACK, 1982).

Hagiwara et al. (1980) relatam o isolamento do CPV 2, no estado de São Paulo, em 1980, e Correa e Correa (1992) descrevem que durante a década de 1980 a enfermidade foi encontrada epizooticamente, sendo assinalada em quase todos os estados brasileiros.

Análises antigênicas demonstraram que o CPV vem se modificando desde sua primeira descrição em cães. Um novo tipo antigênico do vírus surgiu dois ou três anos após a identificação do CPV 1. Esta variante aparentemente foi sendo

substituída pelo CPV 2, havendo uma aparente substituição do vírus original pelas variantes (PARRISH; BURTONBOY; CARMICHEL, 1987). Recentemente, três variantes do CPV 2 são reconhecidas CPV 2a, CPV 2b (GREENWOOD et al., 1996; IRUYEN et al., 1996) e CPV 2c, recentemente detectado em diversos países (MARTELLA et al., 2004; NAKAMURA et al., 2004; SHACKELTON et al., 2005; DECARO et al., 2006, 2007; PÉREZ et al., 2007).

Adetecção do vírus ou antígenos virais em fezes pode ser realizada por meio de vários métodos, tais como a microscopia eletrônica (HERBST et al., 1987; DURIGON et al., 1987; KOLBI e KLIMENTOWSKI, 1993), a imunodifusão em gel de ágar (IDAG) (GUANASEELAN et al., 1993B), a imunoperoxidase (GUANASEELAN et al., 1993A), a hemaglutinação (HA) (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980; MATHYS et al., 1983; DURIGON et al., 1987; MOHAN et al., 1992; CUBEL GARCIA et al., 2000), entre outras.

A utilização de métodos de hemaglutinação (HA), para diferentes vírus, depende da variação de pH, que, segundo Senda et al. (1988), em condições propícias de pH e temperatura, o CPV hemaglutina hemácias de algumas espécies:

suínos, macaco verde africano, caninas, roedores, felinos e equinos. Esta capacidade, porém, tem sido reportada como sendo mais bem observada com hemácias de macaco verde africano e suínos; nas demais espécies, segundo Carmichael, Joubert e Pollock (1980), a HA se apresenta bastante irregular, por isso esses testes podem ser realizados diretamente nas amostras fecais para indicar a presença de *Parvovirus*.

Paralelamente aos testes baseados na detecção do antígeno, testes sorológicos têm sido desenvolvidos para testar anticorpos ao anti-CPV no sangue, incluindo a inibição de hemaglutinação (WALKER et al., 1980; GORSKI et al., 1993; CUBEL GARCIA et al., 2000), hemólise radial (FASTIER, 1981), ELISA (MADIC et al., 1987; TABOR et al., 1987; RIMMAZWAAN et al., 1990; HARA et al., 1994) e Imunofluorescência indireta (KOLBI; SCHÜLLER, 1988). Devido à prevalência de anticorpos ao *Parvovirus*, o diagnóstico sorológico de infecção efetiva requer evidência de soroconversão ou a presença de anticorpos da classe IgM (GREENE, 1990).

O objetivo deste trabalho é avaliar o método baseado em hemaglutinação para detecção do CPV em fezes de cães, comparando três diferentes tipos de hemácias: primatas não

humanos (*Cercopithecus aethiops* e *Cebus apella*) e suínos (*Sus scrofa domestico*).

2 MATERIAL EMÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 146 cães, a partir de três semanas de idade até cinco anos de idade, que apresentavam gastroenterite (vômitos e/ou diarreias) de qualquer origem ou tipo. Também, foram analisados 20 animais, a partir de três semanas até cinco anos de idade, clinicamente saudáveis. Todos os animais incluídos no estudo foram obtidos por demanda espontânea em uma clínica veterinária situada no município de Ananindeua (Pará), durante o ano de 1997.

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram colhidas amostras de 1 mL de fezes e acondicionadas a -20°C. As amostras foram suspensas em PBS (tampão fosfato) gelado, com pH de 7,2 na proporção de 1:10 e centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos, então, o sobrenadante foi tratado com 1/10 volume de clorofórmio, agitado por 10 minutos, sendo essas amostras centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, e testadas para atividade hemaglutinante.

2.3 COLETA DE SANGUE E PREPARAÇÃO DAS HEMÁCIAS

Foram coletados, aproximadamente, 5 mL de sangue em seringas estéreis contendo 15 mL de anticoagulante. As amostras colhidas foram estocadas em geladeira (4°C) por no mínimo 24 horas e no máximo por sete dias.

2.3.1 Primatas não humanos

A coleta foi realizada por punção da artéria femoral, após adequada tranquilização dos animais do Centro Nacional de Primatas, onde os animais eram mantidos com alimentação adequada e água “ad libitum”.

2.3.2 Suínos

A coleta de sangue dos suínos foi realizada por meio de punção cardíaca (animais de até seis meses de idade) e da veia auricular (animais com mais de seis meses de idade).

2.3.3 Preparo das hemácias

As hemácias de suínos (*Sus scrofa domestica*) e macacos (*Cebus apella* e *Cercopithecus aethiops*) foram lavadas três vezes

com PBS (tampão fosfato) em 1000 a 2000 rpm por 10 minutos, por vez e suspendidas a 1% (v/v) em PBS contendo 0,1% de SAB (Soro Albumina Bovina), sendo estocadas a 4°C, usadas durante três dias após sua preparação, sendo descartadas se a hemólise fosse evidente.

2.4 REALIZAÇÃO DOS TESTES

Os testes de hemaglutinação (HA) e inibição de hemaglutinação (HI) foram realizados em microplacas com fundo em “U”, segundo recomendações de Carmichael, Joubert e Pollock (1980). Foi utilizado um *Kit* comercial de Diagnóstico *in vitro* para *Parvovirus*⁸ para os controles positivos e negativos das provas de HA e HI.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculados valores de sensibilidade e especificidade da prova de HA com cada um dos tipos de hemácias utilizados, e comparados através do método da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) para distribuição de probabilidades, segundo Ayres et al. (2007); utilizando-se como teste padrão a prova de HI para as diferentes hemácias utilizadas.

2.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos realizados com os animais ocorreram sob supervisão de médico veterinário e sempre visando ao bem-estar animal, conforme recomenda o Manual do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (MEZADRI; TOMAZ; AMARAL, 2004).

3 RESULTADOS

Os resultados para a prova de HA com hemácias de macaco-prego (*Cebus apella*), macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e suínos (*Sus scrofa domestica*) encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2.

Através do método da curva ROC pode-se verificar que os pontos de corte para os testes de HA, para cada tipo de hemácia, foram de 0.86-1.00 para macaco prego, 0.49-0.98 para macaco verde africano e 0.33-0.94 para hemácias de suíno. Os valores de *d* (distância para o eixo y) foram de 0.86, 0.49 e 0.34, respectivamente; sendo que quanto menor o valor de *d*, mais confiável o teste (Figura 1). Tendo por base esses resultados, admite-se como padrão ouro o teste com menor valor de *d*. Além disso, verifica-se que, apesar de

⁸ On-site Biotech, Upsala, Suécia

ser menos sensível, a HA, utilizando hemácias de suínos, é mais específica e apresenta maior acurácia.

Na Tabela 3, observam-se as amostras negativas na prova de HI em animais doentes e seus respectivos títulos na prova de HA,

demonstrando que títulos maiores ou iguais a 640 são considerados positivos para as hemácias de macaco-prego, títulos maiores ou iguais a 320 são considerados positivos para as hemácias de macaco verde africano, e títulos maiores ou iguais a 160 são considerados positivos para hemácias de suínos.

Tabela 1 - Índices estatísticos calculados pelo *Screening test* e pelo *Receiver Operating Characteristic Curve* (curva ROC)

Resultados	Origem das hemácias		
	Macaco prego	Macaco Verde	Suíno
Total de doentes	95	95	95
Total de sadios	51	51	51
Ponto de corte	0.86. 1.00	0.49. 0.98	0.33. 0.94
Distância (d)	0.86	0.49	0.34
Área	0.5687	0.7444	0.8018
Sensibilidade	1.00	0.98	0.94
Especificidade	0.14	0.51	0.67
Valor preditivo positivo	68.35%	78.81%	83.96%
Valor preditivo negativo	0.00%	92.86%	85.00%
Falso-positivos	86.27%	49.02%	33.33%
Falso-negativos	0.00%	2.11%	6.32%
Acurácia	0.70	0.82	0.84
Erro padrão	0.049	0.0404	0.0357
Intervalo de confiança 95%	0.4726 a 0.6647	0.6652 a 0.8235	0.7318 a 0.8717

Tabela 2 -Validação do teste de HA em diferentes tipos de hemácias.

Tipo de hemácias	Positivo verdadeiro		Falso positivo		Falso negativo		Negativo verdadeiro		Sensibilidade %	Especificidade %
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
	MACACO PREGO	95	65	44	86.27	0	0	7	5	100%
MACACO VERDE	93	64	25	49.02	2	2.11	26	18	98.0%	51.0%
SUINO	89	61	17	33.33	6	6.32	34	23	94.0%	67.0%

Positivo verdadeiro: positivo em HA e HI; Falso positivo: positivo em HA e negativo em HI; Falso negativo: negativo em HA e positivo em HI; Negativo verdadeiro: negativo em HA e HI

*A determinação da sensibilidade e da especificidade foram efetuados de acordo com a descrição de Ayres et al (2007), tendo como teste padrão a inibição da hemaglutinação (HI)

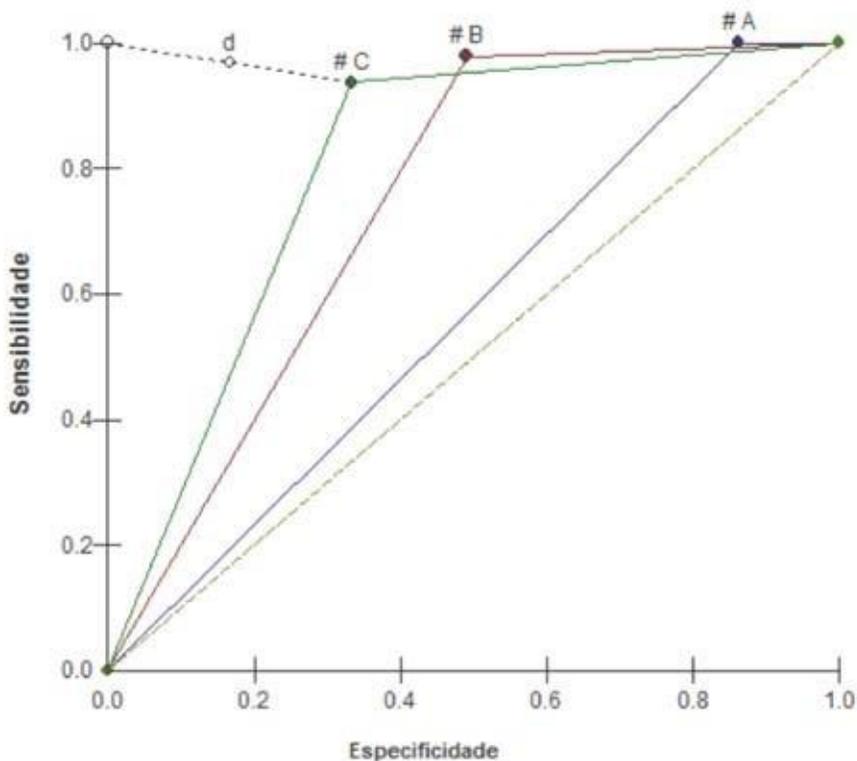


Figura 1 - Receiver Operating Characteristic Curve (curva ROC) diferentes pontos de corte; hemácias de (A) macaco-prego, (B) macaco verde, (C) suíno, (d) teste de melhor desempenho, mais próximo do padrão ouro.

Tabela 3 - Número de amostras negativas em HI de animais com diarreia, conforme o tipo de hemácias utilizadas e seus respectivos títulos em HA:

Tipo de hemácia	Títulos de HA									Total
	Neg	10	20	40	80	160	320	640	1280	
M. PREGO	7	15	9	4	8	3	5	0	0	51
M. VERDE	26	15	5	3	2	1	0	0	0	51
SUÍNO	34	8	6	2	1	0	0	0	0	51

Na Tabela 4, são demonstradas as amostras positivas para HI em animais doentes e seus respectivos títulos na prova de HA. Nota-se que houve mais amostras positivas com hemácias do macaco-prego (95 amostras positivas) do que com as hemácias de macaco verde africano (93 amostras positivas) e de suínos (87 amostras positivas). Títulos altos (1280) foram observados em hemácias de macaco-prego em 33 amostras; em hemácias de macaco verde africano, 16 amostras; em hemácias de suínos, 13 amostras.

Na Tabela 5, são evidenciadas as amostras negativas na HI em animais sadios e seus respectivos títulos na prova de HA, demonstrando que títulos menores a 160 são considerados negativos nas hemácias de macaco-prego; títulos menores a 80 são considerados negativos nas

hemácias de macaco verde africano; e títulos menores a 40 são considerados negativos nas hemácias de suínos.

Na Tabela 6, observa-se a prova de HA de 20 animais sadios, negativos na prova de HI, usando hemácias de macaco-prego, macaco verde africano e suíno. Sendo que na prova de HA, usando hemácias de macaco prego, 14 amostras foram falso-positivas e 6 amostras verdadeiramente negativas, dando especificidade de 14.0%. As hemácias de macaco verde africano tiveram 10 amostras falso-positivas e 10 verdadeiramente negativas, dando especificidade de 51.0%. As hemácias de suínos tiveram 7 amostras falso-positivas e 13 verdadeiramente negativas, dando especificidade de 67.0%.

Tabela 4 - Número de amostras positivas em HI em animais com diarreia, conforme o tipo de hemácias utilizadas e seus respectivos títulos em HA:

Tipo de hemácia	Títulos das fezes									Total
	Neg	10	20	40	80	160	320	640	1280	
M. PREGO	0	0	8	9	14	7	10	14	33	95
M. VERDE	2	7	18	17	13	9	7	6	16	93
SUÍNO	6	10	14	15	15	7	7	6	13	87

Tabela 5 - Amostras negativas (n=20) em HI de animais sadios (sem diarreia) e seus respectivos títulos em HA.

Tipo de hemácia	Títulos das fezes									Total
	Neg	10	20	40	80	160	320	640	1280	
M. PREGO	6	7	5	1	1	0	0	0	0	20
M. VERDE	10	8	1	1	0	0	0	0	0	20
SUÍNO	13	6	1	0	0	0	0	0	0	20

Tabela 6 - Hemaglutinação: Especificidade de animais sadios negativos na prova de HI.

TIPO DE HEMÁCIA	FALSO POSITIVO		VERDADEIRAMENTE NEGATIVO		ESPECIFICIDADE
	Nº	%	Nº	%	
	M. PREGO	14	70	6	30
M. VERDE	10	50	10	50	50
SUÍNO	7	35	13	65	65

4 DISCUSSÃO

Apesar de os sinais clínicos da parvovirose canina serem sugestivos em animais jovens, percebe-se que muitos animais, com gastroenterite de diversas origens, têm sinais clínicos idênticos aos desta enfermidade, tornando-se, então, necessária a confirmação laboratorial para o diagnóstico das infecções pelo CPV em cães. A demonstração do CPV, ou antígenos do CPV nas fezes, é o método mais utilizado, pois os métodos de isolamento viral e microscopia eletrônica são mais dispendiosos e exigem mais tempo para sua realização (RIMMAZWAAN et al., 1990). A prevalência de CPV em cães com diarreia aguda, neste trabalho (65.07%), corrobora os valores encontrados por Cubel Garcia et al (2000) em Niterói (RJ).

Quando se comparou, neste trabalho, a prova de HA de animais doentes e sadios, que foi negativo à prova de HI, notou-se que ocorreu redução das respostas inespecíficas em animais sadios, nos três diferentes tipos de hemácias (Tabela 5). Deste modo, em fezes diarréicas pode haver proteínas ou outras substâncias e/ou outros patógenos que, também, podem hemaglutinar hemácias dessas espécies de animais. Este fator foi bem evidente quando se usou hemácias de

macaco-prego, em que ocorreram maiores títulos inespecíficos.

A utilização de clorofórmio, na preparação das amostras de fezes, mostrou-se importante na redução da inespecificidade na prova de HA, com qualquer tipo de hemácia utilizada. Porém, Mathys et al. (1983) relataram que o tratamento com clorofórmio não influenciou nos resultados obtidos nesta prova. Provavelmente, há substâncias inespecíficas nas fezes que são eliminadas após tratamento com clorofórmio, mas o uso do teste de HI, com soro hiperimune específico, descarta este problema (RIMMAZWAAN et al., 1990).

A prova de HA mostrou diferenças de sensibilidade e especificidade entre os três tipos de hemácias estudadas, sendo títulos considerados, sempre, positivos para hemácias de macaco prego maiores ou iguais a 640, hemácias de macaco verde maiores ou iguais a 320 e hemácias de suínos maiores ou iguais a 160. Carmichael, Joubert e Pollock (1980) e Mohan et al. (1992), utilizando esta mesma técnica, consideraram que títulos superiores a 320 com hemácias de suínos são considerados positivos.

Na maioria das vezes, houve a necessidade da realização da prova de HI para

confirmação do diagnóstico, pois existiram títulos baixos que foram positivos na prova de inibição da hemaglutinação. Provavelmente, esta diferença de títulos considerados positivos esteja relacionada com o grau de concentração das hemácias das amostras utilizadas (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980) ou com baixas concentrações de vírus.

Não houve diferença significativa das hemácias estudadas quando as amostras foram verdadeiramente positivas; porém, houve diferença significativa entre amostras falso-positivas ($p < 0.001$), nas quais o macaco prego teve maior índice destes tipos de amostra.

Os valores preditivos do teste (VPT), positivo e negativo, indicam, com o teste positivo, as probabilidades de o indivíduo ter a doença; e de não tê-la, com o teste negativo, respectivamente, sendo melhores os resultados do VPT positivo das hemácias de suíno (83.96%) e VPT negativo das de macaco verde (92.86%); tendo ainda a acurácia do teste apontando para o uso preferencial de hemácias de suíno.

A técnica de HA acompanhada da técnica de HI com soro hiperimune específico é o ideal para a demonstração do CPV nas fezes de animais

doentes. Porém, o trabalho rotineiro depende de uma fonte de hemácias constantes e renováveis semanalmente, estando estes dados de acordo com Correa e Correa (1992).

Na prova de HI, é utilizado soro hiperimune. Mas, a presença de inibidores termolábeis ou isoaglutininas dificulta a realização da prova (GÓRSKY et al. 1993), sendo a absorção do soro feita pelo acréscimo de 50% de suspensão de hemácias de suínos (APPELL; SCOTT; CARMICHAEL, 1979; CARMICHAEL, JOUBERT; POLLOCK, 1980).

Devem ser levados em consideração os seguintes critérios, que talvez possam variar: títulos maiores ou iguais a 160 com hemácias de suínos (*Sus scrofa domestica*), títulos maiores ou iguais a 320 com hemácias de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e títulos maiores ou iguais a 640 com hemácias de macaco-prego (*Cebus apella*) são considerados positivos para a Parvovirose Canina. Por outro lado, títulos inferiores aos descritos, respectivamente, não podem ser considerados negativos, sendo necessária a realização de prova de inibição da hemaglutinação com soro anti-CPV; sendo a inibição positiva, a amostra é considerada positiva, ou seja, o animal tem Parvovirose Canina, porém

a inibição negativa à amostra é considerada negativa, ou seja, o animal não tem parvovirose canina.

5 CONCLUSÃO

a) O teste de hemaglutinação, utilizando hemácias de suínos, tem maior especificidade e acurácia frente às demais hemácias de primatas não humanos utilizados neste trabalho.

b) Títulos baixos na prova de HA precisam ser confirmados com o teste de HI.

REFERÊNCIAS

AFCHAR, A. Canine parvovirus infections – a review. *Vet Bull.* v.51, n. 8, 605-602, 1981.

APELL, M. J. C.; SCOTT, F. W.; CARMICHAEL, L. E. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.*, v. 105, p.156-159, 1979.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *Bio Estat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM / MCT / CNPq., 2007

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT. J. C.; POLLOCK, R.V.H. Hemagglutination by canine parvovirus studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, p.784-791, 1980.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.* 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.551-559.

CUBEL GARCIA, R. C. N.; PINTO, A. M. V; COSTA A. P.; MACIEL, M. B.; OLIVERA, L. H. S.; NASCIMENTO, J. P.; SANTOS, A. O.; CASTRO, M. C. N.; WILLI, L. M. V; LABARTHE, N. V. Infecção pelo parvovirus canino em filhotes com gastroenterite em Niterói, Rio de Janeiro, Brasil de 1995 a 1997. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, 2000, v. 37, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-95962000000200008&Ing=pt&nrm=iso&tIng=pt>. Acesso em: 18 abr. 2006.

- DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, E.; MARI, V.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*, v.25, p.1161-1166, 2007
- _____ ; ELIA, G.; MARTELLA, V.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CAMERO, M.; CIRONE, F.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M. S.; NARCISI, D.; SCALIA, P.; BUONAVOGLIA, C. Characterization of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods*, v.133, p.92-99, 2006
- DURIGON, E. D.; ANGELQ, M, J. O.; JEREZ, J. A.; TANAKA, H.; HAGIWARA, M.K. Comparações entre as reações de hemaglutinação (HA), isolamento do vírus em culturas celulares (CC), imunoeletromosforese (JEOP) e imunomicroscopia eletrônica (IME), para o diagnóstico histológico da parvovirose canina. *Rev. Microbiol.*, v.18, p.205-210, 1987.
- FASTIER, L. B. A single radial hemolysis test for measuring canine parvovirus antibody. *Vet Rec.*, v.108, p.299-301, 1981.
- GORSKI, J.; DANIEL, A.; MIZAL, B. E.; ZWIERZCHOWSKI, J. Requirements for haemagglutination inhibition test for diagnosis of parvovirus infections of carnivores. *Bull. Vet Inst. Pulawy*, v.37, p.59-66, 1993.
- GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p.258-279.
- GREENWOOD, N. M.; CHALMERS, W. S. K.; BAXENDALE, W.; THOMPSON, H. Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Vet. Rec.*, v.138, p. 495-496, 1996.
- GUANASEELAN, L.; APPAJI-RAO, V. N.; RAMKRISHMA, J.; MANICKAM, R. Detection of canine parvovirus by immunoperoxidase test. *Cheiron*, v. 22, p.163-164, 1993a.
- _____ ; RAMKRISHMA, J., GANESAN, P. I, MANICKAM, R. Rapid assay for canine parvovirus by agar gel immunodiffusion test. *Cheiron*, v. 22, p.108-110. 1993b.

- HAGIWARA, M. K.; JULY, J. R.; BACCARO, M. R.; ANGELA M. J. O. Enterite hemorrágica em cães associada a infecção por um parvovírus. *Arq. Inst. Biol. S. Paulo*, v.47, p.47-49, 1980.
- HARA, M.; FUKUYAMA, M. L.; KISHIKAWA, S.; YAMAMOTE, S.; IKEDA, T. E.; KSUCHI, A.; TABUCHS, K. Detection of antibody to canine parvovirus by enzyme linked immunosorbent assay. *J. Jap. Vet. Med. Ass.*, v.47, p.335-338, 1994.
- HERBST, W.; DANNER, K.; LANGE, H. E.; KRAWS, H. Electron microscopic diagnosis of viral enteritis of dogs in 1980-1986. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, v.100, p. 325-328, 1987.
- IRUYEN, V.; EVERMANN, J. F.; VIELER, E.; PARRISH, C. R. Evolution of canine Parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*, v.215, p.186-189, 1996.
- KOLBI, S., KLIMENTOWSKI, S. Laboratory diagnosis of viral diseases in dogs and cats. Part 1. Viral infection in dogs. *Med. Vet.*, v. 49, p. 202-205. 1993.
- KOLBI, S.; SCHULLER, W. Indirect immunofluorescence, a rapid method for detecting antibodies to viral disease in dogs. *Dtsche. Tierärztl. Wschr.*, v.95, p.322-325, 1988.
- MADIC, J.; ZUPANCIC, Z.; RAMADAR, P.; LUGOVIC, B.; RAPIC, D. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies to canine parvovirus. *Vet. Arhiv*, v.57, p.197-201, 1987.
- MARTELLA, V.; CAVALLI, A.; PRATELLI, A.; BOZZO, G.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, D.; NARCISI, D.; TEMPESTAM.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.1333-1336, 2004.
- MATHYS, A.; MUELER, R. T.; PEDERSEN, N. C.; THEILEN, G. H. Comparison of immunofluorescence and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces. *Am. J. Vet. Res.*, v.44, p. 152-154, 1983.
- MEZADRI, T. J.; TOMAZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Ed. UFSC. COBEA, 2004. p. 78-80.

- MOHAN, R.; NAURIYAL, D. C.; SINGH, K. B.; MARGAT, A. P. S.; SINGH, G. K. Haemagglutination (HA) and haemagglutination inhibition (HI) tests for diagnosis of parvoviral infection in dogs. *Ind. J. Vet. Med.*, v.12, p.1-3, 1992.
- NAKAMURA, M.; TOHYA, Y.; MIYAZAWA, T.; MOCHIZUKI, M.; PHUNG, H. T.; NGUYEN, N.H.; 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. *Arch. Virol.*, v.149, p. 2261–2269, 2004.
- PARRISH, C. R.; BURTONBOY, G.; CARMICHAEL, L. E. Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virology*, v.163, p.230-232, 1987.
- _____ ; CARMICHAEL, L. E.; ANTCZACK, D. F. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Arch. Vir.*, v.72, p. 267-278, 1982.
- PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.*, abr. 2007 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>. Acesso em: 01 ago. 2007.
- RIMMAZWAAN, G. F.; JUMTTI, N.; KLINGEBORN, B.; GROEN, J.; UYTDEHAAG, G. C, M.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on monoclonal antibodies for the serology and antigen detection in canine parvovirus infections. *Vet. Quart.*, v.12, p.14-21, 1990.
- SENDA, M.; HIRAYAMA, N.; ITOH, O.; YAMAMOTO, H. Canine parvovirus; strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *J. Gen. Vir.*, v.69, p.349-354, 1988.
- SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.102, p.379–384, 2005.

TABOR, E.; PATERSON, R. M.; SMITH, J. R.;
SUARYANA, K. G.; BURGESS, G. W. Detection
of antibody to canine parvovirus in dog sera by
enzyme immunoassay. *Austr. Vet. J.*, v.64, p.220-
221, 1987.

WALKER, S. T. M.; FEILEN, C. P.; SABINE,
M.; LOVE, D. N.; JONES, R. F. A serological
survey of canine parvovirus infection in New
South Wales, Australia. *Vet. Rec.*, v.12, p. 324-
325, 1980.