

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALINE BAUMANN DA ROCHA GIZZI

VALOR DIAGNOSTICO DE PAINEIS DE PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECTAR
A PREVALÊNCIA DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE DIARREIA EM CÃES

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALINE BAUMANN DA ROCHA GIZZI

VALOR DIAGNOSTICO DE PAINEIS DE PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECTAR
A PREVALÊNCIA DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE DIARREIA EM CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador (a): Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile

CURITIBA

2014

PARECER

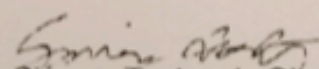
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

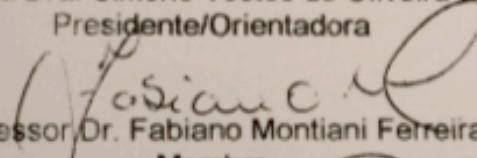


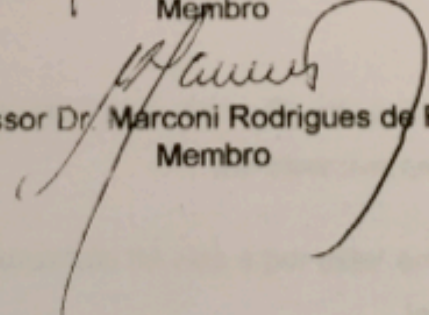
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "**VALOR DIAGNÓSTICO DE PAINÉIS DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECTAR CO-INFECÇÕES DE AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA EM CÃES**" apresentada pela Mestranda **ALINE BAUMANN DA ROCHA GIZZI** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 24 de março de 2014


Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile
Presidente/Orientadora


Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Membro


Professor Dr. Marconi Rodrigues de Farias
Membro

Dedico este trabalho aos meus pais, Acir e Roseli, que são o meu alicerce e sempre me incentivaram em todos os meus passos.

A minha vó Gilda, pelo exemplo de vida e por estar em todos os momentos ao meu lado com seu carinho fraternal.

E em especial ao meu marido Giuliano, amor da minha vida, por ser uma pessoa incrível, meu amigo e companheiro de todas as horas.

OBRIGADA POR FAZEREM PARTE DA MINHA VIDA!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio constante e incentivo em todos os passos da minha carreira. Em especial agradeço aos meus pais, Acir e Roseli, que sempre foram muito presentes e me ensinaram que o estudo é uma das coisas mais preciosas que uma pessoa pode ter. O apoio de vocês foi muito importante!

Ao meu marido Giuliano Gizzi, por fazer parte da minha vida de uma forma muito especial, sempre com muito amor e compreensão por minha ausência frente ao tempo dedicado a este e outros projetos. Obrigada meu querido, nada disso seria possível sem você!

A toda a equipe da Clinivet e do Clinilab, onde tudo começou! Foi junto a vocês que descobri a minha paixão por Patologia Clínica! Em especial a Daphine Maciel e Mariana Cordeiro, que se transformaram em minhas irmãzinhas do coração e sempre com sorriso no rosto me acolheram com a frase “tudo dará certo no final”.

A toda equipe da VetsaN e do LabsaN, onde uma nova fase se inicia, muito obrigada pela amizade e carinho de sempre! Cynthia Venancio, você em especial tem sido uma amiga mais do que especial. Muito obrigada por tornar esta fase menos sofrida e me apoiar em todos os momentos. Você é mais do que uma irmã para mim!

A todos os meus colegas de mestrado, em especial a Patricia Montañó, Larissa Runcos, Thais Knopf e Francisco Conrado, que passaram a fazer parte da minha vida como queridos amigos e não mais apenas colegas. Adoro vocês!

A minha orientadora Profa. Simone Tostes, que foi indescritivelmente incrível! Você literalmente segurou a minha mão e me fez dar os meus primeiros passos na vida acadêmica. Espero de coração ter retribuído e atingido as suas expectativas!

Ao Prof. Alexander Biondo, por me ensinar que tudo é possível quando lutamos pelo o que queremos! Foi você que me incentivou a dar este passo e só tenho a agradecer por isso, valeu muito a pena!

Ao Rafael Stedile, por toda a ajuda com a estatística deste trabalho.

Sem dúvida não posso deixar de agradecer a IDEXX Laboratories, que acreditou em meu potencial e tornou este projeto possível. Em especial agradeço ao Jean Chiotti por me ensinar muito sobre o mundo dos negócios e ao Christian Leutenegger, por ser meu mentor no grandioso mundo da Biologia Molecular.

MUITO OBRIGADA!

*“A vida é cheia de desafios, que se aproveitados
de forma criativa, transformam-se em oportunidades”*

Marxwell Maltz

RESUMO

Diarréia é uma das queixas mais comuns apresentadas aos veterinários diariamente, onde muitas vezes o manejo e diagnóstico definitivo da mesma é um grande desafio, devido a sua variedade de patógenos, ausência de sinais clínicos específicos e presença concomitante de co-infecções por vírus, bactérias e protozoários. Como as doenças infecciosas e parasitárias estão entre as causas mais comuns de diarreia e os testes diagnósticos, assim como os respectivos tratamentos frequentemente variam de acordo com a etiologia da mesma, fazer esta caracterização inicial é importante. Raramente a realização de vários testes diagnósticos são realizados para identificar todas as possíveis causas da diarreia em cães. Isso pode ser em parte porque os métodos tradicionais para a identificação de infecções gastrointestinais são caros, de baixa sensibilidade diagnóstica ou lentos para produzir resultados. A falta de um diagnóstico definitivo, a falha no tratamento com diarreia persistente ou recorrente e a despesa com medicamentos ineficazes, podem levar à insatisfação do cliente, resistência medicamentosa, bem como colocar em risco a saúde do animal. O objetivo deste estudo foi o uso de um painel de PCR em tempo-real e do parasitológico de fezes para pesquisa da prevalência de patógenos e co-infecções em uma população de cães com e sem diarreia atendidos em um hospital veterinário particular. Para tanto, o trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro um artigo de revisão preparado para a revista Clínica Veterinária, sobre o uso do PCR em tempo-real no diagnóstico de doenças infecciosas em cães e gatos e comparação desta com outras técnicas de diagnóstico. O segundo capítulo compreende a tabulação dos resultados obtidos com as análises realizadas e confecção de um artigo submetido e aceito pelo jornal BMC Veterinary Research. As amostras de fezes foram testadas para o vírus da cinomose canina, coronavírus canino, parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens* alfa toxina (CPA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Salmonella* spp. através de técnicas moleculares e a pesquisa de larvas, ovos, cistos e trofozoítos por meio do parasitológico de fezes. Do total das 104 amostras de fezes diarreicas e 43 controles, 71/104 (68.3%) dos cães com diarreia foram positivos para pelo menos um patógeno, onde destes, infecção única foi observada em 39/71 (54,9%) e co-infecção em 32/71 (45,1%), incluindo 21/32 (65,6%) dos cães com duas, 5/32 (15,6%) com três e 6/32 (18,8%) com quatro infecções. No grupo controle, 13/43 (30,2%) dos cães foram positivos, todos com infecção única. Os patógenos mais prevalentes nos cães com diarreia foram CPA (40/104 cães, 38.5%), CPV-2 (36/104 cães, 34.6%), e *Giardia* spp. (14/104 Cães, 13.5%). O CPV-2 foi o patógeno mais prevalentemente associado a co-infecções, principalmente com os agentes CPA, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Palavras-chave: Cães, Co-infecção, Prevalência, Diarreia, Painel, PCR em tempo-real

ABSTRACT

Diarrhea is one of the most common reasons pets are taken to the veterinary clinician daily. Definitive diagnosis and management often pose great challenges due to its variety of pathogens, absence of specific clinical signs and concomitant presence of co-infections with viruses, bacteria and protozoa. Since infectious and parasitic diseases are among the most common causes of diarrhea and diagnostic tests, as well as their treatments, often vary according to the etiology of the disease, prompt characterization is important. Rarely various diagnostic tests are performed to identify all possible causes of diarrhea in dogs. This may be partly because traditional methods for identification of gastrointestinal infections are expensive, have low diagnostic sensitivity and are time-consuming. The lack of a definitive diagnosis, failing to treat persistent or recurrent diarrhea and spending on ineffective drugs, can lead to customer dissatisfaction, drug resistance, as well as put the animal's health at risk. The aim of this study was the use of a Real-Time PCR panel and parasitological stool examination to survey prevalence of pathogens and co-infections in a population of dogs with and without diarrhea seen at a private veterinary hospital, as well as frequency in different countries. Therefore, the work was divided in two chapters, the first a review article prepared for the *Clínica Veterinária* journal on the use of Real-Time PCR for diagnosis of infectious diseases in dogs and cats and comparison with other diagnostic techniques. The second chapter contains a tabulation of the results obtained from the analyses, and the preparation of a paper submitted and accepted by the *BMC Veterinary Research* journal. Stool samples were tested for canine distemper virus, canine coronavirus, canine parvovirus type 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens* alpha toxin (CPA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *Salmonella* spp. through molecular techniques and examined for larvae, eggs, cysts and trophozoites by parasitological stool examination. Of the total of 104 samples of diarrheal stools and 43 controls, 71/104 (68.3 %) of the dogs with diarrhea were positive for at least one pathogen. For positive samples, single infection was observed in 39/71 (54.9%) and co-infection in 32/ 71 (45.1 %), including 21/32 (65.6%) dogs with two, 5/32 (15.6%) dogs with three and 6/32 (18.8%) dogs with four infections. In the control group, 13/43 (30.2 %) dogs were positive, all with single infections. The most prevalent pathogens observed in dogs with diarrhea were CPA (40/104 dogs, 38.5 %), CPV-2 (36/104 dogs, 34.6 %) and

Giardia spp. (14/104 dogs, 13.5 %). CPV - 2 was the pathogen most prevalently associated with co- infections, especially associatd with CPA, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.

Keywords: Dogs, Co-infection, Prevalence, Diarrhea, Panel, Real-Time PCR.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRO CAPÍTULO. PCR EM TEMPO-REAL NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM CÃES E GATOS:

Figura 1. Associação da técnica de PCR e sorologia otimiza a capacidade diagnóstica. Cão A encontra-se em quadro agudo de doença, com altas concentrações do patógeno circulante (viremia/bacteremia), sendo a PCR a técnica ideal. Cão B encontra-se na janela imunológica, ou seja, ainda não teve soroconversão e a concentração de DNA/RNA do agente podem estar reduzidas. Neste caso, ambas as técnicas podem ter resultados falso-negativos, sendo a associação das duas técnicas recomendada. Cão C apresenta infecção crônica ou recidiva, neste caso a concentração de anticorpos pode ser decorrente de infecção passada e não representar infecção ativa, a associação das técnicas é benéfica.....23

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRO CAPÍTULO. PCR EM TEMPO-REAL NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM CÃES E GATOS:

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Benefícios e limitações da sorologia X PCR para diagnóstico de doenças infecciosas..... | 22 |
| Tabela 2. Diferenças na utilização de métodos microbiológicos e moleculares para diagnóstico de doenças infecciosas..... | 27 |
| Tabela 3. Recomendações e indicações de amostras para PCR de acordo com a sintomatologia clínica..... | 30 |

SEGUNDO CAPÍTULO. PRESENCE OF INFECTIOUS AGENTS AND CO-INFECTIOUS IN DIARRHEIC DOGS DETERMINED WITH A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION BASED PANEL:

| | |
|---|----|
| Table 1 Prevalence of single or co-infection in diarrheic and control feces using a real-time PCR panel..... | 45 |
| Table 2 Virus, bacteria and protozoan association in diarrheic and control feces of dogs..... | 46 |
| Table 3 Individual infectious agents in the real-time PCR Canine Diarrhea Panel of dogs from Southern Brazil..... | 47 |
| Table 4 Canine Diarrhea Panel from diarrheic dogs of Brazil, United States, Australia Canada, UK and Japan..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCoV: Canine Coronavirus / Coronavírus canino

cDNA: DNA complementar

CDV: Canine Distemper Virus / Vírus da Cinomose canina

CPA: *Clostridium perfringens* alfa toxina

CPV-2: Canine Parvovirus type 2 / Parvovírus canino tipo 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra- acético

ELISA: Ensaio imunoenzimático

FIV: Imunodeficiência felina

IFI: Testes de Imunofluorescência indireta

MAT: Teste de microaglutinação

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIF: Peritonite Infecciosa Felina

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

rRNA : RNA ribossomal

UK: United Kingdom

US: United States

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 | REFERÊNCIAS..... | 16 |
| 2 | HIPÓTESE..... | 17 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 17 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAIS..... | 17 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PRIMEIRO CAPÍTULO..... | 17 |
| 3.3 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO SEGUNDO CAPÍTULO..... | 18 |
| 4 | PRIMEIRO CAPÍTULO. PCR EM TEMPO-REAL NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM CÃES E GATOS (Artigo a ser submetido para revista Clínica Veterinária) | 19 |
| 4.1 | RESUMO | 19 |
| 4.2 | ABSTRACT | 19 |
| 4.3 | INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 4.4 | PCR EM TEMPO-REAL NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS..... | 21 |
| 4.4.1 | <i>Vantagens em Relação a Testes Sorológicos.....</i> | <i>22</i> |
| 4.4.2 | <i>Para se Diferenciar Vacinação de Infecção Natural.....</i> | <i>24</i> |
| 4.4.3 | <i>Diferenças em Relação a Cultura</i> | <i>26</i> |
| 4.4.4 | <i>Vantagens em Relação a Avaliação do Esmregaço Sanguíneo.....</i> | <i>27</i> |
| 4.4.5 | <i>Para se Detectar Bactérias Fastidiosas ou de Crescimento Lento em Amostras Clínicas</i> | <i>28</i> |
| 4.4.6 | <i>Como Substituto do Isolamento Viral.....</i> | <i>29</i> |
| 4.4.7 | <i>Para Obter Diagnóstico em Amostras de Tecido Embebidas em Parafina</i> | <i>29</i> |
| 4.4.8 | <i>Envio de Amostras e Considerações Pré-Analíticas.....</i> | <i>30</i> |
| 4.4.9 | <i>Utilização da PCR a Partir de Sinais Clínicos através de Painéis</i> | <i>32</i> |
| 4.4.10 | <i>Limitações da PCR.....</i> | <i>33</i> |
| 5 | SEGUNDO CAPÍTULO. PRESENCE OF INFECTIOUS AGENTS AND CO-INFECTIOUS IN DIARRHEIC DOGS DETERMINED WITH A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION BASED PANEL (Artigo submetido e aceito pela BMC Veterinary Research)..... | 38 |
| 5.1 | ABSTRACT | 38 |
| 5.2 | BACKGROUND | 39 |
| 5.3 | METHODS | 40 |
| 5.3.1 | <i>Study population.....</i> | <i>40</i> |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.3.2 | <i>Clinical outcomes</i> | 41 |
| 5.3.3 | <i>Real-time PCR</i> | 42 |
| 5.3.4 | <i>Analytical and clinical validation</i> | 43 |
| 5.3.5 | <i>Parasitological diagnosis</i> | 44 |
| 5.3.6 | <i>Statistical analysis</i> | 44 |
| 5.4 | RESULTS | 44 |
| 5.4.1 | <i>Real-time PCR</i> | 44 |
| 5.4.2 | <i>Diarrhea in relation to age</i> | 48 |
| 5.4.3 | <i>Diarrhea duration in relation to number of pathogens</i> | 48 |
| 5.4.4 | <i>Diarrhea in relation to death</i> | 48 |
| 5.4.5 | <i>Diarrhea in relation to clinical suspicion</i> | 49 |
| 5.4.6 | <i>Diarrhea in relation to the use of antibiotics</i> | 49 |
| 5.4.7 | <i>Parasitological diagnosis</i> | 49 |
| 5.4.8 | <i>Results between countries</i> | 50 |
| 5.5 | DISCUSSION | 51 |
| 5.6 | CONCLUSIONS | 56 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 60 |
| 7 | APÊNDICE | 61 |
| 8 | ANEXOS | 63 |
| 8.1 | CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA SCA | 63 |
| 8.2 | RESUMO APRESENTADO NO 34º CONGRESSO DA ANCLIVEPA | 64 |
| 8.3 | ABSTRACT ENVIADO PARA O 2ND BIENNIAL SYMPOSIUM OF ISCAID | 67 |
| 8.4 | RESUMOS APRESENTADO NO 35º CONGRESSO DA ANCLIVEPA | 69 |
| 8.4.1 | <i>IMPORTÂNCIA DA NÃO UTILIZAÇÃO DO COPROPARASITOLÓGICO COMO ÚNICA FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM CÃES COM DIARREIA</i> | 69 |
| 8.4.2 | <i>AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DE DIARREIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM IDADE EM CÃES</i> | 73 |
| 8.5 | ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BMC VETERINARY RESEARCH | 76 |
| 8.5.1 | <i>PRESENCE OF INFECTIOUS AGENTS AND CO-INFECTIONS IN DIARRHEIC DOGS DETERMINED WITH A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED PANEL</i> ... | 76 |

1 INTRODUÇÃO

Diarreia é um dos sinais clínicos mais comuns apresentadas aos médicos veterinários na rotina clínica. Muitas vezes o manejo e o diagnóstico definitivo, principalmente das diarreias crônicas e intermitentes estão entre os aspectos mais frustrantes e desafiadores da prática clínica da medicina de pequenos animais.¹⁵ Isto se deve principalmente em função da grande variedade de patógenos, ausência de sinais clínicos específicos e presença concomitante de co-infecções por vírus, bactérias e protozoários (TAMS, 2003; SIMPSON, 2004).

Como as doenças infecciosas e parasitárias estão entre as causas mais comuns de diarreia e os testes diagnósticos, assim como os respectivos tratamentos frequentemente variam de acordo com a etiologia da mesma, fazer esta caracterização inicial é importante. Raramente o processamento de vários testes diagnósticos são realizados para identificar todas as possíveis causas da diarreia em cães. Isso pode ser em parte porque os métodos tradicionais para a identificação de infecções gastrointestinais são caros, de baixa sensibilidade diagnóstica ou lentos para produzir resultados. A falta de um diagnóstico definitivo, a falha no tratamento com diarreia persistente ou recorrente e a despesa com medicamentos ineficazes, podem levar à insatisfação do cliente, resistência medicamentosa, bem como colocar em risco a saúde do animal.

Considerando que um grande número de agentes infecciosos causam diarreia e podem estar presentes em co-infecções, o entendimento e a detecção destes agentes pode permitir um adequado prognóstico, planejamento do tratamento e respectivas estratégias de prevenção. Tratamentos empíricos e a utilização de múltiplos antibióticos são comuns na prática clínica veterinária e o uso de um painel para detecção de múltiplos patógenos previne o incorreto ou excessivo uso de fármacos antimicrobianos que podem levar a resistência. Além disso, muitos dos patógenos associados a diarreias em cães são potenciais agentes zoonóticos, incluindo os parasitas nematóides, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Salmonella* spp., e a identificação

destes organismos pode reduzir o risco de transmissão para humanos e outros animais, mesmo frente a pacientes assintomáticos (HACKETT e LAPPIN, 2003).

O uso da PCR em tempo-real melhorou a sensibilidade dos testes padrões de PCR (KUROWSKI et al., 2002) e pode ser capaz de classificar cepas de espécies onipresentes, tornando-se uma poderosa ferramenta para detecção de patógenos em amostras fecais. Além disso, a PCR em tempo-real pode ser utilizada em levantamentos epidemiológicos, correlacionando os achados moleculares de cães com os seus respectivos proprietários, bem como encontrar novas cepas de patógenos causadores de diarreia (STENSKE et al., 2009).

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo de estudo o uso de um painel de PCR em tempo-real e do parasitológico de fezes para pesquisa da prevalência de patógenos e co-infecções em uma população de cães com e sem diarreia atendidos em um hospital veterinário particular. Para tanto, a mesma foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro um artigo de revisão preparado para ser submetido para a revista Clínica Veterinária, sobre o uso do PCR em tempo-real no diagnóstico de doenças infecciosas em cães e gatos e comparação desta com outras técnicas de diagnóstico e, o segundo capítulo compreende a tabulação e discussão dos resultados obtidos com as análises realizadas e confecção de um artigo submetido e aceito pelo jornal BMC Veterinary Research.

1.1 REFERÊNCIAS

HACKETT, T; LAPPIN M.R. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 39, n.1, p.52-6, 2003.

KUROWSKI, P.B.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; MORLEY, P.S.; GENTRY-WEEKS, C.R. Detection of Salmonella spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**. v.63, n.9, p.1265-1268, 2002.

SIMPSON, K.W. Gastric disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders,; p. 1310–1331, 2004

STENSKE, K.A.; BEMIS, D.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P.; DRAUGHON, F.A.; MATTESON, K.J.; BARTGES, J.W. Prevalence of urovirulence genes cnf, hlyD, sfa/foc, and papGIII in fecal Escherichia coli from healthy dogs and their owners. **American Journal Veterinary Research**. v.70, n.11,p.1401-6, 2009.

TAMS, T.R. Gastrointestinal Symptoms. In: TAMS, T.R. **Handbook of Small Animal Gastroenterology**. 2th ed. St. Louis: Saunders, p. 27-44, 2003.

2 HIPÓTESE

A diarreia em cães apresenta múltiplas causas infecciosas.

A PCR é eficaz na identificação etiológica da diarreia aguda e crônica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais da dissertação foram basicamente subdivididos em duas partes bem distintas. Para tanto, o trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro um artigo de revisão preparado para a revista Clínica Veterinária, sobre o uso do PCR em tempo-real no diagnóstico de doenças infecciosas em cães e gatos e comparação desta com outras técnicas de diagnóstico.

O segundo capítulo compreende a tabulação e discussão dos resultados obtidos com as análises realizadas e confecção de um segundo artigo submetido e aceito pelo jornal BMC Veterinary Research. O objetivo deste estudo foi o uso de um painel de PCR em tempo-real e do parasitológico de fezes para pesquisa da prevalência de patógenos e co-infecções em uma população de cães com e sem diarreia atendidos em um hospital veterinário particular, assim como a frequência em diferentes países.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PRIMEIRO CAPÍTULO

- Descrever a utilidade da PCR em tempo-real na detecção de doenças infecciosas em pequenos animais, tanto para a confirmação de uma suspeita específica, quanto diante de sinais clínicos inespecíficos que poderiam ser atribuídos a

várias doenças, necessitando com isso de um painel de doenças a serem investigadas simultaneamente.

- Abordar as principais doenças infecciosas em cães e gatos de interesse para a rotina do clínico veterinário no Brasil.
- Abordar a escolha e quantidade mínima da amostra, forma de armazenamento para envio ao laboratório, testes a serem escolhidos em cada caso, suas possíveis limitações e a interpretação dos resultados.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO SEGUNDO CAPÍTULO

- Determinar a associação de patógenos infecciosos á diarreia em cães.
- Determinar por meio da técnica de PCR em tempo-real a prevalência dos patógenos infecciosos (vírus da cinomose canina, coronavírus canino, parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens* alfa toxina (CPA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Salmonella* spp.) associados à diarréia em cães.
- Determinar por meio da realização do exame parasitológico de fezes a prevalência de larvas, ovos, cistos e trofozoítos em cães com e sem diarreia.
- Determinar a incidência de co-infecção em cães diarreicos.
- Auxiliar no diagnóstico clínico-laboratorial dos casos de diarréia em cães.

4 PRIMEIRO CAPÍTULO. PCR EM TEMPO-REAL NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM CÃES E GATOS (Artigo a ser submetido para revista Clínica Veterinária)

Real-Time PCR in the Diagnosis of Infectious Diseases in Dogs and Cats

4.1 RESUMO

A PCR em tempo-real vem recentemente substituindo a PCR convencional e tornado-se a técnica de escolha oferecida pelos grandes laboratórios de diagnóstico veterinário e humano no mundo todo. O objetivo desta revisão foi descrever a utilidade desta técnica para diagnóstico de doenças infecciosas em pequenos animais, tanto para a confirmação de uma suspeita de agente específico quanto com sinais clínicos não específicos, necessitando de painéis para investigação simultânea de múltiplos agentes. Considerando que grande número de agentes infecciosos causam doenças infecciosas e podem estar presentes em co-infecções, o entendimento e detecção destes agentes infecciosos pode permitir um adequado prognóstico, planejamento do tratamento e respectivas estratégias de prevenção.

Palavras-chave: Investigação, qPCR, Enfermidades, Co-infecção, Caninos, Felinos

4.2 ABSTRACT

The real-time PCR has been recently replacing the conventional PCR and becoming the technique of choice provided by the major laboratories of veterinary and human diagnostics worldwide. The objective of this review was to describe the usefulness of this technique for the diagnosis of infectious diseases in small animals, either for the confirmation of a specific suspicious agent or with non-specific signs,

requesting panels for simultaneous survey of multiple agents. Considering that a large number of infectious agents cause infectious diseases and may be present in co-infections, understanding and detection of these infectious agents may allow an adequate prognosis, treatment planning and respective prevention strategies.

Keywords: Investigation, qPCR, Disease, Co-infection, Canines, Felines

4.3 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços na Medicina Veterinária em relação ao uso de antimicrobianos e vacinas, assim como a disponibilidade de técnicas avançadas de diagnóstico, as doenças infecciosas permanecem sendo a principal causa de morbidade e mortalidade devido ao surgimento de co-infecções e novos padrões de resistência (DONG et al., 2008). Ferramentas moleculares são usadas em adição às técnicas convencionais de culturas e testes laboratoriais baseados na detecção de anticorpos para identificação e diagnóstico de doenças infecciosas (LIU, 2008 e MACKAY, 2004).

Com a introdução da PCR em tempo-real nos laboratórios de rotina, tornou-se possível a diferenciação de infecção da cepa viral atenuada em pacientes previamente vacinados, como no caso da cinomose, e auxílio diagnóstico entre doenças diferentes causadas por agentes semelhantes, como no caso da coronavirose entérica felina e a peritonite infecciosa felina, ambas causadas por coronavírus.

O objetivo desta revisão foi descrever a utilidade da PCR em tempo-real na detecção de doenças infecciosas em pequenos animais, tanto para a confirmação de uma suspeita específica, quanto diante de sinais clínicos inespecíficos que poderiam ser atribuídos a várias doenças, necessitando com isso de um painel de doenças a serem investigadas simultaneamente. Desta forma, foram abordadas as principais doenças infecciosas em cães e gatos de interesse para a rotina do clínico veterinário no Brasil. Foram também abordados a escolha e quantidade mínima da amostra, forma de armazenamento para envio ao laboratório, testes a serem escolhidos em cada caso, suas possíveis limitações e a interpretação dos resultados.

4.4 PCR EM TEMPO-REAL NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

O termo diagnóstico molecular refere-se aos testes que detectam ácidos nucleicos (DNA/RNA) do agente infeccioso causal, em meio ao material genético do hospedeiro e de outros seres da microbiota não patogênicos contidos na amostra. Deste modo, para diagnóstico de doenças infecciosas e detecção do DNA ou RNA, os testes baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizam sequências conhecidas de aminoácidos, que são específicas para os agentes infecciosos em questão (DANIELS, 2013).

Em contraste com a PCR convencional, que amplifica a molécula de DNA alvo em reação final, a PCR em tempo-real quantifica a molécula de DNA alvo em tempo-real (KRISHNA, 2012), possibilitando que quantidades mínimas do DNA/RNA sejam detectadas, aumentando a sensibilidade e reduzindo o limiar de detecção do teste. A quantificação também permite a diferenciação entre infecção e vacina (que poderia gerar um falso-positivo na PCR convencional). O aspecto quantitativo desta tecnologia na medicina veterinária vem aos poucos sendo validada e explorada para determinados agentes, a fim de indicar prognóstico e alterar tratamentos em alguns estados de doença (DANIELS, 2013).

Recentemente, um teste para detectar e quantificar o RNA mensageiro (RNAm) do coronavírus felino foi desenvolvido para auxiliar no diagnóstico de Peritonite Infecciosa Felina (PIF), doença infecciosa de grande desafio para diagnóstico antemortem em gatos. A detecção do RNAm do coronavírus felino em amostras de gatos não provenientes do trato gastrointestinal é indicativa de replicação ativa do vírus em células mononucleares circulantes. Neste caso, altas quantidades de cópias virais são geralmente observadas em pacientes com PIF quando comparado aos quadros promovidos pelo coronavírus entérico (HORNYÁK et al., 2012 e SIMONS et.al., 2005).

A quantificação de toxinas do *Clostridium Perfringens* como marcador do envolvimento deste agente em diarreias em cães e gatos (LEUTENEGGER et al., 2012)

e a quantificação do DNA da *Leishmania* spp para diagnóstico de Leishmaniose canina em casos onde a sorologia foi inconclusiva (MARTÍNEZ et al., 2011) são outros exemplos da importância do uso desta ferramenta molecular quantitativa.

4.4.1 Vantagens em Relação a Testes Sorológicos

Métodos sorológicos detectam anticorpos produzidos em resposta a exposição e/ou infecção causada por um microrganismo, o que normalmente exige pelo menos uma a duas semanas para que se tenha soroconversão e detecção dos mesmos em testes laboratoriais. Desta forma, para pacientes em quadros agudos de doença, os métodos moleculares são mais adequados, já que detectam a presença do microrganismo presente na amostra e independem da resposta do hospedeiro. O período de tempo entre infecção e o aparecimento dos sinais clínicos é tipicamente desconhecido e terá impacto no resultado dos testes diagnósticos. A utilização de PCR e sorologia juntos melhora a capacidade de um diagnóstico completo e preciso (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Benefícios e limitações da sorologia em relação a PCR para diagnóstico de doenças infecciosas

| | SOROLOGIA | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) |
|-------------------|--|--|
| MENSURA | Resposta de anticorpo do hospedeiro | Ácido nucleico do patógeno (DNA) |
| BENEFÍCIOS | Útil para triagem e auxílio no diagnóstico da infecção | Identifica especificamente patógenos, indicando infecção ativa |
| LIMITAÇÕES | Os sinais clínicos podem preceder uma resposta de anticorpos mensuráveis | Um resultado negativo de PCR não exclui necessariamente a infecção |

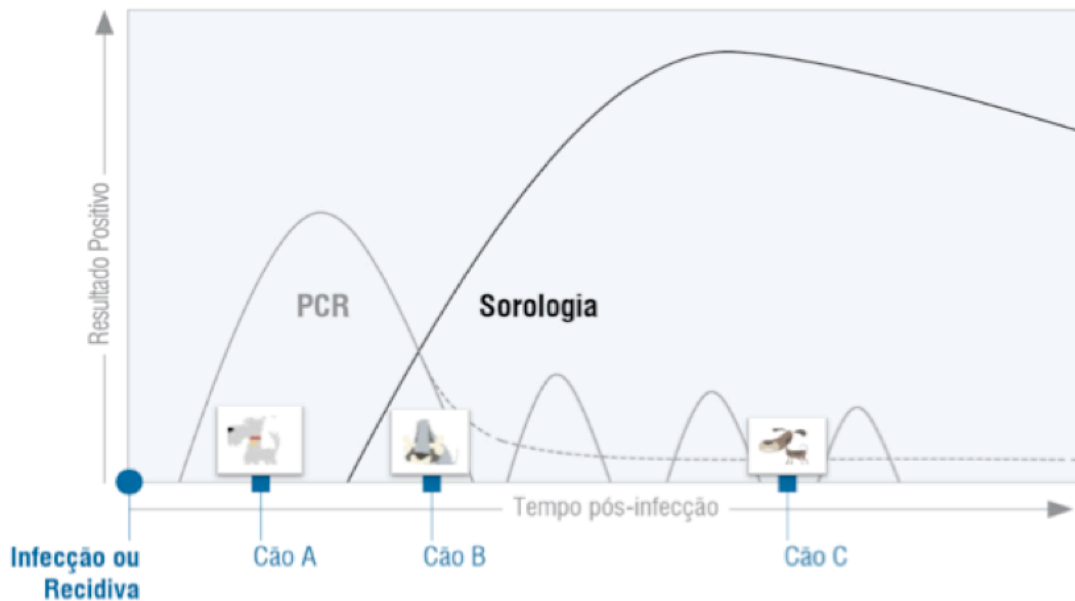


Figura 1. Associação da técnica de PCR e sorologia otimiza a capacidade diagnóstica. Cão A encontra-se em quadro agudo de doença, com altas concentrações do patógeno circulante (viremia/bacteremia), sendo a PCR a técnica ideal. Cão B encontra-se na janela imunológica, ou seja, ainda não teve soroconversão e a concentração de DNA/RNA do agente podem estar reduzidas. Neste caso, ambas as técnicas podem ter resultados falso-negativos, sendo a associação das duas técnicas recomendada. Cão C apresenta infecção crônica ou recidiva, neste caso a concentração de anticorpos pode ser decorrente de infecção passada e não representar infecção ativa, a associação das técnicas é benéfica.

Além disso, a avaliação sorológica normalmente requer a repetição do teste em 4 a 6 semanas para demonstrar um aumento do título, o que pode atrasar o diagnóstico definitivo (KRISHNA e CUNNION, 2012). Pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos frequentemente não terão uma resposta adequada para a produção de anticorpos, o que limita o uso e a interpretação de técnicas sorológicas para estes pacientes devido à possibilidade de resultados falso-negativos.

4.4.2 Para se Diferenciar Vacinação de Infecção Natural

Na maioria dos agentes infecciosos que são prevenidos por vacinas comerciais disponíveis, testes de diagnóstico sorológico são de baixa especificidade pois detectam anticorpos vacinais e resultados positivos não indicam necessariamente infecção. Métodos de PCR podem ser úteis nestes casos para diferenciação de infecção natural e vacina em casos de doenças infecciosas comuns na rotina clínica veterinária, como a imunodeficiência felina (FIV), a leptospirose e a cinomose (DANIELS, 2013).

No caso da FIV, gatos vacinados respondem à imunização com a produção de anticorpos que são indistinguíveis daqueles produzidos durante uma infecção natural nos métodos atualmente disponíveis, como ensaio imunoenzimático (ELISA), Western blotting e testes de Imunofluorescência indireta (IFI). Deste modo, os testes sorológicos não são capazes de distinguir gatos que foram vacinados para FIV dos infectados com FIV, e daqueles que foram vacinados e infectados (MARTÍNEZ et al., 2008). As vacinas comerciais para FIV são compostas em sua maioria por vírus vivo inativado, que são removidos da circulação rapidamente sem integração com o DNA do genoma do hospedeiro. Com isso, a vacinação para FIV não resulta em amplificação na PCR, excluindo portanto resultados falso-positivos em pacientes vacinados (WANG et al., 2010).

No caso da leptospirose canina, a interpretação dos testes sorológicos (Teste de microaglutinação - MAT) deve ser ainda mais cautelosa, pois além da possibilidade de resultados negativos em fases agudas de doença devido à ausência de soroconversão, os títulos podem ser resultado de vacinação prévia, exposição ou infecção crônica. Portanto, a observação de um aumento de 4 vezes dos títulos é necessária para confirmar o diagnóstico de infecção recente. Isso é especialmente importante em pacientes com histórico vacinal, pois embora os títulos vacinais tendam a ser mais baixos, altos títulos (≥ 1600) tem potencial de persistir após vacinação e reações cruzadas com os sorogrupos não vacinais podem ocorrer. A PCR detecta ácidos nucleicos de leptospirosas patogênicas e é potencialmente útil em fases iniciais de doença, quando os testes que detectam anticorpos são frequentemente negativos e quando a

terapia antimicrobiana ainda não foi administrada. A PCR também pode confirmar infecção ativa em animais com testes de anticorpos positivos e histórico de vacina, pois a vacinação não promove resultados falso-positivos por este método^{12,13}. Nos primeiros dias de infecção, o número de organismos é elevado no sangue, sendo esta a amostra de escolha para a PCR na primeira semana de doença. Após este período, as leptospiras estão em maior concentração na urina (leptospiúria). Portanto, quando o tempo de infecção não é conhecido, o teste simultâneo de sangue e urina aumenta a sensibilidade diagnóstica (LEUTENEGGER et al., 2009). Terapia antimicrobiana recente pode resultar em resultados negativos na PCR, entretanto algumas doses de antibióticos são necessárias para que o resultado da PCR comece a negatizar, pois esta técnica detecta ambos, organismos viáveis e não viáveis. O ideal é que as amostras sejam sempre coletadas antes do início da terapia antibiótica, porém a coleta de amostras após 24-48 horas do início da antibióticoterapia ainda pode promover resultados positivos na PCR (SYKES et al., 2011).

No caso da cinomose, diferentemente da FIV e da leptospirose, pacientes vacinados podem apresentar resultados falso-positivos nos testes moleculares e causar dificuldades na interpretação do resultado, pois as vacinas são compostas por vírus vivo modificado e este pode ser detectado nas técnicas de PCR. A quantificação do vírus da cinomose por meio da técnica de PCR em tempo-real em amostras provenientes de *swab* conjuntival e faríngeo profundo (mesmo que o cão não apresente sinais respiratórios) é um método rápido e sensível para se distinguir interferência vacinal de infecção. A utilização de um ponto de corte previamente estabelecido sugere que pacientes vacinados que obtenham quantificações ≤ 105 mil partículas de RNA vírus por amostra tenham o resultado de PCR positivo para cinomose devido a detecção de uma cepa vacinal. Porém se o cão não foi vacinado recentemente ou recebeu uma vacina recombinante, este resultado positivo é consistente com fases muito agudas de doença ou de convalescência. Nestes casos, se o paciente apresentar sinais clínicos recomenda-se retestar o mesmo em 1-2 semanas. Quantificações acima de 1 milhão de partículas de RNA vírus por *swab* indica que o resultado positivo é mais compatível com vírus selvagem (não-vacinal) e é indicativo de infecção (LEUTENEGGER et al., 2011).

4.4.3 Diferenças em Relação a Cultura

As principais vantagens da PCR incluem a rapidez na obtenção dos resultados e a não exigência da viabilidade do organismo e da capacidade de crescimento *in vitro* (Tabela 2). Uma desvantagem da PCR em relação à cultura é a necessidade de se utilizar primers específicos para o patógeno, podendo a PCR gerar um resultado negativo caso a suspeita não tenha sido adequada e os primers específicos não tenham sido utilizados. Isto pode ocorrer principalmente frente a patógenos novos introduzidos em uma região. Como forma de minimizar o problema, painéis disponíveis de acordo com os sinais clínicos diminuem a chance da doença não ser detectada. Para que os painéis sejam adequados o ideal é que se conheça as principais doenças de cada região e seus patógenos sejam incluídos neste painel. No caso de patógenos raros que não tenham sido incluídos no painel, a cultura seria ideal, pois possibilitaria sua identificação mesmo sem a suspeita específica (MACKAY et al., 2004).

Tabela 2. Diferenças na utilização de métodos microbiológicos e moleculares para diagnóstico de doenças infecciosas

| CULTURA | PCR EM TEMPO-REAL |
|---|--|
| - Isola bactérias específicas e precisa ter os organismos viáveis | - Painéis podem incluir a detecção de vírus, bactérias, fungos e protozoários simultaneamente e são capazes de detectar organismos viáveis e não viáveis |
| - Comparação de número de colônias e crescimento de colônias puro é mais significativo, pois organismos não patogênicos podem ser contaminantes | - São pesquisados apenas organismos considerados patogênicos |
| - Quando utilizado os meios de cultura adequados permite crescimento de vários tipos bacterianos, mesmos os não suspeitos | - Detecta apenas os patógenos pesquisados. A não utilização do primer específico pode promover resultados negativos |
| - Não são todos os patógenos que crescem facilmente em meios de culturas | - Pesquisa do material genético do patógeno independe da viabilidade de crescimento in vitro |
| - Exige transporte em frasco específico para alguns tipos de culturas, como hemocultura ou coprocultura. | - Armazenar a amostra em frasco estéril e sob refrigeração |

4.4.4 Vantagens em Relação a Avaliação do Esfregaço Sanguíneo

Células vermelhas são diretamente infectadas por Micoplasmas hemotrópicos, *Anaplasma* sp., *Babesia* sp., *Cytauxzoon*, entre outros. Entretanto, o diagnóstico das hemoparasitoses é um desafio, pois é necessário um grande número de hemoparasitas circulantes para que seja possível a detecção por microscopia de luz. Para se detectar um hemoparasita por meio de uma avaliação microscópica é necessário que esteja circulante aproximadamente 1000 parasitas/ μ l de sangue. (DANIELS, 2013). A utilização de técnicas moleculares como a PCR aumentam a sensibilidade diagnóstica, pois são capazes de obter resultados positivos com apenas 1 parasita/ μ l¹⁷. Além disso, a não confecção imediata do esfregaço sanguíneo pode promover resultado falso negativo devido ao desprendimento de hemoparasitas de membrana, como no caso dos Micoplasmas hemotrópicos, que se desprendem do eritrócito quando em contato

prolongado com EDTA. Outro fator é que nem sempre a hematoscopia é capaz de realizar a identificação das espécies, o que pode interferir na conduta clínica, pois espécies diferentes podem apresentar níveis de patogenicidades diferentes mesmo quando pertencentes ao mesmo gênero. Os principais hemoplasmas que acometem os felinos por exemplo são *Mycoplasma haemofelis* (potencialmente patogênico – pode causar anemia em animais imunocompetentes), *Candidatus Mycoplasma turicensis* (patogenicidade intermediária) e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (menos patogênico – normalmente associado a co-infecções). Portanto, para felinos anêmicos positivos para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* recomenda-se a investigação de co-infecções pois possivelmente ele não é o único agente causal da anemia. As técnicas de PCR são capazes de identificar gênero e espécie dos agentes e independem se os mesmos se desprenderam dos eritrócitos como no casos dos hemoplasmas. Além disso, muitos outros agentes infecciosos não são detectados em esfregaços sanguíneos devido ao seu tamanho (vírus e bactérias) ou porque estão em baixo número na circulação. (LIU, 2008).

4.4.5 Para se Detectar Bactérias Fastidiosas ou de Crescimento Lento em Amostras Clínicas

Subespécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma*, assim como o *Mycoplasma* hemotrópico são bons exemplos de agentes fastidiosos. Estes organismos requerem células de mamíferos para se propagar (cultura de células), além de serem caras e demoradas para serem processadas laboratorialmente (DANIELS, 2013). Resultados de PCR positivo são uma excelente e rápida ferramenta diagnóstica em pacientes com clínica compatível. Sorologias associadas com PCR para as subespécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* são particularmente úteis para o diagnóstico, especialmente quando o título na sorologia foi questionável. Além disso, os métodos baseados em PCR tem maior valor diagnóstico principalmente em fases agudas de doença, pois nesta fase ainda não se tem a soroconversão necessária para os testes sorológicos (NEER et al., 2002).

4.4.6 Como Substituto do Isolamento Viral

Métodos baseados em PCR podem ser excelentes substitutos para o isolamento viral em cultura de células, pois são mais rápidos e práticos para serem processados. O isolamento viral requer manutenção de linhagens celulares em meio de cultura de tecido, que são caros e relativamente demorados para serem processados (vários dias ou semanas), o que atrasa a confecção do diagnóstico (DANIELS, 2013).

4.4.7 Para Obter Diagnóstico em Amostras de Tecido Embebidas em Parafina

Uma vantagem da utilização do ácido nucleico (DNA/RNA) como um alvo de detecção é que a viabilidade dos agentes infecciosos presentes na amostra não é necessária. Quando o patologista sugere diagnósticos diferenciais, o ácido nucleico pode ser extraído a partir de tecidos em parafina e submetido a PCR para detecção de agentes infecciosos diversos, como vírus, bactérias e protozoários (DANIELS, 2013).

No entanto, o período de tempo que os tecidos ficaram embebidos em formalina antes de serem emblocados em parafina irá impactar a probabilidade de sucesso do PCR. O formaldeído promove ligações cruzadas de DNA-proteína e RNA-proteína, que tornam as moléculas de ácido nucleico menos passíveis de amplificação na reação de PCR (GILBERT et al., 2007). Como regra geral, para se ter a possibilidade de utilização desta amostra para análises moleculares adicionais com probabilidade de sucesso na PCR, as amostras teciduais devem ser fixadas rapidamente (preferencialmente imediatamente) em formol para se evitar autólise e degradação de ácido nucleico e armazenadas em formol preferencialmente por no máximo 2 dias até serem emblocadas em parafina (VON et al., 2005). Depois de emblocadas, as amostras são viáveis por longos períodos.

4.4.8 Envio de Amostras e Considerações Pré-Analíticas

Diagnósticos moleculares oferecem a conveniência da possibilidade de utilização de um pequeno volume de amostra, que em sua grande maioria, são coletadas de forma minimamente invasiva (DANIELS, 2013). Amostras variadas podem ser encaminhadas para PCR e a sua escolha depende da suspeita clínica e do patógeno envolvido conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Recomendações e indicações de amostras para PCR de acordo com a sintomatologia clínica

| SUSPEITA CLÍNICA | INDICAÇÕES | AMOSTRA / VOLUME |
|------------------------------------|--|--|
| Doenças Gastrointestinais | <ul style="list-style-type: none"> - Cães e gatos com diarreia aguda, crônica ou intermitente - Perda de peso não explicada - Para identificar e minimizar a exposição humana para patógenos zoonóticos | 5 g (mínimo 1 g) de fezes refrigeradas em frasco coletor estéril. Manter refrigerado. |
| Doenças Renais ou Hepáticas | <ul style="list-style-type: none"> - Possibilidade de Leptospirose - Doença renal aguda sem exposição a toxinas ou pielonefrite diagnosticada - Doença renal crônica de etiologia desconhecida - Falência hepática ou hepatite - Febre, vasculite, coagulopatias | 2,0 mL de sangue total em EDTA e 2,0 mL de urina em frasco coletor estéril. Manter refrigerado. |
| Doenças Neurológicas | Presença de manifestação de doença intracraniana incluindo: <ul style="list-style-type: none"> - Depressão, mudança de comportamento - Convulsões - Ataxia, andar em círculos, doença vestibular - Cegueira cortical - Paresia, paralisia - Anormalidades observadas na análise de líquido, incluindo contagem de células e/ou proteínas - Presença inexplicada de dor cervical | 0,5 mL (mínimo 0,2 mL) de líquido em frasco com EDTA e 2,0 mL de sangue com EDTA. Manter refrigerado. |
| Doenças Respiratórias | <ul style="list-style-type: none"> - Sinais de doença respiratória como secreção oculonasal, conjuntivite, febre, tosse e/ou espirros | Swab conjuntival e faríngeo profundo.* Manter sob refrigeração. |
| Micoses Sistêmicas | <ul style="list-style-type: none"> - Sinais não específicos como febre, letargia, perda de peso, linfadenomegalia - Sinais respiratórios incluindo dispneia, tosse, secreção ou massa nasal, espirros, epistaxe - Sinais oculares, incluindo uveítes, | Amostra ideal depende da manifestação clínica: <ul style="list-style-type: none"> - Para manifestações sistêmicas e não específicas: 2,0 mL de sangue com EDTA - Para manifestações respiratórias: |

coriorretinites, panoftalmite, cegueira aguda, exoftalmia

- **Sinais neurológicos**, incluindo depressão, convulsão, ataxia, alterações comportamentais

- **Sinais gastrointestinais**, incluindo diarreia de intestino grosso ou delgado

- **Sinais musculoesqueléticos**, incluindo claudicação e dor óssea

swab faríngeo profundo e/ou nasal*
Fluido de lavado traqueal ou broncoalveolar (0,5 mL, sendo o mínimo 0,2 mL) em frasco com EDTA ou aspirado ou biópsia de massa nasal**

- Para **manifestações oculares**: 0,5 mL (mínimo 0,1 mL) de fluido uveal em frasco com EDTA ou aspirado de tecido**

- Para **manifestações neurológicas**: 0,5 mL (mínimo 0,2 mL) de líquido em frasco com EDTA

- Para **manifestações gastrointestinais**: 5 g (mínimo 1g) de fezes em frasco coletor estéril

- Para **lesões de pele**: aspirados teciduais ou fragmento de tecido **, 0,5 mL (mínimo 0,2 mL) de fluido em frasco com EDTA

- Para **lesões ósseas**: aspirado ou fragmento de tecido**

Manter todas as amostras refrigeradas

- 2,0 mL de sangue com EDTA.
Manter refrigerado.

Doenças veiculadas por Vetores/Carrapato e Anemia

- Anemia
- Trombocitopenia, neutropenia
- Letargia, febre, linfadenomegalia
- Claudicação, evidência de poliartrite
- Proteinúria
- Distúrbios hemorrágicos resultando em epistaxe, petéquias e equimoses
- Uveítes e sinais neurológicos

NOTA: todas as amostras devem ser obtidas preferencialmente antes do tratamento

* **Swab faríngeo profundo e/ou nasal** (com material orgânico visível no swab, esfregar firmemente). Utilizar swabs com cabo plástico e enviar os mesmos secos, sem nenhum tipo de meio de transporte, em frasco estéril e vazio. Múltiplos swabs podem ser enviados juntos no mesmo tubo. Ao adquirir o swab faríngeo precauções devem ser tomadas para prevenir que o paciente morda e/ou ingira parte do swab.

** **Aspirados de tecidos**: submeter aspirados de tecidos em swabs (descritos a seguir) melhora a estabilidade da amostra. Um a três esfregaços (manter em temperatura ambiente) também são amostras aceitáveis, mas podem resultar em menor sensibilidade.

Protocolo sugerido para aspirados de tecido (aspirados de tecidos com agulha usando técnicas padrões): Retirar a seringa da agulha e encher a seringa com ar. Recolocar a seringa na agulha e esguichar o material no swab. Enviar o swab em um tubo de soro sem gel separador de coágulo ou frasco estéril seco. Manter a amostra refrigerada.

Biópsias teciduais: testes de PCR podem ser realizados em amostras previamente submetidas à histopatologia (fixadas em formol ou embutidas em parafina). Amostras teciduais frescas recebidas no laboratório 24 horas após a coleta também são aceitáveis. Congelamento não é recomendado a menos que a amostra seja mantida congelada até a chegada no laboratório de PCR.

A escolha da amostra ideal para detecção de DNA e RNA por meio de técnicas moleculares é fortemente influenciada pela patogênese da doença e desempenha um papel fundamental na performance e interpretação dos resultados dos testes. Além da escolha da amostra (sangue, urina, líquor, fezes, linfonodo etc), a fidedignidade dos resultados é diretamente relacionada à qualidade da mesma e a preservação do ácido nucleico. Entretanto, diferentemente das técnicas microbiológicas, este método não precisa do organismo viável para a análise, o que proporciona maior flexibilidade no transporte das amostras. Apesar disso, alguns cuidados precisam ser tomados para se evitar a degradação do DNA/RNA, onde a manutenção das amostras sob refrigeração desde a coleta até o momento da análise é extremamente importante. Amostras velhas de DNA também são inadequadas, portanto recomenda-se enviar as amostras ao laboratório preferencialmente em até 48 horas após a coleta e realizar a PCR em no máximo 10 dias para se ter maior segurança frente a viabilidade do DNA. Evitar manter as amostras em temperatura ambiente, principalmente expostas a altas temperaturas, mesmo que seja apenas durante o transporte até o laboratório. Seguir rigorosamente a recomendação do laboratório para envio do material e evitar a utilização de meios de transporte como o meio de Stuart por exemplo, que é utilizado para exames microbiológicos, pois dependendo do meio além de ser uma possível fonte de contaminação, pode inviabilizar o DNA com o tempo de armazenamento da amostra. O congelamento das amostras deve ser evitado em amostras frescas, nas quais o DNA/RNA não foi extraído, pois frequentemente afetam a qualidade das amostras. (MACKAY, 2004).

4.4.9 Utilização da PCR a Partir de Sinais Clínicos através de Painéis

Na maioria das vezes o diagnóstico diferencial de doenças infecciosas irá incluir a possibilidade de dois ou mais potenciais agentes infecciosos. Alguns laboratórios já oferecem painéis que incluem os principais agentes infecciosos desde bactérias, vírus e protozoários que possam estar relacionados com a presença de diarreia em cães e

gatos por exemplo. No Brasil, um trabalho recente demonstrou a presença de 45,1% de co-infecção em cães com diarreia, com envolvimento de até quatro agentes, realçando com isso a importância da investigação simultânea de múltiplos patógenos (GIZZI et al., 2014). Os patógenos envolvidos em co-infecções podem interagir sinergicamente, por exemplo via sistema imune do hospedeiro, onde a presença de um aumenta a quantidade e/ou virulência do outro, o que resulta em aumento da patogênese e contribui para o agravamento dos sinais clínicos (GRIFFITHS et al., 2011 e BHAVNANI et al., 2012). A utilização de painéis para correta identificação dos possíveis agentes patogênicos envolvidos com o quadro clínico do paciente auxilia na escolha do tratamento mais adequado.

4.4.10 Limitações da PCR

A PCR é uma reação enzimática e portanto muito sensível a substâncias inibidoras. A grande presença de hemoglobina em amostras intensamente hemolisadas por exemplo pode interferir na síntese de DNA devido a inibição da ação da DNA polimerase e conseqüentemente inibição da amplificação do DNA alvo (SCHRADER et al., 2012). Inibidores da PCR em amostras diagnósticas (ex. fezes ou exsudatos) podem significativamente reduzir a eficácia e sensibilidade do teste, pois a presença de altas concentrações de polissacarídeos por exemplo podem interferir na reação enzimática por mimetizar a estrutura do ácido nucleico (DANIELS, 2013).

Um resultado de PCR positivo confirma infecção, porém um resultado negativo na PCR não descarta, pois pode ser reflexo da presença de uma nova variação de cepa não detectada pelo teste ou em decorrência do nível de ácidos nucleicos abaixo do limite de detecção observada em pacientes previamente tratados ou com infecções crônicas (DANIELS, 2013 e SCHRADER et al., 2012). Resultados positivos na técnica de PCR dependem necessariamente da presença do DNA/RNA na amostra encaminhada para análise, portanto a escolha das amostras devem ser de acordo com a suspeita clínica e sítio de replicação do agente envolvido. O envio de amostras equivocadas para análise

podem promover resultados falso-negativos devido a ausência do DNA/RNA do agente nesta amostra (SCHRADER et al., 2012 e RÅDSTRÖM et al., 2004).

REFERÊNCIAS

BHAVNANI, D.; GOLDSTICK, J.E.; CEVALLOS, W.; TRUEBA, G.; EISENBERG, J.N. Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. **American Journal of Epidemiology**, v.5, p.387–395, 2012.

DANIELS, J.B. Molecular diagnostics for infectious disease in small animal medicine: an overview from the laboratory. **Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice**, v.43, n.6, p.1373-84, 2013.

DAWOUD, H.A; AGEELY, H.M.; HEIBA A.A. Comparison of two commercial assays and microscopy with PCR for diagnosis of malaria. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.38, p.329-338, 2008.

DONG, J.; OLANO, J.P.; MCBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.10, p.185-197, 2008.

GILBERT, M.T.P.; BUNCE, T.H.M.; SANCHEZ, J.J.; LUCAS, S.B.; JEWELL, L.D.; MARCK, E.V.; WOROBEY, M. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? **PLoS One**, v.2, n.6, p. 1-12, 2007.

GIZZI, A.B.; OLIVEIRA, S.T.; LEUTENEGGER, C.M.; ESTRADA, M.; KOZEMJAKIN, D.A.; STEDILE, R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.23, p.1-8, 2014.

GRIFFITHS, E.C.; PEDERSEN, A.B.; FENTON, A.; PETCHEY, O.L. The nature and consequences of coinfection in humans. **Journal of Infection**, v.3, p.200–206, 2011.

HORNYÁK, A.; BÁLINT, A.; FARSANG, A.; BALKÁ, G.; HAKHVERDYAN, M.; RASMUSSEN, T.B.; BLOMBERG, J.; BELÁK, S. Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer probe energy transfer (P-sg-QPCR). **Journal of Virological Methods**, v.181, n.2, p.155-63, 2012.

KRISHNA, N.K.; CUNNION, K.M. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. **Medical Clinics of North America**, v. 96. n.6, p.1067-78, 2012.

LEUTENEGGER, C. M.; CRAWFORD, C.; LEVY, J.; ESTRADA, M. Canine Distemper Virus Quantification by Real-time PCR Allows to Differentiate Vaccine Virus Interference and Wild-type Infection. In proceedings from the **American College Veterinary Internal Medicine Forum**; June, 15-18, 2011; Denver, CO.

LEUTENEGGER, C.M.; MARKS, S.L.; ROBERTSON, J; Toxin quantification of clostridium perfringens is a predictor for diarrhea in dogs and cats. **In Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)**: May 30 June 2012. Edited by McFarlane D, Sellon R. New York: Curran Associates, Inc; 2012:38.

LEUTENEGGER, C.M.; PALANIAPPAN, R.; ELSEMORE, D. Analytical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay detecting pathogenic Leptospira in dogs based on the Hap-1 gene. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.772, 2009 (abstract).

LEVY, J.K.; CRAWFORD, P.C.; KUSUHARA, H.; MOTOKAWA, K.; GEMMA, T.; WATANABE, R.; ARAI, S.; BIENZLE, D.; HOHDATSU, T. Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n.2, p.330-4, 2008.

LITTLE, S.; BIENZLE, D.; CARIOTO, L.; CHISHOLM, H.; O'BRIEN, E.; SCHERK, M. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: recommendations for testing and management. **The Canadian Veterinary Journal**, v.52, n.8, p. 849-55, 2011.

LIU, Y.T. A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases. **Infectious Disorders Drug Targets**, v.8, p.183-188, 2008.

MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.190-212, 2004.

MARTÍNEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, X.; FRANCINO, O.; ALTET, L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & Vectors**, v.4, n. 57, p.1-5, 2011.

MIDENCE, J.N.; LEUTENEGGER, C.M.; CHANDLER, A.M.; GOLDSTEIN, R.E. Effects of recent Leptospira vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, n.1, p.149-52, 2012.

NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M. R.; Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n.3, p. 309–15, 2002.

RÅDSTRÖM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; LÖVENKLEV, M.; LÖFSTRÖM, C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. **Molecular Biotechnology**, v.26, n.2, p.133-46, 2004.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n.5,

p.1014-26, 2012.

SIMONS, F.A.; VENNEMA, H.; ROFINA, J.E.; POL, J.M.; HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P.J.; EGBERINK, H.F. A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. **Journal of Virological Methods**, v.124, n.1-2, p.111-6, 2005.

SYKES, J.E.; HARTMANN, K.; LUNN, K.F.; MOORE, G.E.; STODDARD, R.A.; GOLDSTEIN, R.E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, n.1, p.1-13, 2011.

VON, S.D.; LEVERKOEHN, I.; VON, S.H.G.; GRUBER, A.D. Impact of formalin fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. **Histochemistry and Cell Biology**, v.124, n.2, p.177-88, 2005.

WANG, C.; JOHNSON, C.M.; AHLUWALIA, S.K.; CHOWDHURY, E.; LI, Y.; GAO, D.; POUDEL, A.; RAHMAN, K.S.; KALTENBOECK, B. Dual emission fluorescence resonance energy transfer (FRET) real-time PCR differentiates feline immunodeficiency virus subtypes and discriminates infected from vaccinated cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1667-72, 2010.

5 SEGUNDO CAPÍTULO. PRESENCE OF INFECTIOUS AGENTS AND CO-INFECTIOUS IN DIARRHEIC DOGS DETERMINED WITH A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION BASED PANEL (Artigo submetido e aceito pela BMC Veterinary Research)

Presence of Infectious Agents and Co-Infections In Diarrheic Dogs Determined with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Panel

5.1 ABSTRACT

Background: Infectious diarrhea can be caused by bacteria, viruses, or protozoan organisms, or a combination of these. The identification of co-infections in dogs is important to determine the prognosis and to plan strategies for their treatment and prophylaxis. Although many pathogens have been individually detected with real-time polymerase chain reaction (PCR), a comprehensive panel of agents that cause diarrhea in privately owned dogs has not yet been established. The objective of this study was to use a real-time PCR diarrhea panel to survey the frequencies of pathogens and co-infections in owned dogs attended in a veterinary hospital with and without diarrhea, as well the frequency in different countries. Feces samples were tested for canine distemper virus, canine coronavirus, canine parvovirus type 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens* alpha toxin (CPA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and *Salmonella* spp. using molecular techniques.

Results: In total, 104 diarrheic and 43 control dogs that were presented consecutively at a major private veterinary hospital were included in the study. Overall, 71/104 (68.3%) dogs with diarrhea were positive for at least one pathogen: a single infection in 39/71

dogs (54.9%) and co-infections in 32/71 dogs (45.1%), including 21/32 dogs (65.6%) with dual, 5/32 (15.6%) with triple, and 6/32 (18.8%) with quadruple infections. In the control group, 13/43 (30.2%) dogs were positive, all with single infections only. The most prevalent pathogens in the diarrheic dogs were CPA (40/104 dogs, 38.5%), CPV-2 (36/104 dogs, 34.6%), and *Giardia* spp. (14/104 dogs, 13.5%). CPV-2 was the most prevalent pathogen in the dual co-infections, associated with CPA, *Cryptosporidium* spp., or *Giardia* spp. No statistical difference ($P = 0.8374$) was observed in the duration of diarrhea or the number of deaths ($P = 0.5722$) in the presence or absence of single or co-infections.

Conclusions: Diarrheic dogs showed a higher prevalence of pathogen infections than the controls. Whereas the healthy dogs had only single infections, about half the diarrheic dogs had co-infections. Therefore, multiple pathogens should be investigated in dogs presenting with diarrhea. The effects of multiple pathogens on the disease outcomes remain unclear because the rate of death and the duration of diarrhea did not seem to be affected by these factors.

Keywords: Canine, Co-infection, Diarrhea, Panel, Real-time PCR

5.2 BACKGROUND

Canine infectious diarrhea has been considered a challenge for veterinarians because of its pathogenic variability and the concurrent presence of viral, bacterial, and protozoan co-infections (SIMPSON, 2004 ; VILLIERS e BLACKWOOD, 2005). Whereas some pathogens remain on the mucosal surface and produce potent enterotoxins that can disrupt the fluid flux, others penetrate and replicate within intact epithelial cells, producing inflammatory damage and/or destroying the host cells, which are overlapping pathological processes (GREENE e MARKS, 2012). However, many dogs harbor potential pathogens without any clinical signs, so the cause–effect relationships are far from clear.

Molecular tools have been used for the identification and diagnosis of infectious diseases, in addition to conventional culture techniques and antibody-based tools (LIU, 2008; MACKAY, 2004). Among these molecular approaches, the use of real-time polymerase chain reaction (PCR) has greatly improved the sensitivity and sensibility of standard PCR assays of pathogens in canine fecal samples (KUROWSKI et al., 2002).

Therefore, although a number of pathogens have been individually detected with real-time PCR, including *Salmonella* spp. (KUROWSKI et al., 2002) and pathogenic *Escherichia coli* strains (STENSKE et al., 2009), a comprehensive panel of potentially diarrhea-causing pathogens in owned dogs is yet to be established. Therefore, the aim of this study was to investigate pathogenic co-infections in populations of diarrheic and control owned dogs using a real-time PCR analysis of a panel of diarrhea-causing agents.

5.3 METHODS

5.3.1 Study population

A total of 147 (104 diarrheic and 43 asymptomatic) dogs consecutively presented by owners to the largest private veterinary hospital of Curitiba City, Southern Brazil, were included in the study for the realization of the real-time PCR diarrhea panel, parasitological diagnosis and clinical data collection.

Fresh fecal samples were collected from all 147 Brazilian dogs, placed in plastic vials, and kept refrigerated at 4°C until processing. At sampling, the fecal specimens were scored according to a five-point fecal scoring system for dogs, as previously described (WESTERMARCK, 2008) : 1, liquid or watery feces with no form; 2, very soft, unformed feces; 3, very soft, moderately formed feces; 4, firm, well-shaped and cylindrical feces. Diarrheic dog feces included those with scores from 1 to 3, whereas

the control dogs had no history of gastrointestinal disorders (vomiting, diarrhea, or anorexia) and fecal samples with a score of 4.

Additionally, results from 12,370 commercial samples using the same real-time PCR diarrhea panel performed in the Brazilian samples were obtained from samples originated from United States (7829), Australia (526), Canada (2855), United Kingdom (674) and Japan (486). The real-time PCR results for samples collected in different countries (Table 4) were obtained either by shipping the samples to the United States for commercial real-time PCR analysis (samples from Brazil, United States, Australia, United Kingdom, and Japan) or by allowing the diagnostic samples to be analyzed with the same real-time PCR procedure by the same service provider in the country of origin (Canada). Nucleic acid quantities, stability, and quality were assessed using internal sample controls when the samples were shipped to the United States for real-time PCR analysis.

The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and Animal Welfare of the Federal University of Parana Curitiba Campus, Paraná State, Southern Brazil (protocol number 036/2011).

5.3.2 Clinical outcomes

The diarrheic dogs were evaluated for the duration of diarrhea and death in relation to the presence of single or co-infections. Was also evaluated whether the clinical suspicion of association with infectious agents was related to the duration of diarrhea (≤ 10 days, 10 days to 2 months, and > 2 months) and whether the correct antibiotics were used (for empirical treatment after sample collection but before the results were obtained) based on the pathogen ultimately detected.

5.3.3 Real-time PCR

Total nucleic acids were extracted with standard protocols using a commercial platform (Corbett X Tractor-Gene, Qiagen, Valencia, CA, USA). A housekeeping gene (18S rRNA) was used to determine the amounts of genomic DNA and cDNA after reverse transcription and to confirm DNA integrity.

The PCR tests were based on the IDEXX proprietary RealPCR™ service platform (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Briefly, conserved nucleotide regions were selected and two primers and a hydrolysis probe were designed to hybridize to them, using commercial software (PrimerExpress Version 3.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). An additional two primers flanking the fragment amplified in the real-time PCR assay were designed for sequence verification purposes. Fecal samples were tested by hydrolysis probe-based real-time PCR assay for a panel of potential enteropathogens, including Canine Distemper Virus (CDV) (phosphoprotein G, GenBank accession number AY649446.1), Canine Coronavirus (CCoV) (M gene, Type I, AF502583; type II D13096), Canine parvovirus type 2 (CPV-2) (VP2, U22139), *Clostridium perfringens* alpha toxin (CPA) (alpha toxin, L43545), *Cryptosporidium* spp. (ssrRNA, A093489), *Giardia* spp. (ssrRNA, DQ836339), and *Salmonella* spp. (invasion A gene, EU348366) at a reference laboratory within 5 days after collection. CPA was quantified using a pre-established cutoff of > 300,000 copies/g of feces [8]. For CPV-2 a cutoff value was used to discriminate vaccine strains from wildtype infections (1.2 million CPV-2 gene equivalents per gram of stool). Real-time PCR was performed with standard primer and probe concentrations using a commercially available mastermix (LC480 ProbesMaster, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) on a commercially available real-time PCR platform (Roche LightCycler 480).

5.3.4 Analytical and clinical validation

Real-time PCRs were validated analytically and clinically. For the analytical validation, each assay was required to meet six validation criteria: amplification efficiency, linearity, intra-run reproducibility, inter-run reproducibility, r^2 value, and signal-to-noise ratio of the fluorescent signal using a specific synthetic positive control. Each assay had an analytical sensitivity of 10 molecules and an amplification efficiency between 95% and 100%. Clinical samples were selected based on a reference method for each test and a correlation study was performed. The analytical specificity of all real-time PCR tests was confirmed by resequencing the clinical sample material using additional primer pairs positioned outside the synthetic positive control. Diagnostic sensitivity and specificity based on comparisons with reference testing methods were in the high 90% for each real-time PCR test. Gold standard tests included the immunofluorescence antibody assay for CDV, enzyme-linked immunosorbent assay for CPV-2 and *Giardia*, and real-time PCR performed at the University of California Davis for CCoV, *Cryptosporidium*, and *Salmonella*.

To validate each PCR panel test result, seven quality controls were used for each sample tested: 1) PCR positive controls (quantitative); 2) PCR negative controls; 3) negative extraction controls (five per 96-well plate); 4) DNA internal sample control targeting the host 18S rRNA to quantify the DNA in the submitted diagnostic sample; 5) RNA internal sample control targeting the host 18S rRNA to quantify the cDNA in the submitted diagnostic sample after reverse transcription; 6) control to monitor environmental contamination; and 7) spike in the internal positive control to monitor PCR inhibition. These controls were used to assess the functionality of the PCR test protocol (1), the absence of contamination in the reagents (2) and laboratory (5), the absence of cross-contamination during the extraction process (3), the quality and integrity of the DNA and RNA as a measure of sample quality (4 and 5), the RT protocol (5), the absence of random positive PCR signals within the PCR laboratory (6), and the absence of PCR inhibitory substances carried over from the sample matrix (7).

5.3.5 Parasitological diagnosis

A fecal flotation procedure was performed with zinc sulfate (DRYDEN et al., 2005) and saturated sodium chloride (SLOSS et al., 1999) flotation solutions, as described previously. The parasitological test was performed with light microscopy by identifying the parasite eggs, larvae, cysts, and oocysts, according to their morphological characteristics (SLOSS et al., 1999; HENDRIX e ROBINSON, 2006).

5.3.6 Statistical analysis

The results were subjected to statistical analysis with the χ^2 test or Fisher's exact probability. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analysis was performed at a website for statistical computation (VassarStats, Vassar College, Poughkeepsie, NY, USA).

5.4 RESULTS

5.4.1 Real-time PCR

Potential enteropathogens were identified in 71/104 (68.3%) diarrheic samples in the present study, most of which contained multiples pathogens. Single infections were observed in 39/71 (54.9%) positive samples and co-infection in 32/71 (45.1%) possible samples. Dual, triple, and quadruple infections were observed among the co-infections (Table 1). The most prevalent agent involved in co-infections was canine parvovirus type 2 (CPV-2), and 21/36 (58.3%) of the diarrheic samples positive for CPV-2 were associated with others agents, most commonly with *Clostridium perfringens* alpha toxin

(CPA), *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. Although 13/43 (30.2%) of the feces samples from the control dogs were positive for the panel of diarrhea-causing pathogens, no co-infection was observed in any of these samples.

Table 1 Prevalence of single or co-infection in diarrheic and control feces using a real-time PCR panel

| Infection | Dogs | | P value |
|--------------|--------------------|-----------------------|----------|
| | Control (43) n (%) | Diarrheic (104) n (%) | |
| Negative | 30/43 (69.8) | 33/104 (31.7) | < 0.0002 |
| Positive | 13/43 (30.2) | 71/104 (68.3) | < 0.0002 |
| Single | 13/13 (100) | 39/71 (54.9) | 0.004 |
| Co-infection | none | 32/71 (45.1) | 0.004 |
| Dual | none | 21/32 (65.6) | ----- |
| Triple | none | 5/32 (15.6) | ----- |
| Quadruple | none | 6/32 (18.8) | ----- |

Of the 71/104 (68.3%) dogs with diarrhea and positive results, 26.8%, 28.2%, and 4.2% had pure viral, bacterial, and protozoan infections, respectively, whereas 7.0%, 14.0%, and 9.3% of samples from the control dogs were positive for viral, bacterial, and protozoan infections, respectively. The association of viral and bacterial infections was the most prevalent type of co-infection in the diarrheic group (37.5%), with CPV-2 and canine coronavirus (CCoV) constituting 75.0% of this type of co-infection. Viral and protozoan co-infections accounted for 25.0% of these associations, bacterial and protozoan for 6.2%, and viral, bacterial, and protozoan co-infections for 21.9% (Table 2).

Table 2 Virus, bacteria and protozoan association in diarrheic and control feces of dogs

| Pure Infection | P value | Dogs Brazil | |
|--------------------------------|---------|--------------------|-----------------------|
| | | Control (43) n (%) | Diarrheic (104) n (%) |
| Viral | 0.01306 | 3/43 (7.0) | 19/71 (26.8) |
| Bacterial | 0.10720 | 6/43 (14.0) | 20/71 (28.2) |
| Protozoan | 0.42284 | 4/43 (9.3) | 3/71 (4.2) |
| Co-infection | | | |
| Viral and Viral | | none | 3/32 (9.4) |
| Viral and Bacterial | | none | 12/32 (37.5) |
| Viral and Protozoan | | none | 8/32 (25.0) |
| Bacterial and Protozoan | | none | 2/32 (6.2) |
| Viral, Bacterial and Protozoan | | none | 7/32 (21.9) |

A significant association was found between dogs with diarrhea and positive results on the real-time PCR diarrhea panel compared with the control dogs with normal feces ($P < 0.001$).

The detection of individual pathogens in the panel with real-time PCR (Table 3) showed that CPA was the most prevalent pathogen in the fecal samples, infecting 40/104 (38.5%) diarrheic dogs and 6/43 (14.0%) control dogs, and the difference between the groups was highly statistically significant ($P = 0.006$). Despite this, it was necessary to quantify CPA to consider its probable role. When the pre-established cutoff of $> 300,000$ copies/g of feces was applied [8], a significant difference ($P = 0.0025$) between the control group (4/43, 9.3%) and the diarrheic group (37/104, 35.6%) was observed. CPV-2 was the second most prevalent pathogen, found in 36/104 (34.6%) diarrheic dogs and 0/43 (none) control dogs, and also showed a highly significant difference between the groups ($P < 0.001$).

Table 3 Individual infectious agents in the real-time PCR Canine Diarrhea Panel of dogs from Southern Brazil

| Pathogen | (Diarrheic dogs) | | (Control dogs) | | P value |
|--|-------------------------------|-------------|---------------------------|--------------|---------|
| | No. Positive (%) (n = 104) | 95% CI | No. Positive (%) (n = 43) | 95% CI | |
| Overall Rate * | 71 (68.3) | 58.3- 76.9 | 13 (30.2) | 17.67 - 46.3 | < 0.001 |
| Canine Distemper Virus | 9 (8.7) | 4.3 - 16.2 | 0 (0) | 0 – 10.2 | 0.058 |
| ** | | | | | |
| Canine parvovirus type 2 * | 36 (34.6) | 25.7 - 44.7 | 0 (0) | 0 – 10.2 | 0.001 |
| Salmonella spp. | 1 (1) | 0.05 - 6.01 | 0 (0) | 0 – 10.2 | 1 |
| Cryptosporidium spp. | 8 (7.7) | 3.6 - 15.0 | 2 (4.7) | 0.8 - 17.1 | 0.723 |
| Giardia spp. | 14 (13.5) | 7.8 - 21.9 | 2 (4.7) | 0.8 - 17.1 | 0.151 |
| Canine Coronavirus | 12 (11.5) | 6.4 - 19.7 | 3 (7) | 1.8- 20.1 | 0.554 |
| C. perfringens alpha toxin gene * | 40 (38.5) | 29.2 – 48.5 | 6 (14) | 5.8 – 28.6 | 0.006 |

* Significantly (P < 0.05) different between Diarrhea Group and Control Group.

**Significantly (P < 0.1) different between Diarrhea Group and Control Group.

Although 9/104 (8.7%) diarrheic dogs were positive for canine distemper virus (CDV), the difference between the diarrheic and control dogs was not significant (P = 0.059). Similarly, 12/104 (11.5%) diarrheic and 3/43 (7.0%) control dogs were positive for CCoV, and these rates were not significantly different (P = 0.554).

Only 1/104 (1.0%) and 8/104 (7.7%) diarrheic dogs were positive for *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp., respectively. In the control group only 2/43 (4.7%) were positive for *Cryptosporidium* spp., and the two groups did not differ significantly (P = 0.724). Although *Giardia* spp. were detected in 14/104 (13.5%) diarrheic dogs and 2/43 (4.7%) control dogs, the difference was not significant (P = 0.151).

5.4.2 Diarrhea in relation to age

Among the diarrheic samples, 43/104 were from 0–1-year-old dogs, 36/104 from 1–8-year-old dogs, and 25/104 from dogs > 8 years old. The PCR results were positive in 39/43 (90.7%) samples from animals 0–1 years old, in 20/36 (55.5%) samples from those 1–8 years old, and 12/25 (48.0%) samples from those > 8 years old. A significant association was observed between dog age and the pathogens CPV-2 ($P < 0.0001$), *Giardia* spp. ($P = 0.01$), and CCoV ($P = 0.02$), which were most prevalent among the 0–1-year-old dogs. Although CPV-2 is considered to be primarily a disease of puppies, it also occurred in 4/36 (11.1%) animals aged 1–8 years and in 3/25 (12.0%) dogs aged > 8 years. Only 13/36 (36.1%) of the positive animals for CPV-2 had no history of vaccination, in which 1/4 (25%) and 1/3 (33.3%) were adults with 1–8 years and 8 years respectively. Details of dates and brands of the vaccines were not obtained. There was a highly significant association between age and co-infection ($P < 0.0001$), which was more prevalent among the 0–1-year-old dogs, of which 25/43 (58.1%) had co-infections with two or more pathogens. Co-infection occurred less often in the other age groups, occurring in 5/36 (13.8%) dogs in the 1–8-year-old group and 3/25 (12%) dogs > 8 years old. A significantly higher prevalence ($P = 0.0026$) of viral and protozoan associations was observed in the 0–1-year-old diarrheic dogs than in the other age groups. However, no significant associations between the other co-infections and age were observed.

5.4.3 Diarrhea duration in relation to number of pathogens

No significant association ($P = 0.8374$) was observed between the duration of diarrhea and the presence of single or co-infections.

5.4.4 Diarrhea in relation to death

The presence of co-infection did not increase the number of deaths ($P = 0.5722$) more than the presence of a single infection.

5.4.5 Diarrhea in relation to clinical suspicion

In this study, even when diarrhea lasted for more than 10 days, an infectious disease was still clinically suspected ($P = 0.6606$).

5.4.6 Diarrhea in relation to the use of antibiotics

During the period from sample collection to the generation of results for the diarrhea panel analysis (approximately five days), 40/104 (38.5%) dogs received empirical treatment with combinations of two to four antibiotics. In total, 40/71 (56.34%) diarrheic dogs with positive PCR results were treated with antibiotics that were, according to the literature, inappropriate for the pathogens ultimately identified.

5.4.7 Parasitological diagnosis

In total, 20/104 (19.2%) and 3/43 (7.0%) fecal samples from diarrheic and control dogs, respectively, were positive on parasitological tests. The most prevalent intestinal parasites found in the diarrheic samples were protozoa (*Giardia* spp. and/or *Isospora* spp.), which affected 12/104 (11.5%) dogs, and helminths (*Ancylostoma* sp. and/or *Toxocara* sp.), which affected 10/104 (9.6%) dogs. All the parasites found in the three positive control samples were identified as *Ancylostoma* sp. When all the samples from diarrheic and control dogs were considered, 22/23 (95.7%) positive fecal samples and 61/124 (49.2%) negative fecal samples on parasitological tests were also positive on the real-time PCR diarrhea panel.

Of the 13/147 (8.8%) samples positive for helminths (*Ancylostoma* sp. and/or *Toxocara* sp.), 12/13 (92.3%) were also positive on the real-time PCR. Among the

134/147 (91.2%) samples negative for helminths, 71/134 (52.9%) were positive on the real-time PCR. Dogs positive for helminths were 1.7 times more likely to be positive on the real-time PCR diarrhea panel, which indicates a statistically significant association ($P = 0.006$) between the infections detected with real-time PCR and the presence of helminths.

Of the 16/147 (10.9%) samples shown to be positive for *Giardia* spp. with real-time PCR, only five were positive on the parasitological tests. Considering that real-time PCR is the gold standard for the detection of pathogenic agents, the parasitological test showed 31.2% sensitivity (95% confidence interval, 12.1%–58.5%). *Isospora* spp. were found in 7/147 (8.4%) samples with the parasitological test, and all of these samples were also positive for the agents detected with real-time PCR, suggesting that *Isospora* spp. are usually involved in co-infections.

5.4.8 Results between countries

The prevalence of diarrheic dogs observed in the Brazilian samples (68.3%) was similar to that observed in the United States (54.5%), Australia (58.4%), Canada (52.0%), United Kingdom (51.7%), and Japan (49.6%), as shown in Table 4. The rate of co-infection observed in Brazilian diarrheic dogs (45.1%) was also higher than those in the other countries tested (Table 4) and a significant difference was observed between United States ($P < 0.0001$), Australia ($P = 0.01$) and Canada ($P = 0.04$).

Table 4 Canine Diarrhea Panel from diarrheic dogs of Brazil, United States, Australia Canada, UK and Japan

| Infectious Agent | Brazil | US | Australia | Canada | UK | Japan |
|-----------------------------------|-------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | Prevalence | | | | | |
| Canine Distemper Virus | 8.7% | 1.4% *** | 2.3% ** | 1.6% *** | 2.5% ** | 1.0% *** |
| <i>Salmonella</i> spp. | 1.0% | 2.2% | 4.6% | 5.0% | 0.0% | 3.0% |
| Canine parvovirus type 2 | 34.6% | 1.9% *** | 6.8% *** | 8.0% *** | 35.1% | 9.0% *** |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | 7.7% | 5.4% | 4.0% | 14.0% | 34.7% *** | 9.0% |
| <i>Giardia</i> spp. | 13.5% | 10.5% | 10.8% | 14.0% | 20.2% | 10.0% |
| Canine Coronavirus | 11.5% | 13.9% | 5.1% * | 11.0% | 16.9% | 26.0% *** |
| <i>C. perfringens</i> alpha toxin | 38.5% | 36.2% | 45.6% | 46.0% | 51.2% * | 21.0% *** |
| Overall Infection Rate | 68.3% | 54.5% ** | 58.4% | 52.0% ** | 51.7% ** | 49.6% *** |
| Coinfection Rate | 45.1% | 24.9% *** | 31.3% * | 34.0% * | 41.9% | 35.3% |
| Samples included | n = 104 | n = 7829 | n = 526 | n = 2855 | n = 674 | n = 486 |

* Significantly (P < 0.05).

**Significantly (P < 0.01).

***Significantly (P < 0.001).

5.5 DISCUSSION

A high prevalence (68.3%) of diarrheic dogs, shown to harbor at least one pathogen by real-time PCR, was observed in the Brazilian samples, which exceeded those in the United States (54.5%), Australia (58.4%), Canada (52.0%), United Kingdom (51.7%), and Japan (49.6%), as shown in Table 4. The rate of co-infection observed here in diarrheic dogs (45.1%) was also higher than those in the other countries tested. Despite the higher prevalence of enteropathogens and co-infections in Brazil, the rates in the other countries are also relevant, indicating that infectious diarrhea may be a global phenomenon rather than a phenomenon specific to a particular country. Because all dogs with co-infections belonged to the diarrheic group and co-infections were observed in all age categories, this study highlights the importance of investigating multipathogen co-infections, especially in dogs aged 0–1 years, in which the rate of co-infection was 4-fold higher than in the other age groups.

Many enteric viruses, bacterial pathogens, and parasites probably contribute to disease both individually and in combination (O'RYAN et al., 2005), and together, co-infecting pathogens may cause more severe diarrhea than infections with each pathogen alone (GRIMPREL et al., 2008). The pathogens involved in a co-infection can interact synergistically, for example via the host's immune system, with the presence of one enhancing the abundance and/or virulence of the other, resulting in even greater pathogenesis and a greater contribution to the overall disease burden (GRIFFITHS et al., 2011; BHAVNANI et al., 2012). Therefore, interspecific pathogen interactions can alter the pathogen dynamics, host health, and the success of control strategies (LELLO et al., 2008; PEDERSEN e FENTON, 2007).

In this study, co-infection did not increase the duration of diarrhea and there was no significant difference in the number of deaths in animals with or without co-infections. Because there was no reliable correlation between the interaction of enteropathogens in co-infections in this study, the cause–effect relationship between the presence of an organism and the occurrence of diarrhea is still unclear. Opportunistic or commensal organisms may be identified from an imbalance in the intestinal flora or dysbiosis, and not all the co-infecting agents present must be treated to produce a good outcome. However, because all the infectious agents evaluated here have been described as causing diarrhea in experimental studies, knowledge of their presence allows treatments and prevention strategies to be planned. In this study, even when diarrhea persisted for more than 10 days, the infectious diseases were still present in the differential diagnosis. Empirical treatments and the use of several antibiotics are common in routine veterinary practice and the use of a panel to detect multiples pathogens prevents the incorrect or excessive use of antimicrobial drugs, which could cause resistance. Furthermore, some of these pathogens are potential zoonotic agents, including hookworms, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Salmonella* spp., and the identification of these organisms can reduce the risk of their transmission to humans and others animals.

Although this study focused on client-owned dogs, dogs received in animal shelters are also expected to carry pathogen co-infections, including zoonotic agents

[15]. However, differences have been observed in the prevalence of each agent, especially in terms of the co-infection rates, and dogs from shelters with diarrhea showed a higher prevalence of co-infection (96.0%) (TUPLER et al., 2012) than was observed in this study (45.1%). That heterogeneous dog population had a higher rate of crowding, and the dogs may have been immunocompromised for clinical, nutritional, and/or psychological reasons, exposed to more environmental pathogens, and sometimes with inadequate health care, so their high co-infection rate cannot be compared validly with that of owned dogs in households.

The highest rate of co-infection in this study involved the association of viral and bacterial agents, in contrast to the highest co-infection in dogs in the United States, which was caused by viruses and protozoans. The highest co-infection rates were for CPV-2 and CPA, observed in 9/12 (75.0%) samples from dogs in Brazil, and for CCoV and *Giardia* spp., which occurred together in 35.4% of dogs from the United States. These co-infections may have clinical effects and may require more-intensive efforts to ensure the appropriate treatments to eliminate specific pathogens and to correct electrolyte, acid–base, and nutritional disturbances, potential sepsis, and other metabolic consequences (RICHTER, 2008).

The alpha toxin gene is present in all strains of *Clostridium perfringens* and may be found in asymptomatic dogs as part of the normal intestinal microflora (MARKS, 2002), as in 14% of the control dogs in the present study. Data from some studies indicate that conventional PCR that targets only CPA will almost always be positive and of virtually no clinical use (MARKS, 2002). However, a recent study demonstrated that the quantification of CPA may be used as a diagnostic marker for association of the agent in patients with diarrhea (LEUTENEGGER, 2012). Using the same methodology and cutoff value as a previous study (LEUTENEGGER, 2012), we observed a significant difference between the control group (4/43, 9.3%) and in the diarrheic group (37/104, 35.6%; $P = 0.0025$) in the proportion of animals positive for > 300,000 copies of CPA. The higher amount of CPA in the diarrheic dogs than in the control dogs suggests that the high concentrations of toxins produced by this organism exert a pathogenic effect on the gastrointestinal tract.

In the present study, diarrheic dogs co-infected with CPA had 3-fold more copies than those that were infected with only CPA. We hypothesize that in these cases, *C. perfringens* overgrowth in the bacterial flora increases the toxin expressed, which contributes to the dog's diarrhea.

All the control dogs were negative for CPV-2, which was strongly associated with diarrhea ($P = 0.000004$), with an overall occurrence of 36/104 (34.6%) in the diarrheic dogs. The same prevalence (18/51, 34.6%) was observed in a study also conducted in Brazil but performed only with puppies up to 6 months old (CASTRO et al., 2007) and corroborated with previous surveys, which reported rates varying from 16% (SCHULZ et al., 2008) to 58% (GODSALL et al., 2010). Although CPV-2 has been considered to be primarily disease of puppies, the present study has shown the importance of also investigating adult dogs for CPV-2, since occurred in 11.1% of 1–8 year old dogs and in 12.0% of dogs older than 8 years. The CPV-2 was most prevalent agent involved in co-infections in this study, in which 58.3% of the diarrheic samples positive for CPV-2 were associated with others agents, contrasting with only 3.8% CPV-2 co-infection observed in the study with puppies (CASTRO et al., 2007). This variability may be related to the geographic regions examined, the populations studied, agents investigated and the diagnostic techniques used (GODSALL et al., 2010). Although the date of live-modified vaccination was not the focus of this study, the CPV-2 cutoff value used was able to differentiate vaccine strains from wild-type infections. Despite the use of vaccination, the CPV-2 was still spread among the dogs as observed in this study, in which only 13/36 (36.1%) of the positive animals for CPV-2 had no history of vaccination. Still remains unclear whether type-2 vaccines can provide protection against the new variants of the CPV, but a recent study observed that the cases of vaccine failure are most likely not associated to the mutations detected in the sequenced regions (CASTRO et al., 2011). Thus, further studies should elucidate whether local parvovirus strains are effectively controlled by the currently available vaccines and which factors may be associated with the vaccination efficacy. CPV-2 was the most prevalent agent associated with dual co-infections in the present study, which may be attributable to highly contaminated environments or low dog immunity (DECARO e BUONAVOGLIA , 2012).

Although the detection rate of CCoV was higher in the diarrheic dogs (11.54%) than in the control dogs (6.98%), the lack of a statistically significant difference in these rates may indicate a secondary role for CCoV as an intestinal pathogen in dogs. Although the shedding of CPV-2 seemed to be associated with clinical signs of gastroenteritis, CCoV was also detected in healthy dogs, as previously reported (SCHULZ et al., 2008). Although CCoV infections are characterized by high morbidity and low mortality, with typically mild enteritis in dogs (DECARO e BUONAVOGLIA, 2008; DECARO et al., 2011), 11/12 (91.7%) diarrheic dogs with CCoV were co-infected with other enteric pathogens, which may have aggravated their clinical signs and even caused higher mortality, as reported earlier for CPV-2 (DECARO et al., 2006), canine adenovirus type 1 (DECARO et al., 2007), and CDV (DECARO et al., 2004). CDV tended to be significantly higher in the diarrheic dogs than in the control dogs; although not significant, the P value was very close to the limit of significance (P = 0.059).

Whereas some enteropathogens, such as *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp., showed similar prevalences in the various countries tested (Table 4), CDV and CPV-2 were approximately 4-fold more prevalent in Brazil, indicating that the higher incidence of viral diseases may be related to differences in strain pathogenicity, vaccination status, and environmental factors.

Although the CPV-2 strain and vaccine status/response may play important roles in viral infection and host immunity, further studies are required to fully understand this specific pattern of CPV-2 infections in Brazil.

Although intestinal parasites contribute to diarrhea, 95.7% of positive and 49.2% negative samples on the parasitological tests were also positive on the real-time PCR diarrhea panel, indicating that fecal parasitological tests alone should not be used as a single diagnostic tool.

5.6 CONCLUSIONS

To the best of our knowledge, this is the first real-time PCR-based analysis of a panel of diarrhea-causing pathogens performed in Brazil. Our results indicate that dogs with diarrhea show a relatively high prevalence of pathogenic infections, highlighting the importance of investigating infectious pathogens in dogs with diarrhea. Whereas asymptomatic dogs had single infections only, approximately half the diarrheic dogs presented with co-infections, emphasizing the importance of the simultaneous investigation of multiple pathogens in individual samples. The most prevalent pathogens in diarrheic dogs in Brazil were *C. perfringens* alpha toxin, CPV-2, and *Giardia* spp. Among the dual co-infections observed, CPV-2 was most commonly associated with *C. perfringens* alpha toxin, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp.

In this study, co-infection did not increase the duration of diarrhea or increase the risk of death. However, considering that all the infectious agents examined have been described as causing diarrhea in experimental studies, knowledge of their presence should allow us to plan treatments and prevention strategies. The effects of multiple pathogens on the disease outcomes remain unclear, because neither the death rate nor the duration of diarrhea seemed to be affected by these factors.

REFERENCES

- BHAVNANI, D.; GOLDSTICK, J.E.; CEVALLOS, W.; TRUEBA, G.; EISENBERG, J.N.: **Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease:evidence from a community-based study in northwestern Ecuador.** *American Journal of Epidemiology*, v.5, p. 387–395, 2012.
- CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.: **Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil.** *Ressearch in Veterinary Science*, v. 90, p. 336–340, 2011.
- CASTRO, T.X.; UCHOA, C.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C.; LABARTHE, N.V.; GARCIA, R.C.N.C.: **Canine parvovirus (CPV) and intestinal parasites: laboratorial diagnosis and clinical signs from puppies with gastroenteritis.** *Internal Journal Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 5, p.72–76, 2007.
- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.: **An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology.** *Veterinary Microbiology*, v. 132, p. 221–234, 2008.
- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.: **Canine parvovirus - a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c.** *Veterinary Microbiology*, v. 155, p. 1–12, 2012.
- DECARO, N.; CAMERO, M.; GRECO, G.; ZIZZO, N.; TINELLI, A.; CAMPOLO, M.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, C.: **Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel.** *New Microbiologica*, v. 27, p.177–181, 2004.
- DECARO, N.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, D.; COLAIANNI, M.L.; LORUSSO, A.; MARI, V.; BUONAVOGLIA, C.: **Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy.** *Research in Veterinary Science*, v. 83, p. 269–273, 2007.
- DECARO, N.; DESARIO, C.; BILLI, M.; MARI, V.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C.: **Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs.** *The Veterinary Journal*, v. 187, p.195–199, 2011.
- DECARO, N.; MARTELLA, V.; DESARIO, C.; BELLACICCO, A.L.; CAMERO, A.L.; CAMERO, M.; MANNA, L.; D’ALOJA, D.; BUONAVOGLIA, C.: **First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain.** *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 53, p. 468–472, 2006.

DRYDEN, M.W.; PAYNE, P.A.; RIDLEY, R.; SMITH, R.V.T.: **Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts.** *Veterinary Therapeutics*, v.6, p.14–28, 2005.

GODSALL, S.A.; CLEGG, S.R.; STAVISKY, J.H.; RADFORD, A.D.; PINCHBECK, G.: **Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals.** *Veterinary Record*, v.167, p.196–201, 2010.

GREENE, C.E.; MARKS, S.L.: **Gastrointestinal and Intra-Abdominal Infections.** In *Infectious Diseases of the dog and cat*. 4th edition. Edited by Greene CE. St. Louis: Saunders Elsevier; p. 950–981, 2012.

GRIFFITHS, E.C.; PEDERSEN, A.B.; FENTON, A.; PETCHEY, O.L.: **The nature and consequences of coinfection in humans.** *Journal of Infection*, v. 3, p. 200–206, 2011.

GRIMPREL, E.; RODRIGO, C., DESSELBERGER, U.: **Rotavirus disease: impact of coinfections.** *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, p. S3–S10, 2008.

HENDRIX, C.M.; ROBINSON, E.: **Common Laboratory Procedures For Diagnosing Parasitism.** In *Diagnostic Parasitology For Veterinary Technicians*. 3rd edition. Edited by Hendrix CM, Robinson E. St Louis: Mosby Elsevier; p. 227-245, 2006.

KUROWSKI, P.B.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; MORLEY, P.S.; GENTRY-WEEKS, C.R.: **Detection of *Salmonella* spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay.** *American Journal of Veterinary Research*, v. 63, p.1265–1268, 2002.

LELLO, J.; NORMAN, R.A; BOAG, B.; HUDSON, P.J.; FENTON, A.: **Pathogen interactions population cycles, and phase shifts.** *The American Naturalist*, v. 2, p. 176–182, 2008.

LEUTENEGGER, C.M.; MARKS, S.L.; ROBERTSON, J.: **Toxin Quantification of *Clostridium Perfringens* is a Predictor for Diarrhea in Dogs and Cats.** In *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM): May 30 June 2012*. Edited by McFarlane D, Sellon R. New York: Curran Associates, Inc; n. 38, 2012:.

LIU, Y.T.: **A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases.** *Infectious Disorders - Drug Targets*, v. 8, p. 183–188, 2008.

MACKAY, I.M.: **Real-time PCR in the microbiology laboratory.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, p.190–212, 2004.

MARKS, S.L.; KATHER, E.J.; KASS, P.H.; MELLI, A.C.: **Genotypic and phenotypic characterization of *clostridium perfringens* and *clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.16, p. 533–540, 2002.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L.K.: **A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world.** *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 16, p.125–136, 2005.

PEDERSEN, A.B.; FENTON, A.: **Emphasizing the ecology in parasite community ecology.** *Trends in Ecology & Evolution*, v. 3, p. 133–139, 2007.

RICHTER, K.P.: **Clinical Evaluation of Dogs and Cats with Specific Clinical Signs.** In *Small Animal Gastroenterology*. Edited by Stainer JM. Hannover: Schluetersche; p. 115–120, 2008.

SCHULZ, B.S.; STRAUCH, C.; MUELLER, R.S.; EICHHORN, W.; HARTMANN, K.: **Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy.** *Journal of Small Animal Practice*, v. 49, p. 84–88, 2008.

SIMPSON, K.W.: **Gastric Disease.** In *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Volume 2.* 6th edition. Edited by Ettinger SJ, Feldman EC. Philadelphia: WB Saunders Co; p. 1310–1331, 2004.

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; KEMP, L.R.: **Exame de Fezes Para Diagnostico de Parasitas.** In *Parasitologia Clínica Veterinária.* 6th edition. Edited by Zajac AM. São Paulo: Manole Ltda; p. 03–44, 1999.

STENSKE, K.A.; BEMIS, D.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P.; DRAUGHON, F.A.; MATTESON, K.J.; BARTGES, J.W.: **Prevalence of urovirulence genes *cnf*, *hlyD*, *sfafoc*, and *papGIII* in fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners.** *American Journal of Veterinary Research*, v. 70, p. 1401–1406, 2009.

TUPLER, T.; LEVY, J.K.; SABSHIN, A.J.; TUCKER, S.J.; GREINER, E.C.; LEUTENEGGER, C.M.: **Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal Shelter with normal feces or diarrhea.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 241, p. 338–343, 2012.

VILLIERS, E.; BLACKWOOD, L.: **Laboratory Evaluation of Gastrointestinal Disease.** In *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology.* 2nd edition. Edited by German AJ, Hall EJ. Gloucester: BSAVA; p. 207–222, 2005.

WESTERMARCK, E.: **Clinical Evaluation of Patients with Chronic Diarrhea.** In *Small Animal Gastroenterology.* 1st edition. Edited by Stainer JM. Hannover: Schluetersche; p. 127–133, 2008.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi observada uma alta prevalência (68,3%) dos patógenos pesquisados em cães diarreicos, onde praticamente metade (45,1%) deles apresentavam co-infecções de dois até quatro patógenos, destacando portanto a importância de se investigar múltiplos patógenos em cães com diarreia.

A relação de causa e efeito entre a presença do patógeno e o envolvimento com o quadro diarreico do paciente ainda permanece incerta. Entretanto, considerando-se que todos os patógenos pesquisados são potencialmente patogênicos e que os mesmos podem interagir sinergicamente aumentando a quantidade e/ou virulência dos demais patógenos envolvidos, o entendimento e a detecção destes agentes permite um adequado planejamento de tratamento e respectivas estratégias de prevenção.

Dentre os patógenos pesquisados, os agentes mais prevalentes nos cães diarreicos foram *C. perfringens* alpha toxin, CPV-2, e *Giardia* spp. Já entre as co-infecções, o CPV-2 foi o mais comumente associado com o *C. perfringens* alpha toxina, *Cryptosporidium* spp., e *Giardia* spp., respectivamente.

Observou-se também que 13% dos cães do grupo controle apresentavam-se infectados por um dos agentes pesquisados. Mesmo frente a uma menor prevalência quando comparada ao grupo diarreico, destaca-se que estes animais mesmo que assintomáticos, podem ser fonte de infecção para outros animais e até mesmo seres humanos.

A PCR em tempo-real mostrou-se uma excelente ferramenta diagnóstica para detecção de patógenos em amostras fecais, principalmente para detecção de múltiplos patógenos quando utilizado na forma de painéis.

7 APÊNDICE

QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA DESENVOLVIMENTO DO PROJETO :

VALOR DIAGNÓSTICO DE PAINÉIS DE PCR EM TEMPO-REAL PARA DETECTAR CO-INFECÇÕES DE AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA EM CÃES

Número de acesso #: _____ Cão

Nome do proprietário:

CEP do cliente / proprietário: _____ - _____

Dados do paciente: Idade _____ anos e _____ meses
Macho Fêmea Castrado(a): sim não
Raça _____

Escore corporal (1-9): 1 2 3 4 5 6 7 8 9
(1=muito magro, 5=ideal, 9=muito gordo)

Vacinado? não () Sim () Octupla() giardia () raiva ()
esquema de vacinação em dia? não () Sim ()
vermifugado? () nao () sim qual _____ quando _____

Ambiente: Gato: Sem acesso externo Cão: quintal / pouco contato com outros cães
Acesso externo Acesso a parques / contato com canis

Contactantes: cães () gatos () aves () outros() _____

Razão da consulta: Visita Anual Doente
Se doente, o que apresenta: Diarréia Outro: _____
quê: _____

Exames realizados até o momento: hemograma () bioquímica sérica ()
urinálise () ecografia abdominal () radiografia ()
outros() _____

Exame físico: melena () hematoquesia () muco () presença de cestóides ou nematóides
()
presença de material não-digerido () corpos estranhos ()
resultado do exame parasitológico de rotina (verminose):

Suspeita clínica: _____

Diagnóstico clínico: _____

Razão para exame de fezes: Rotina Diarréia Outro: por
quê _____

Apetite: Normal Diminuído Aumentado

Vômitos: não sim

Perda de peso: não sim

O animal está recebendo antibióticos: não sim

Se sim, qual (is) antibiótico (s): _____

Se diarréia, pergunte ao cliente se tem tempo para responder as seguintes questões:

Duração da Diarréia (dias): _____

Frequência de Defecação (número de fezes por dia): 1-2 x dia 3-5 x dia \geq 5 x dia

Dificuldade de Defecação: Não Sim

Presença de sangue nas fezes: Não Sim Se sim: vermelho vivo (hematoquesia)
 escuro/negro (melena)

Escore fecal (1-4): 1 2 3 4

1 = bem firme, 2 = médio; 3 = mole; 4 = aquoso

O animal está recebendo alguma outra medicação para diarréia: não sim

Se sim, qual (is) medicação (ões) _____

Mudança de alimentação nos últimos dias (intencional ou acidental). Não Sim

Qual (comeu o que)? _____

Tem mais algum animal apresentando os mesmos sinais clínicos na casa?

8 ANEXOS

8.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA SCA



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 036/2011, referente ao projeto “ Valor diagnóstico de painéis Real-Time PCR para detectar co-infecções de agentes causadores da diarreia em cães ”, sob a responsabilidade de Simone Tostes de Oliveira Stedile, na forma que foi apresentado (utilização de 180 animais), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 30 de setembro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 036/2011, regarding the project “Diagnostic value of Real-Time PCR panel to detect co-infection of agents causing diarrhea in dogs”, in charge of Simone Tostes de Oliveira Stedile, in the terms it was presented (using 180 animals), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on September 2011.

Curitiba, 30 de setembro de 2011.

Geraldo Câmilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

8.2 RESUMO APRESENTADO NO 34^o CONGRESSO DA ANCLIVEPA

Archives of Veterinary Science, v. 17, (supl.) RESUMO 147, 2012

147. PAINEL DE PCR EM TEMPO-REAL NA DETECÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA EM CÃES E SUAS CO-INFECÇÕES

Aline b. Rocha gizzi, dvm^{1,3}; Simone T. Oliveira dvm, ms, phd¹; Christian Leutenegger, dvm, phd²; Denise A. Kozemjakin³, dvm, msc; Mary Marcondes, dvm, ms, phd⁴; Alexander W. Biondo, dvm, ms, phd¹.

¹Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil - abiondo@illinois.edu. ²Idexx Laboratories, Sacramento, EUA. ³Clinilab Laboratório de Patologia Animal, Curitiba, Brasil. ⁴Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brasil.

RESUMO

Foram analisadas amostras de fezes de cães com diarreia por painel de PCR em tempo-real, incluindo o vírus da Cinomose Canina, o Coronavírus Entérico Canino, o Parvovírus Canino 2 (PC2), *Clostridium perfringens* enterotoxina A, *Cryptosporidium* spp., *Salmonella* spp. e *Giardia* spp. Do total das amostras, 71/104 (68.27%) apresentaram pelo menos um agente etiológico, sendo 39/71 (54.93%) com infecção única e 32/71 (45.07%) apresentando co-infecções, das quais 21/32 (65,62%) possuíam dois agentes etiológicos associados, 5/32 (15,63%) com três e 6/32 (18,75%) associação de quatro. Em CONCLUSÃO, co-infecção com até quatro patógenos é frequente na diarreia em cães.

PALAVRAS-CHAVES diarreia, canina, PCR em tempo real, painel

PANEL OF REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF AGENTS IN CAUSING DIARRHEA IN DOGS AND CO-INFECTONS

ABSTRACT Feces samples from dogs with diarrhea were analyzed by panel of Real Time PCR, including Canine Distemper Virus, Canine Enteric Virus, Canine Parvovirus 2 (CP-2), *Clostridium perfringens* enterotoxin A, *Cryptosporidium* spp., *Salmonella* spp. and *Giardia* spp. Out of the total of samples, 71/104 (68.27%) presented at least one agent; 39/71 (54.93%) single infection and 32/71 (45.07%) co-infection, of which 21/32 (65.62%) with two, 5/32 (15.63%) with three and 6/32 (18.75%) with four infections agents. In conclusion, co-infection with up to four pathogens is frequent in dogs with diarrhea.

KEYWORDS: diarrhea, canine, Real Time PCR, panel

INTRODUÇÃO

O manejo e diagnóstico definitivo da diarreia canina é um desafio, devido a variedade de patógenos, sinais clínicos não específicos e presença concomitante de co-infecções. Além de ser potencial indutor de doença em cães, muitos enteropatógenos apresentam riscos zoonóticos para os seres humanos. As zoonoses caninas intestinais (em particular, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.) são consideradas de extrema importância.¹ Técnicas tradicionais para diagnóstico laboratorial destes patógenos, como por exemplo a cultura fecal, apresentam baixa sensibilidade. A utilização de painéis de PCR em tempo real para cães e gatos com diarreia confere uma nova perspectiva na detecção rápida e sensível de genes de toxinas e agentes infecciosos.² O presente estudo teve como objetivos detectar a prevalência dos principais agentes responsáveis por diarreia em cães por meio de RT-PCR e avaliar a presença de co-infecções.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 104 amostras de fezes de cães com diarreia e 43 amostras de fezes normais (grupo controle). As amostras foram estocadas sob refrigeração por um período não superior a 05 dias até o momento da extração total do ácido nucléico e da realização do PCR em tempo real. O painel diarreia de PCR em tempo-real incluiu a detecção molecular do vírus da Cinomose canina, Coronavírus entérico canino, Parvovírus canino 2, *Clostridium perfringens* enterotoxina A, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Salmonella* spp.

RESULTADOS

Dos 104 cães com diarreia, 71(68.27%) foram positivos para pelo menos um agente etiológico. A prevalência de infecções por um único agente foi de 39/71(54.93%), sendo que 32/71 (45.07%) apresentaram mais de um enteropatógeno nas fezes. Destas amostras 9/104 (8.65%) foram positivas para o vírus da Cinomose Canina, 12/104 (11.54%) para Coronavírus Entérico Canino, 36/104 (34.62%) para Parvovírus Canino 2 (PC2), 40/104 (38.46%) para *Clostridium Perfringens* enterotoxina A, 8/104 (7.69%) para *Cryptosporidium* spp., 1/104 (0,96%) para *Salmonella* spp. e 14/104 (13.46%) para *Giardia* spp. No grupo controle não foi observada co-infecção, onde das 43 amostras, 02 (4.65%) foram positivas para *Cryptosporidium* spp., 02/43 (4.65%) para *Giardia* spp., 03/43 (6.98%) para Coronavírus Entérico Canino e 06/43

(13.95%) para *Clostridium Perfringens* enterotoxina A. Não foram detectadas nas fezes o vírus da Cinomose Canina, Parvovírus Canino 2 (PC2) e *Salmonella* spp. e, 30/43 (69.77%) das amostras controles foram negativas. Houve uma associação entre a presença de enteropatógenos e o desenvolvimento de diarreia com valor de $P=0.000026$. Os agentes de maior prevalência neste estudo foram Parvovírus Canino 2 e *Clostridium Perfringens*, com valor de $P = 0.000004$ e $P = 005703$ respectivamente.

DISCUSSÃO

Este estudo revelou uma alta incidência destes patógenos contribuindo para a diarreia em cães e também alta prevalência de co-infecções quando comparado a um estudo semelhante realizado com fezes diarreicas nos Estados Unidos que obteve 24.9% de co-infecções (LEUTENEGGER*). Diferentemente deste estudo americano, onde o *Clostridium Perfringens* e o Coronavírus Entérico Canino foram os agentes mais prevalentes, o Parvovírus Canino 2 foi o agente etiológico de maior importância.

CONCLUSÃO:

A utilização da técnica de PCR em Tempo Real demonstrou ser uma excelente ferramenta para identificação dos agentes etiológicos de diarreias caninas, auxiliando o clínico veterinário no manejo e tratamento destes pacientes, bem como na escolha de medidas profiláticas especialmente quando se trata de zoonoses.

AGRADECIMENTOS: Somos gratos aos Médicos Veterinários do Hospital Veterinário Clinivet, Curitiba, Brasil, pela preciosa assistência no fornecimento de dados epidemiológicos e amostras de fezes.

REFERÊNCIAS

- 1- HACKETT T, LAPPIN MR. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2003 Jan-Feb;39(1):52-6.
 - 2 - MARKS SL, RANKIN SC, BYRNE BA, WEESE JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med.* 2011 Nov-Dec;25(6):1195-208.
- *LEUTENEGGER, C. IDEXX laboratories. Comunicação pessoal, 2011.

8.3 ABSTRACT ENVIADO PARA O 2ND BIENNIAL SYMPOSIUM OF ISCAID

PREVALENCE OF INFECTIOUS AGENTS CAUSING DIARRHEA IN DOGS FROM SOUTHERN BRAZIL DETERMINED WITH A REAL-TIME PCR BASED PANEL

Aline B. Gizzi; Simone T. Oliveira; Christian Leutenegger; Marko Estrada; Denise A. Kozemjakin; Rafael Stedile; Mary Marcondes; Alexander W. Biondo

From the Department of Veterinary Medicine, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil (Gizzi, Oliveira, Biondo); the Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois, IL, USA (Biondo); IDEXX Laboratories Inc., West Sacramento, CA, USA (Leutenegger, Estrada); Clinivet Veterinary Hospital and Clinilab Laboratory of Animal Pathology, Curitiba, PR, Brazil (Gizzi, Kozemjakin); the Department of Animal Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil (Stedile); and the Department of Clinics, Surgery and Animal Reproduction, College of Veterinary Medicine, São Paulo State University, Araçatuba, São Paulo, Brazil (Marcondes).

Background - Canine infectious diarrhea has been considered a challenge due the pathogen variety, nonspecific clinical signs and co-infections.

Objective - Use of real-time PCR diarrhea panel for survey of pathogen co-infection in a population of diarrheic and control dogs of Southern Brazil.

Animals - A total of 104 diarrheic and 43 control dogs consecutively presented at a private veterinary hospital from January to September, 2011.

Methods - Feces samples were submitted for DNA / RNA extraction. Diarrhea panel of real-time PCR included molecular detection of Canine Distemper Virus (CDV), Canine Enteric Coronavirus (CECoV), Canine Parvovirus 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens* enterotoxin A gene (CPEA), *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp and *Salmonella* spp.

Results - An overall 71/104 (68.3%) dogs with diarrhea were positive for at least one pathogen: single infection in 39/71 (54.9%) and co-infection in 32/71 (45.1%), which represented 21/32 (65.6%) dogs with dual, 5/32 (15.6%) with triple and 6/32 (18.8%) with quadruple infection. Control group presented 13/43 (30.2%) of positive dogs, all with single infection only. The most prevalent pathogens in diarrheic dogs were CPEA with 40/104 (38.5%), Canine Parvovirus 2 with 36/104 (34.6%) and *Giardia* spp with 14/104 (13.5%) dogs. Among dual co-infection, Canine Parvovirus 2 was the most prevalent association with CPEA, *Cryptosporidium* spp and *Giardia* spp, respectively.

Conclusions - Diarrheic dogs showed a higher prevalence of pathogen infection than controls. Whereas healthy dogs had single infections only, about half of diarrheic dogs presented with co-infections. Therefore, investigation of multiple pathogens should be considered in dogs presenting diarrhea.

8.4 RESUMOS APRESENTADO NO 35^o CONGRESSO DA ANCLIVEPA

8.4.1 IMPORTÂNCIA DA NÃO UTILIZAÇÃO DO COPROPARASITOLÓGICO COMO ÚNICA FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM CÃES COM DIARREIA

The importance of not using only the fecal parasitological as a tool diagnostic in dogs with diarrhea

Aline Baumann Rocha GIZZI^{1,2}; Alexander Welker BIONDO¹; Christian LEUTENEGGER³; Mary MARCONDES⁴; Rafael STEDILE⁵; David POWOLNY⁶; Mariana Cordeiro de OLIVEIRA⁶; Karina Francini BRAGA¹; Simone Tostes OLIVEIRA¹.

1 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil – alinebaumannrocha@yahoo.com.br

2 Clinilab Laboratório de Patologia Animal, Curitiba, Brasil

3 Idexx Laboratories, Sacramento, EUA.

4 Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brasil.

5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

6 Cinivet Hospital Veterinario, Curitiba, Brasil.

Resumo

Foram analisadas 147 amostras de fezes de cães, sendo 104 diarreicas e 43 normais (controle). As amostras foram submetidas à realização de exame coproparasitológico através da técnica de flutuação fecal para identificação de ovos de parasitas, larvas, cistos e oocistos. Adicionalmente foi realizado um painel de PCR em tempo-real (qPCR) que incluiu a detecção do vírus da Cinomose Canina, Coronavirus Entérico Canino, Parvovirus Canino 2, *Clostridium perfringens* enterotoxina A, *Cryptosporidium* spp, *Giardia* sp. e *Salmonella* spp. Um total de 20/104 (19,2%) e 71/104 (68,3%) das amostras fecais diarreicas e de 3/43 (7,0%) e 13/43 (30,2%) das amostras normais foi positivo para o exame coproparasitológico e qPCR, respectivamente. Cães positivos para helmintos foram 1,7 vezes mais propensos a ser positivo no painel de qPCR. Considerando a qPCR como padrão-ouro, o coproparasitológico apresentou apenas 31,2% de sensibilidade para a detecção de *Giardia* sp.

Palavras-chaves: cão, coinfeção, diagnóstico, fezes, PCR em tempo real, verminose

Abstract

A total of 147 fecal samples of dogs including 104 diarrheal and 43 normal (control) were analyzed. The samples were submitted to fecal parasitological using the fecal flotation technique for identification of parasite eggs, larvae, cysts and oocysts. Additionally there was a panel of real-time PCR (qPCR) which included the detection of Canine Distemper Virus, Canine Enteric Coronavirus, Canine Parvovirus 2, *Clostridium perfringens* enterotoxin A, *Cryptosporidium* spp, *Giardia* sp. and *Salmonella* spp. A total of 20/104 (19.2%) and 71/104 (68.3%) of the diarrheal fecal samples and 3/43 (7.0%) and 13/43 (30.2%) of normal samples were positive for the fecal parasitological technique and qPCR, respectively. Dogs positive for helminths were 1.7 times more likely to be positive in the qPCR panel. Considering the qPCR as the gold standard, the fecal parasitological showed only 31.2% sensitivity for the detection of *Giardia* sp. The study shows the importance of using laboratory techniques such as qPCR panels, able to detect multiple pathogens and fecal parasitological should not be used alone even in cases of positive results.

Palavras-chaves: dog, coinfection, diagnosis, feces, real time PCR, worms

Introdução

A diarreia infecciosa em cães pode ser causada por vermes intestinais, protozoários, vírus ou bactérias. O exame coproparasitológico é uma técnica antiga e bastante difundida para detecção de verminose, porém apresenta sensibilidade moderada, tanto em relação à detecção de protozoários quanto frente à baixa infecção parasitaria do paciente (DRYDEN et al., 2005). Além disso, a utilização de apenas esta técnica não é suficiente para detecção de vírus ou identificação de bactérias patogênicas. Com a introdução das técnicas de detecção molecular e a disponibilidade de se testar vários patógenos através de PCR na rotina de pequenos animais, a possibilidade de identificação de agentes dificilmente detectados através de outras técnicas torna a PCR uma ferramenta importante (LIU, 2008; MACKAY, 2004). O objetivo deste trabalho é avaliar a relação entre a presença de verminose encontrada no coproparasitológico e coinfeções causadas por vírus, bactérias ou protozoários, detectados através de PCR em tempo real (qPCR) em cães.

Material e métodos

Foram analisadas 147 amostras de fezes de cães, sendo 104 diarreicas e 43 normais (controle). O exame coproparasitológico foi realizado utilizando a técnica de flutuação fecal com as soluções de sulfato de zinco e cloreto de sódio saturado; onde através de microscopia de luz foram identificados ovos de parasitas, larvas, cistos e oocistos, de acordo com as suas características morfológicas. As amostras foram submetidas à extração de DNA/RNA e subsequente qPCR (IDEXX RealPCR™), que incluiu um painel para detecção molecular do vírus da Cinomose Canina (CDV), Coronavirus Enterico Canino (CECoV), Parvovirus Canino 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens*

enterotoxina A (CPEA), *Cryptosporidium* spp, *Giardia* sp. e *Salmonella* spp. A análise estatística foi feita através do Qui-quadrado ou Exato de Fischer, considerando-se $P < 0,005$ como significativo.

Resultados e discussão

Um total de 20/104 (19,2%) das amostras fecais diarreicas foram positivas para o exame coproparasitológico, sendo 12/104 (11,5%) com protozoários (*Giardia* sp. e/ou *Isospora* spp.), 10/104 (9,6%) com helmintos (*Ancylostoma* sp. e/ou *Toxocara* sp.). No grupo controle 3/43 (7,0%) foram positivas, sendo identificadas como *Ancylostoma* sp. No painel qPCR, 71/104 (68,3%) das amostras diarreicas foram positivas para pelo menos um agente e 13/43 (30,2%) das amostras normais foram positivas, todas com uma única infecção.

Das 13/147 (8,8%) amostras com presença de helmintos (*Ancylostoma* sp. e/ou *Toxocara* sp.), 12/13 (92,3%) foram positivas para qPCR e das 134/147 (91,2%) negativas para helmintos, 71/134 (52,9%) foram positivas no qPCR. Cães positivos para helmintos foram 1,7 vezes mais propensos a ser positivo no painel de qPCR realizado, sendo evidenciada uma associação estatisticamente significativa ($P=0,006$) entre infecções detectadas no qPCR e presença de helmintos e, quando comparadas àquelas com ausência de helmintos.

Através do qPCR, foram identificadas 16/147 (10,9%) amostras positivas para *Giardia* sp., e destas apenas 5 detectadas no coproparasitológico. Considerando o qPCR como padrão-ouro para a detecção do agente, o coproparasitológico apresentou 31,2% de sensibilidade (IC 95% entre 12,1 e 58,5%). Em relação a *Isospora* sp., foram encontradas 7/147 (8,4%) amostras positivas através do coproparasitológico. A inclusão da *Isospora* sp. no qPCR de forma semelhante a *Giardia* sp. poderia facilitar o diagnóstico.

Conclusões

A maioria dos cães com presença de helmintos (*Ancylostoma* sp. e/ou *Toxocara* sp.) nas fezes apresentam coinfeção que são detectadas no qPCR. O coproparasitológico apresenta baixa sensibilidade na detecção de *Giardia* quando comparado com o PCR em tempo real.

O estudo mostra a importância do uso de técnicas laboratoriais como painéis de qPCR, capazes de detectar múltiplos patógenos, não devendo o coproparasitológico ser utilizado isoladamente, mesmo nos casos de resultados positivos.

Referências

DRYDEN M.W., PAYNE P.A., RIDLEY R, et al. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. **Vet Ther.**; v. 6, p. 14-28, 2005.

LIU Y.T. A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases. **Infect Disord Drug Targets.**; v. 8, p. 183-188, 2008.

MACKAY I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin Microbiol Infect.**; v.10, p. 190-212, 2004.

8.4.2 AGENTES INFECCIOSOS CAUSADORES DE DIARREIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM IDADE EM CÃES

Infectious agents causing diarrhea and its association to age in dogs

Aline Baumann Rocha GIZZI^{1,2}; Karina Francini BRAGA¹, Christian LEUTENEGGER³; Daphine Maciel ALBINO²; Mary MARCONDES⁴; Rafael STEDILE⁵, Alexander Welker BIONDO¹; Simone Tostes OLIVEIRA¹.

1 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil – karina_francini_braga@yahoo.com.br.

2 Clinilab Laboratório de Patologia Animal, Curitiba, Brasil

3 Idexx Laboratories, Sacramento, EUA.

4 Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, Brasil.

5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Resumo

Um total de 104 amostras de fezes diarreicas de cães foram submetidas à realização de um painel de PCR em tempo-real que incluiu a detecção do vírus da Cinomose Canina, o Coronavírus Entérico Canino (CEC), o Parvovírus Canino 2 (PC2), *Clostridium perfringens* enterotoxina A (CPEA), *Cryptosporidium* spp., *Salmonella* spp. e *Giardia* spp. Dentre as amostras analisadas, 43/104 foram provenientes de animais de 0 a 1 ano de idade, 36/104 de 1 a 8 anos de idade e 25/104 acima de 8 anos de idade. Observou-se diferença estatística entre os grupos de idade para os agentes PC2, *Giardia* spp. e CEC, sendo mais prevalente nos cães entre 0-1 ano de idade. Houve diferença altamente significativa entre faixa etária e animais com coinfeção ($P < 0,0001$), sendo esta mais prevalente em animais de 0-1 ano. Em conclusão, a presença de patógenos infecciosos foi detectada em cães diarreicos para todas as faixas etárias estudadas, destacando a importância da investigação destes patógenos independente da idade do cão.

Palavras-chaves: enterite, faixa etária, PCR em tempo real, coinfeção, cão

Abstract

A real-time PCR (qPCR) panel was performed in 104 diarrheic faeces samples of dogs. The panel included the detection of Canine Distemper Virus, Canine Enteric Coronavirus (CEC), Canine Parvovirus 2 (CP2), *Clostridium perfringens* enterotoxin A gene (CPEA), *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp and *Salmonella* spp. Among the samples, 43/104 were from 0-1 year-old dogs, 36/104 from 1-8 years-old dogs and 25/104 from dogs over 8 years-old. Statistical difference was observed between age and the pathogens CP2, *Giardia* spp. and CEC, being more prevalent among the 0-1 year-old dogs. There was a high significant difference between age and coinfection ($P < 0,0001$), being more prevalent among the 0-1 year-old dogs. In conclusion, the presence of infectious pathogens was detected in diarrheic dogs of all ages, highlighting the importance of investigating these pathogens regardless of the age of the dog.

Keyword: enteritis, age, real time PCR, coinfection, dog

Introdução

A diarreia é um problema comum na rotina clínica dos veterinários de animais de companhia. A diarreia infecciosa apresenta uma grande variedade de patógenos, e pode apresentar presença concomitante de coinfeções (SIMPSON, 2004; VILLIERS & BLACKWOOD, 2005), sendo estas muitas vezes não diagnosticadas. Tratamentos sintomáticos e dietas são frequentemente estabelecidos sem se obter um diagnóstico definitivo, aumentando a possibilidade de falha terapêutica, persistência dos sinais clínicos e insatisfação do cliente.

Técnicas tradicionais para diagnóstico laboratorial destes patógenos, como por exemplo, a cultura fecal, apresentam baixa sensibilidade (LIU, 2008). A utilização de painéis de PCR em tempo real (qPCR) para cães e gatos com diarreia confere uma nova perspectiva na detecção rápida e sensível de genes de toxinas e agentes infecciosos (VILLIERS & BLACKWOOD, 2005). O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre idade, infecções e coinfeções, detectadas através de qPCR em cães com diarreia.

Material e métodos

Foram analisadas 104 amostras de fezes de cães com diarreia. Após extração de DNA/RNA, foi realizado painel de diarreia através de qPCR (IDEXX RealPCR™), que incluiu a detecção do vírus da Cinomose canina, Coronavírus Entérico Canino (CEC), Parvovírus Canino 2 (PC2), *Clostridium perfringens* enterotoxina A (CPEA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Salmonella* spp. Os cães foram divididos nas seguintes faixas etárias: 0-1 ano, 1-8 anos e acima de 8 anos. A avaliação entre idade dos animais e presença dos patógenos foi feita através do teste G, considerando estatisticamente significativo $P \leq 0,05$.

Resultados e discussão

Dos 104 cães com diarreia, 71 (68,3%) foram positivos para pelo menos um agente etiológico. A prevalência de infecções por um único agente foi de 38/71 (53,5%), sendo que 33/71 (46,5%) apresentaram mais de um enteropatógeno nas fezes. Destas amostras, 9/104 (8,7%) foram positivas para o vírus da Cinomose Canina, 12/104 (11,5%) para CEC, 36/104 (34,6%) para PC2, 40/104 (38,5%) para CPEA, 8/104 (7,7%) para *Cryptosporidium* spp., 1/104 (1,0%) para *Salmonella* spp. e 14/104 (13,5%) para *Giardia* spp. A maioria das coinfeções identificadas era a associação entre vírus e bactéria (36,4%), vírus e protozoário (21,2%), ou a associação entre estes três agentes (21,2%). Associação entre vírus e vírus (15,2%) e entre bactéria e protozoário (6,1%) ocorreram em menor proporção

Dentre as amostras analisadas, 43/104 foram provenientes de animais de 0 a 1 ano de idade, 36/104 de 1 a 8 anos de idade e 25/104 acima de 8 anos de idade. Resultados positivos foram observado em 39/43 (90,7%) amostras de animais de 0 a 1 ano, 20/36 (55,5%) de 1 a 8 anos e em 12/25 (48,0%) acima de 8 anos. Observou-se diferença estatística entre os grupos de idade para os agentes PC2, *Giardia* spp. e CEC ($P = < 0,0001$, 0,01 e 0,02, respectivamente), sendo mais prevalente nos cães com faixa etária de 0 a 1 ano. Um dado observado em relação ao PC2 foi que 4/35 (11,43%) dos animais de 1

a 8 anos e 3/26 (11,54%) dos animais acima de 8 anos também tiveram resultados positivos, apesar do PC2 ser considerado primariamente uma doença de filhotes. Salmonelose foi detectada apenas em um cão, sendo este com mais de 8 anos de idade; e CEC e cinomose não foram detectados em cães com mais de 8 anos. Como na cinomose em cães idosos prevalece a sintomatologia nervosa, sem diarreia, isto poderia explicar a ausência deste patógeno nos cães idosos deste estudo. Em animais entre 0-1 ano de idade, 25/43(58,1%) apresentaram coinfeções com 2 ou mais agentes. Em relação à associação entre idade e coinfeção, houve diferença significativa ($P=0,0026$) na a associação vírus e protozoário, sendo os cães entre 0-1 ano mais acometidos. Não houve diferença estatística entre as outras coinfeções e faixa etária.

Conclusão

As coinfeções foram mais prevalentes em animais mais jovens, entre 0-1 ano de idade. A presença de patógenos infecciosos foi detectada em cães diarreicos para todas as faixas etárias estudadas, destacando-se a importância da investigação destes patógenos, independente da idade do cão.

Referências

LIU Y.T., A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets*; v. 8, p. 183-188, 2008.

SIMPSON, K. W. Gastric disease. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN E.C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; v. 2, p. 1310–1331, 2004.

VILLIERS E; BLACKWOOD L. Laboratory evaluation of gastrointestinal disease In: GERMAN, A.J.; HALL E.J. *Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. BSAVA. 2ed. Gloucester: BSAVA;. p. 207-2

8.5 ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BMC VETERINARY RESEARCH

8.5.1 PRESENCE OF INFECTIOUS AGENTS AND CO-INFECTIONS IN DIARRHEIC DOGS DETERMINED WITH A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED PANEL

Gizzi et al. *BMC Veterinary Research* 2014, **10**:23
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/23>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel

Aline Baumann da Rocha Gizzi^{1*}, Simone Tostes Oliveira¹, Christian M Leutenegger², Marko Estrada², Denise Adamczyk Kozemjakin³, Rafael Stedile⁴, Mary Marcondes⁵ and Alexander Welker Blondo^{1,6}

Abstract

Background: Infectious diarrhea can be caused by bacteria, viruses, or protozoan organisms, or a combination of these. The identification of co-infections in dogs is important to determine the prognosis and to plan strategies for their treatment and prophylaxis. Although many pathogens have been individually detected with real-time polymerase chain reaction (PCR), a comprehensive panel of agents that cause diarrhea in privately owned dogs has not yet been established. The objective of this study was to use a real-time PCR diarrhea panel to survey the frequencies of pathogens and co-infections in owned dogs attended in a veterinary hospital with and without diarrhea, as well the frequency in different countries. Feces samples were tested for canine distemper virus, canine coronavirus, canine parvovirus type 2 (CPV-2), *Clostridium perfringens* alpha toxin (CPA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and *Salmonella* spp. using molecular techniques.

Results: In total, 104 diarrheic and 43 control dogs that were presented consecutively at a major private veterinary hospital were included in the study. Overall, 71/104 (68.3%) dogs with diarrhea were positive for at least one pathogen: a single infection in 39/71 dogs (54.9%) and co-infections in 32/71 dogs (45.1%), including 21/32 dogs (65.6%) with dual, 5/32 (15.6%) with triple, and 6/32 (18.8%) with quadruple infections. In the control group, 13/43 (30.2%) dogs were positive, all with single infections only. The most prevalent pathogens in the diarrheic dogs were CPA (40/104 dogs, 38.5%), CPV-2 (36/104 dogs, 34.6%), and *Giardia* spp. (14/104 dogs, 13.5%). CPV-2 was the most prevalent pathogen in the dual co-infections, associated with CPA, *Cryptosporidium* spp., or *Giardia* spp. No statistical difference ($P = 0.8374$) was observed in the duration of diarrhea or the number of deaths ($P = 0.5722$) in the presence or absence of single or co-infections.

Conclusions: Diarrheic dogs showed a higher prevalence of pathogen infections than the controls. Whereas the healthy dogs had only single infections, about half the diarrheic dogs had co-infections. Therefore, multiple pathogens should be investigated in dogs presenting with diarrhea. The effects of multiple pathogens on the disease outcomes remain unclear because the rate of death and the duration of diarrhea did not seem to be affected by these factors.

Keywords: Canine, Co-infection, Diarrhea, Panel, Real-time PCR

* Correspondence: alinebgizzi@gmail.com

¹Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, 1540 R dos Funcionários, Curitiba, PR 80035-050, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Gizzi et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Canine infectious diarrhea has been considered a challenge for veterinarians because of its pathogenic variability and the concurrent presence of viral, bacterial, and protozoan co-infections [1,2]. Whereas some pathogens remain on the mucosal surface and produce potent enterotoxins that can disrupt the fluid flux, others penetrate and replicate within intact epithelial cells, producing inflammatory damage and/or destroying the host cells, which are overlapping pathological processes [3]. However, many dogs harbor potential pathogens without any clinical signs, so the cause-effect relationships are far from clear.

Molecular tools have been used for the identification and diagnosis of infectious diseases, in addition to conventional culture techniques and antibody-based tools [4,5]. Among these molecular approaches, the use of real-time polymerase chain reaction (PCR) has greatly improved the sensitivity and sensibility of standard PCR assays of pathogens in canine fecal samples [6].

Therefore, although a number of pathogens have been individually detected with real-time PCR, including *Salmonella* spp. [6] and pathogenic *Escherichia coli* strains [7], a comprehensive panel of potentially diarrhea-causing pathogens in owned dogs is yet to be established. Therefore, the aim of this study was to investigate pathogenic co-infections in populations of diarrheic and control owned dogs using a real-time PCR analysis of a panel of diarrhea-causing agents.

Results

Real-time PCR

Potential enteropathogens were identified in 71/104 (68.3%) diarrheic samples in the present study, most of which contained multiples pathogens. Single infections were observed in 39/71 (54.9%) positive samples and co-infection in 32/71 (45.1%) possible samples. Dual, triple, and quadruple infections were observed among the co-infections (Table 1). The most prevalent agent involved in co-infections was canine parvovirus type 2 (CPV-2), and 21/36 (58.3%) of the diarrheic samples positive for

CPV-2 were associated with others agents, most commonly with *Clostridium perfringens* alpha toxin (CPA), *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. Although 13/43 (30.2%) of the feces samples from the control dogs were positive for the panel of diarrhea-causing pathogens, no co-infection was observed in any of these samples.

Of the 71/104 (68.3%) dogs with diarrhea and positive results, 26.8%, 28.2%, and 4.2% had pure viral, bacterial, and protozoan infections, respectively, whereas 7.0%, 14.0%, and 9.3% of samples from the control dogs were positive for viral, bacterial, and protozoan infections, respectively. The association of viral and bacterial infections was the most prevalent type of co-infection in the diarrheic group (37.5%), with CPV-2 and canine coronavirus (CCoV) constituting 75.0% of this type of co-infection. Viral and protozoan co-infections accounted for 25.0% of these associations, bacterial and protozoan for 6.2%, and viral, bacterial, and protozoan co-infections for 21.9% (Table 2).

A significant association was found between dogs with diarrhea and positive results on the real-time PCR diarrhea panel compared with the control dogs with normal feces ($P < 0.001$).

The detection of individual pathogens in the panel with real-time PCR (Table 3) showed that CPA was the most prevalent pathogen in the fecal samples, infecting 40/104 (38.5%) diarrheic dogs and 6/43 (14.0%) control dogs, and the difference between the groups was highly statistically significant ($P = 0.006$). Despite this, it was necessary to quantify CPA to consider its probable role. When the pre-established cutoff of $> 300,000$ copies/g of feces was applied [8], a significant difference ($P = 0.0025$) between the control group (4/43, 9.3%) and the diarrheic group (37/104, 35.6%) was observed. CPV-2 was the second most prevalent pathogen, found in 36/104 (34.6%) diarrheic dogs and 0/43 (none) control dogs, and also showed a highly significant difference between the groups ($P < 0.001$).

Table 1 Prevalence of single or co-infection in diarrheic and control feces using a real-time PCR panel

| Infection | Dogs | | P value |
|--------------|--------------------|-----------------------|----------|
| | Control (43) n (%) | Diarrheic (104) n (%) | |
| Negative | 30/43 (69.8) | 33/104 (31.7) | < 0.0002 |
| Positive | 13/43 (30.2) | 71/104 (68.3) | < 0.0002 |
| Single | 13/13 (100) | 39/71 (54.9) | 0.004 |
| Co-infection | None | 32/71 (45.1) | 0.004 |
| Dual | None | 21/32 (65.6) | ———— |
| Triple | None | 5/32 (15.6) | ———— |
| Quadruple | None | 6/32 (18.8) | ———— |

Table 2 Virus, bacteria and protozoan association in diarrheic and control feces of dogs

| Pure infection | P value | Dogs Brazil | |
|--------------------------------|---------|--------------------|-----------------------|
| | | Control (43) n (%) | Diarrheic (104) n (%) |
| Viral | 0.01306 | 3/43 (7.0) | 19/71 (26.8) |
| Bacterial | 0.10720 | 6/43 (14.0) | 20/71 (28.2) |
| Protozoan | 0.42284 | 4/43 (9.3) | 3/71 (4.2) |
| Co-infection | | | |
| Viral and viral | | None | 3/32 (9.4) |
| Viral and bacterial | | None | 12/32 (37.5) |
| Viral and protozoan | | None | 8/32 (25.0) |
| Bacterial and protozoan | | None | 2/32 (6.2) |
| Viral, bacterial and protozoan | | None | 7/32 (21.9) |

Table 3 Individual infectious agents in the real-time PCR canine diarrhea panel of dogs from Southern Brazil

| Pathogen | (Diarrheic dogs) | | (Control dogs) | | P value |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------|------------------------------|--------------|---------|
| | No. positive (%) (n = 104) | 95% CI | No. positive (%) (n = 43) | 95% CI | |
| Overall rate* | 71 (68.3) | 58.3- 76.9 | 13 (30.2) | 17.67 - 46.3 | < 0.001 |
| Canine distemper virus** | 9 (8.7) | 4.3 - 16.2 | 0 (0) | 0 - 10.2 | 0.058 |
| Canine parvovirus type 2* | 36 (34.6) | 25.7 - 44.7 | 0 (0) | 0 - 10.2 | 0.001 |
| Salmonella spp. | 1 (1) | 0.05 - 6.01 | 0 (0) | 0 - 10.2 | 1 |
| Cryptosporidium spp. | 8 (7.7) | 3.6 - 15.0 | 2 (4.7) | 0.8 - 17.1 | 0.723 |
| Giardia spp. | 14 (13.5) | 7.8 - 21.9 | 2 (4.7) | 0.8 - 17.1 | 0.151 |
| Canine coronavirus | 12 (11.5) | 6.4 - 19.7 | 3 (7) | 1.8- 20.1 | 0.554 |
| C. perfringens alpha toxin gene* | 40 (38.5) | 29.2 - 48.5 | 6 (14) | 5.8 - 28.6 | 0.006 |

*Significantly (P < 0.05) different between Diarrhea Group and Control Group.
 **Significantly (P < 0.1) different between Diarrhea Group and Control Group.

Although 9/104 (8.7%) diarrheic dogs were positive for canine distemper virus (CDV), the difference between the diarrheic and control dogs was not significant (P = 0.059). Similarly, 12/104 (11.5%) diarrheic and 3/43 (7.0%) control dogs were positive for CCoV, and these rates were not significantly different (P = 0.554).

Only 1/104 (1.0%) and 8/104 (7.7%) diarrheic dogs were positive for *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp., respectively. In the control group only 2/43 (4.7%) were positive for *Cryptosporidium* spp., and the two groups did not differ significantly (P = 0.724). Although *Giardia* spp. were detected in 14/104 (13.5%) diarrheic dogs and 2/43 (4.7%) control dogs, the difference was not significant (P = 0.151).

Diarrhea in relation to age

Among the diarrheic samples, 43/104 were from 0–1-year-old dogs, 36/104 from 1–8-year-old dogs, and 25/104 from dogs > 8 years old. The PCR results were positive in 39/43 (90.7%) samples from animals 0–1 years old, in 20/36 (55.5%) samples from those 1–8 years old, and 12/25 (48.0%) samples from those > 8 years old. A significant association was observed between dog age and the pathogens CPV-2 (P < 0.0001), *Giardia* spp. (P = 0.01), and CCoV (P = 0.02), which were most prevalent among the 0–1-year-old dogs. Although CPV-2 is considered to be primarily a disease of puppies, it also occurred in 4/36 (11.1%) animals aged 1–8 years and in 3/25 (12.0%) dogs aged > 8 years. Only 13/36 (36.1%) of the positive animals for CPV-2 had no history of vaccination, in which 1/4 (25%) and 1/3 (33.3%) were adults with 1–8 years and 8 years respectively. Details of dates and brands of the vaccines were not obtained. There was a highly significant association between age and co-infection (P < 0.0001), which was more prevalent among the 0–1-year-old dogs, of which 25/43 (58.1%) had co-infections with two or more pathogens. Co-infection occurred less often in the other age groups, occurring in 5/36 (13.8%) dogs in the 1–8-

year-old group and 3/25 (12%) dogs > 8 years old. A significantly higher prevalence (P = 0.0026) of viral and protozoan associations was observed in the 0–1-year-old diarrheic dogs than in the other age groups. However, no significant associations between the other co-infections and age were observed.

Diarrhea duration in relation to number of pathogens

No significant association (P = 0.8374) was observed between the duration of diarrhea and the presence of single or co-infections.

Diarrhea in relation to death

The presence of co-infection did not increase the number of deaths (P = 0.5722) more than the presence of a single infection.

Diarrhea in relation to clinical suspicion

In this study, even when diarrhea lasted for more than 10 days, an infectious disease was still clinically suspected (P = 0.6606).

Diarrhea in relation to the use of antibiotics

During the period from sample collection to the generation of results for the diarrhea panel analysis (approximately five days), 40/104 (38.5%) dogs received empirical treatment with combinations of two to four antibiotics. In total, 40/71 (56.34%) diarrheic dogs with positive PCR results were treated with antibiotics that were, according to the literature, inappropriate for the pathogens ultimately identified.

Parasitological diagnosis

In total, 20/104 (19.2%) and 3/43 (7.0%) fecal samples from diarrheic and control dogs, respectively, were positive on parasitological tests. The most prevalent intestinal parasites found in the diarrheic samples were protozoa (*Giardia* spp. and/or *Isospora* spp.), which affected 12/104 (11.5%) dogs, and helminths (*Ancylostoma* sp. and/or

Toxocara sp.), which affected 10/104 (9.6%) dogs. All the parasites found in the three positive control samples were identified as *Ancylostoma* sp. When all the samples from diarrheic and control dogs were considered, 22/23 (95.7%) positive fecal samples and 61/124 (49.2%) negative fecal samples on parasitological tests were also positive on the real-time PCR diarrhea panel.

Of the 13/147 (8.8%) samples positive for helminths (*Ancylostoma* sp. and/or *Toxocara* sp.), 12/13 (92.3%) were also positive on the real-time PCR. Among the 134/147 (91.2%) samples negative for helminths, 71/134 (52.9%) were positive on the real-time PCR. Dogs positive for helminths were 1.7 times more likely to be positive on the real-time PCR diarrhea panel, which indicates a statistically significant association ($P = 0.006$) between the infections detected with real-time PCR and the presence of helminths.

Of the 16/147 (10.9%) samples shown to be positive for *Giardia* spp. with real-time PCR, only five were positive on the parasitological tests. Considering that real-time PCR is the gold standard for the detection of pathogenic agents, the parasitological test showed 31.2% sensitivity (95% confidence interval, 12.1%–58.5%). *Isospora* spp. were found in 7/147 (8.4%) samples with the parasitological test, and all of these samples were also positive for the agents detected with real-time PCR, suggesting that *Isospora* spp. are usually involved in co-infections.

Results between countries

The prevalence of diarrheic dogs observed in the Brazilian samples (68.3%) was similar to that observed in the United States (54.5%), Australia (58.4%), Canada (52.0%), United Kingdom (51.7%), and Japan (49.6%), as shown in Table 4. The rate of co-infection observed in Brazilian diarrheic dogs (45.1%) was also higher than those in the other

countries tested (Table 4) and a significant difference was observed between United States ($P < 0.0001$), Australia ($P = 0.01$) and Canada ($P = 0.04$).

Discussion

A high prevalence (68.3%) of diarrheic dogs, shown to harbor at least one pathogen by real-time PCR, was observed in the Brazilian samples, which exceeded those in the United States (54.5%), Australia (58.4%), Canada (52.0%), United Kingdom (51.7%), and Japan (49.6%), as shown in Table 4. The rate of co-infection observed here in diarrheic dogs (45.1%) was also higher than those in the other countries tested. Despite the higher prevalence of enteropathogens and co-infections in Brazil, the rates in the other countries are also relevant, indicating that infectious diarrhea may be a global phenomenon rather than a phenomenon specific to a particular country. Because all dogs with co-infections belonged to the diarrheic group and co-infections were observed in all age categories, this study highlights the importance of investigating multi-pathogen co-infections, especially in dogs aged 0–1 years, in which the rate of co-infection was 4-fold higher than in the other age groups.

Many enteric viruses, bacterial pathogens, and parasites probably contribute to disease both individually and in combination [9], and together, co-infecting pathogens may cause more severe diarrhea than infections with each pathogen alone [10]. The pathogens involved in a co-infection can interact synergistically, for example via the host's immune system, with the presence of one enhancing the abundance and/or virulence of the other, resulting in even greater pathogenesis and a greater contribution to the overall disease burden [11,12]. Therefore, interspecific pathogen interactions can alter the pathogen dynamics, host health, and the success of control strategies [13,14].

Table 4 Canine diarrhea panel from diarrheic dogs of Brazil, United States, Australia Canada, UK and Japan

| Infectious agent | Brazil | US | Australia | Canada | UK | Japan |
|-----------------------------------|-------------------|----------|-----------|----------|----------|----------|
| | Prevalence | | | | | |
| Canine distemper virus | 8.7% | 1.4%*** | 2.3%** | 1.6%*** | 2.5%** | 1.0%*** |
| Salmonella spp. | 1.0% | 2.2% | 4.6% | 5.0% | 0.0% | 3.0% |
| Canine parvovirus type 2 | 34.6% | 1.9%*** | 6.8%*** | 8.0%*** | 35.1% | 9.0%*** |
| Cryptosporidium spp. | 7.7% | 5.4% | 4.0% | 14.0% | 34.7%*** | 9.0% |
| Giardia spp. | 13.5% | 10.5% | 10.8% | 14.0% | 20.2% | 10.0% |
| Canine coronavirus | 11.5% | 13.9% | 5.1%* | 11.0% | 16.9% | 26.0%*** |
| <i>C. perfringens</i> alpha toxin | 38.5% | 36.2% | 45.6% | 46.0% | 51.2%* | 21.0%*** |
| Overall infection rate | 68.3% | 54.5%** | 58.4% | 52.0%** | 51.7%** | 49.6%*** |
| Coinfection rate | 45.1% | 24.9%*** | 31.3%* | 34.0%* | 41.9% | 35.3% |
| Samples included | n = 104 | n = 7829 | n = 526 | n = 2855 | n = 674 | n = 486 |

*Significantly ($P < 0.05$).
 **Significantly ($P < 0.01$).
 ***Significantly ($P < 0.001$).

In this study, co-infection did not increase the duration of diarrhea and there was no significant difference in the number of deaths in animals with or without co-infections. Because there was no reliable correlation between the interaction of enteropathogens in co-infections in this study, the cause-effect relationship between the presence of an organism and the occurrence of diarrhea is still unclear. Opportunistic or commensal organisms may be identified from an imbalance in the intestinal flora or dysbiosis, and not all the co-infecting agents present must be treated to produce a good outcome. However, because all the infectious agents evaluated here have been described as causing diarrhea in experimental studies, knowledge of their presence allows treatments and prevention strategies to be planned. In this study, even when diarrhea persisted for more than 10 days, the infectious diseases were still present in the differential diagnosis. Empirical treatments and the use of several antibiotics are common in routine veterinary practice and the use of a panel to detect multiples pathogens prevents the incorrect or excessive use of antimicrobial drugs, which could cause resistance. Furthermore, some of these pathogens are potential zoonotic agents, including hookworms, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Salmonella* spp., and the identification of these organisms can reduce the risk of their transmission to humans and others animals.

Although this study focused on client-owned dogs, dogs received in animal shelters are also expected to carry pathogen co-infections, including zoonotic agents [15]. However, differences have been observed in the prevalence of each agent, especially in terms of the co-infection rates, and dogs from shelters with diarrhea showed a higher prevalence of co-infection (96.0%) [15] than was observed in this study (45.1%). That heterogeneous dog population had a higher rate of crowding, and the dogs may have been immunocompromised for clinical, nutritional, and/or psychological reasons, exposed to more environmental pathogens, and sometimes with inadequate health care, so their high co-infection rate cannot be compared validly with that of owned dogs in households.

The highest rate of co-infection in this study involved the association of viral and bacterial agents, in contrast to the highest co-infection in dogs in the United States, which was caused by viruses and protozoans. The highest co-infection rates were for CPV-2 and CPA, observed in 9/12 (75.0%) samples from dogs in Brazil, and for CCoV and *Giardia* spp., which occurred together in 35.4% of dogs from the United States. These co-infections may have clinical effects and may require more-intensive efforts to ensure the appropriate treatments to eliminate specific pathogens and to correct electrolyte, acid-base, and nutritional disturbances, potential sepsis, and other metabolic consequences [16].

The alpha toxin gene is present in all strains of *Clostridium perfringens* and may be found in asymptomatic dogs as part of the normal intestinal microflora [17], as in 14% of the control dogs in the present study. Data from some studies indicate that conventional PCR that targets only CPA will almost always be positive and of virtually no clinical use [17]. However, a recent study demonstrated that the quantification of CPA may be used as a diagnostic marker for association of the agent in patients with diarrhea [8]. Using the same methodology and cutoff value as a previous study [8], we observed a significant difference between the control group (4/43, 9.3%) and in the diarrheic group (37/104, 35.6%; $P = 0.0025$) in the proportion of animals positive for >300,000 copies of CPA. The higher amount of CPA in the diarrheic dogs than in the control dogs suggests that the high concentrations of toxins produced by this organism exert a pathogenic effect on the gastrointestinal tract. In the present study, diarrheic dogs co-infected with CPA had 3-fold more copies than those that were infected with only CPA. We hypothesize that in these cases, *C. perfringens* overgrowth in the bacterial flora increases the toxin expressed, which contributes to the dog's diarrhea.

All the control dogs were negative for CPV-2, which was strongly associated with diarrhea ($P = 0.000004$), with an overall occurrence of 36/104 (34.6%) in the diarrheic dogs. The same prevalence (18/51, 34.6%) was observed in a study also conducted in Brazil but performed only with puppies up to 6 months old [18] and corroborated with previous surveys, which reported rates varying from 16% [19] to 58% [20]. Although CPV-2 has been considered to be primarily disease of puppies, the present study has shown the importance of also investigating adult dogs for CPV-2, since occurred in 11.1% of 1-8 year old dogs and in 12.0% of dogs older than 8 years. The CPV-2 was most prevalent agent involved in co-infections in this study, in which 58.3% of the diarrheic samples positive for CPV-2 were associated with others agents, contrasting with only 3.8% CPV-2 co-infection observed in the study with puppies [18]. This variability may be related to the geographic regions examined, the populations studied, agents investigated and the diagnostic techniques used [20]. Although the date of live-modified vaccination was not the focus of this study, the CPV-2 cutoff value used was able to differentiate vaccine strains from wild-type infections. Despite the use of vaccination, the CPV-2 was still spread among the dogs as observed in this study, in which only 13/36 (36.1%) of the positive animals for CPV-2 had no history of vaccination. Still remains unclear whether type-2 vaccines can provide protection against the new variants of the CPV, but a recent study observed that the cases of vaccine failure are most likely not associated to the mutations detected in the sequenced regions [21]. Thus, further studies should elucidate whether local

parvovirus strains are effectively controlled by the currently available vaccines and which factors may be associated with the vaccination efficacy. CPV-2 was the most prevalent agent associated with dual co-infections in the present study, which may be attributable to highly contaminated environments or low dog immunity [22].

Although the detection rate of CCoV was higher in the diarrheic dogs (11.54%) than in the control dogs (6.98%), the lack of a statistically significant difference in these rates may indicate a secondary role for CCoV as an intestinal pathogen in dogs. Although the shedding of CPV-2 seemed to be associated with clinical signs of gastroenteritis, CCoV was also detected in healthy dogs, as previously reported [19]. Although CCoV infections are characterized by high morbidity and low mortality, with typically mild enteritis in dogs [23,24], 11/12 (91.7%) diarrheic dogs with CCoV were co-infected with other enteric pathogens, which may have aggravated their clinical signs and even caused higher mortality, as reported earlier for CPV-2 [25], canine adenovirus type 1 [26], and CDV [27]. CDV tended to be significantly higher in the diarrheic dogs than in the control dogs; although not significant, the P value was very close to the limit of significance ($P = 0.059$).

Whereas some enteropathogens, such as *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp., showed similar prevalences in the various countries tested (Table 4), CDV and CPV-2 were approximately 4-fold more prevalent in Brazil, indicating that the higher incidence of viral diseases may be related to differences in strain pathogenicity, vaccination status, and environmental factors.

Although the CPV-2 strain and vaccine status/response may play important roles in viral infection and host immunity, further studies are required to fully understand this specific pattern of CPV-2 infections in Brazil.

Although intestinal parasites contribute to diarrhea, 95.7% of positive and 49.2% negative samples on the parasitological tests were also positive on the real-time PCR diarrhea panel, indicating that fecal parasitological tests alone should not be used as a single diagnostic tool.

Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first real-time PCR-based analysis of a panel of diarrhea-causing pathogens performed in Brazil. Our results indicate that dogs with diarrhea show a relatively high prevalence of pathogenic infections, highlighting the importance of investigating infectious pathogens in dogs with diarrhea. Whereas asymptomatic dogs had single infections only, approximately half the diarrheic dogs presented with co-infections, emphasizing the importance of the simultaneous investigation of multiple pathogens in individual samples. The most prevalent pathogens in diarrheic

dogs in Brazil were *C. perfringens* alpha toxin, CPV-2, and *Giardia* spp. Among the dual co-infections observed, CPV-2 was most commonly associated with *C. perfringens* alpha toxin, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp.

In this study, co-infection did not increase the duration of diarrhea or increase the risk of death. However, considering that all the infectious agents examined have been described as causing diarrhea in experimental studies, knowledge of their presence should allow us to plan treatments and prevention strategies. The effects of multiple pathogens on the disease outcomes remain unclear, because neither the death rate nor the duration of diarrhea seemed to be affected by these factors.

Methods

Study population

A total of 147 (104 diarrheic and 43 asymptomatic) dogs consecutively presented by owners to the largest private veterinary hospital of Curitiba City, Southern Brazil, were included in the study for the realization of the real-time PCR diarrhea panel, parasitological diagnosis and clinical data collection.

Fresh fecal samples were collected from all 147 Brazilian dogs, placed in plastic vials, and kept refrigerated at 4°C until processing. At sampling, the fecal specimens were scored according to a five-point fecal scoring system for dogs, as previously described [28]: 1, liquid or watery feces with no form; 2, very soft, unformed feces; 3, very soft, moderately formed feces; 4, firm, well-shaped and cylindrical feces. Diarrheic dog feces included those with scores from 1 to 3, whereas the control dogs had no history of gastrointestinal disorders (vomiting, diarrhea, or anorexia) and fecal samples with a score of 4.

Additionally, results from 12,370 commercial samples using the same real-time PCR diarrhea panel performed in the Brazilian samples were obtained from samples originated from United States (7829), Australia (526), Canada (2855), United Kingdom (674) and Japan (486). The real-time PCR results for samples collected in different countries (Table 4) were obtained either by shipping the samples to the United States for commercial real-time PCR analysis (samples from Brazil, United States, Australia, United Kingdom, and Japan) or by allowing the diagnostic samples to be analyzed with the same real-time PCR procedure by the same service provider in the country of origin (Canada). Nucleic acid quantities, stability, and quality were assessed using internal sample controls when the samples were shipped to the United States for real-time PCR analysis.

The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and Animal Welfare of the Federal University of Parana Curitiba Campus, Paraná State, Southern Brazil (protocol number 036/2011).

Clinical outcomes

The diarrheic dogs were evaluated for the duration of diarrhea and death in relation to the presence of single or co-infections. Was also evaluated whether the clinical suspicion of association with infectious agents was related to the duration of diarrhea (≤ 10 days, 10 days to 2 months, and > 2 months) and whether the correct antibiotics were used (for empirical treatment after sample collection but before the results were obtained) based on the pathogen ultimately detected.

Real-time PCR

Total nucleic acids were extracted with standard protocols using a commercial platform (Corbett XTractor-Gene, Qiagen, Valencia, CA, USA). A housekeeping gene (18S rRNA) was used to determine the amounts of genomic DNA and cDNA after reverse transcription and to confirm DNA integrity.

The PCR tests were based on the IDEXX proprietary RealPCR™ service platform (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Briefly, conserved nucleotide regions were selected and two primers and a hydrolysis probe were designed to hybridize to them, using commercial software (PrimerExpress Version 3.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). An additional two primers flanking the fragment amplified in the real-time PCR assay were designed for sequence verification purposes. Fecal samples were tested by hydrolysis probe-based real-time PCR assay for a panel of potential enteropathogens, including CDV (phosphoprotein G, GenBank accession number AY649446.1), CCoV (M gene, Type I, AF502583; typ eII D13096), CPV-2 (VP2, U22139), CPA (alpha toxin, LA3545), *Cryptosporidium* spp. (ssrRNA, A093489), *Giardia* spp. (ssrRNA, DQ836339), and *Salmonella* spp. (invasion A gene, EU348366) at a reference laboratory within 5 days after collection. CPA was quantified using a pre-established cutoff of $> 300,000$ copies/g of feces [8]. For CPV-2 a cutoff value was used to discriminate vaccine strains from wild-type infections (1.2 million CPV-2 gene equivalents per gram of stool). Real-time PCR was performed with standard primer and probe concentrations using a commercially available mastermix (LC480 ProbesMaster, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) on a commercially available real-time PCR platform (Roche LightCycler 480).

Analytical and clinical validation

Real-time PCRs were validated analytically and clinically. For the analytical validation, each assay was required to meet six validation criteria: amplification efficiency, linearity, intra-run reproducibility, inter-run reproducibility, r^2 value, and signal-to-noise ratio of the fluorescent signal using a specific synthetic positive control. Each assay had an analytical sensitivity of 10 molecules and an amplification efficiency between 95% and 100%. Clinical samples

were selected based on a reference method for each test and a correlation study was performed. The analytical specificity of all real-time PCR tests was confirmed by resequencing the clinical sample material using additional primer pairs positioned outside the synthetic positive control. Diagnostic sensitivity and specificity based on comparisons with reference testing methods were in the high 90% for each real-time PCR test. Gold standard tests included the immunofluorescence antibody assay for CDV, enzyme-linked immunosorbent assay for CPV-2 and *Giardia*, and real-time PCR performed at the University of California Davis for CCoV, *Cryptosporidium*, and *Salmonella*.

To validate each PCR panel test result, seven quality controls were used for each sample tested: 1) PCR positive controls (quantitative); 2) PCR negative controls; 3) negative extraction controls (five per 96-well plate); 4) DNA internal sample control targeting the host 18S rRNA to quantify the DNA in the submitted diagnostic sample; 5) RNA internal sample control targeting the host 18S rRNA to quantify the cDNA in the submitted diagnostic sample after reverse transcription; 6) control to monitor environmental contamination; and 7) spike in the internal positive control to monitor PCR inhibition. These controls were used to assess the functionality of the PCR test protocol (1), the absence of contamination in the reagents (2) and laboratory (5), the absence of cross-contamination during the extraction process (3), the quality and integrity of the DNA and RNA as a measure of sample quality (4 and 5), the RT protocol (5), the absence of random positive PCR signals within the PCR laboratory (6), and the absence of PCR inhibitory substances carried over from the sample matrix (7).

Parasitological diagnosis

A fecal flotation procedure was performed with zinc sulfate [29] and saturated sodium chloride [30] flotation solutions, as described previously. The parasitological test was performed with light microscopy by identifying the parasite eggs, larvae, cysts, and oocysts, according to their morphological characteristics [30,31].

Statistical analysis

The results were subjected to statistical analysis with the χ^2 test or Fisher's exact probability. Differences were considered significant when $P < 0.05$. The statistical analysis was performed at a website for statistical computation (VassarStats, Vassar College, Poughkeepsie, NY, USA).

Abbreviations

CDV: Canine distemper virus; CCoV: Canine coronavirus; CPV-2: Canine parvovirus type 2; CPA: *Clostridium perfringens* alpha toxin.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ABRG, STO, AWB, CL conceived the study, participated in its design and coordination. ABRG, DAK, CL, ME participated in data acquisition and performed the laboratory assays. RS conducted the statistical analyses. All authors participated in drafting the manuscript, read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Marcelus Sanson, Dr. David Powlony, Dr. Daphine M. Albino, Dr. Mariana C. Oliveira and Dr. Marcel Preindl for the technical assistance.

Author details

¹Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, 1540 R dos Funcionários, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. ²IDEXX Laboratories Inc., 2825 Kovr Drive, West Sacramento, CA 95605, USA. ³Clinilab Laboratory of Animal Pathology, 894 R Holanda, Curitiba, PR 82540-040, Brazil. ⁴Department of Animal Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 9090 Avenue Bento Gonçalves, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. ⁵Department of Clinics, Surgery and Animal Reproduction, College of Veterinary Medicine, São Paulo State University, 793 R Clovis Pestana, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil. ⁶Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois, 2001 S Lincoln Avenue, Urbana, IL 61802, USA.

Received: 10 June 2013 Accepted: 15 January 2014

Published: 16 January 2014

References

1. Simpson KW: Gastric disease. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Volume 2. 6th edition. Edited by Ettinger SJ, Feldman EC. Philadelphia: WB Saunders Co; 2004:1310-1331.
2. Villiers E, Blackwood L: Laboratory evaluation of gastrointestinal disease. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. 2nd edition. Edited by German AJ, Hall EJ. Gloucester: BSAVA; 2005:207-222.
3. Greene CE, Marks SL: Gastrointestinal and intra-abdominal infections. In *Infectious Diseases of the dog and cat*. 4th edition. Edited by Greene CE. St. Louis: Saunders Elsevier; 2012:950-981.
4. Liu YT: A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets* 2008, 8:183-188.
5. Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10:190-212.
6. Kuroski PB, Traub-Dargatz JL, Morley PS, Gentry-Weeks CR: Detection of *Salmonella* spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res* 2002, 63:1265-1268.
7. Stenske KA, Bemis DA, Gillespie BE, Oliver SP, Draughon FA, Matteson KJ, Barges JW: Prevalence of urovirulence genes *cnf*, *hlyD*, *stx/foc*, and *papGIII* in fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. *Am J Vet Res* 2009, 70:1401-1406.
8. Leutenegger CM, Marks SL, Robertson J: Toxin quantification of *Clostridium perfringens* is a predictor for diarrhea in dogs and cats. In *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)*: May 30 June 2012. Edited by McFarlane D, Sellon R. New York: Curran Associates, Inc; 2012:38.
9. O'Ryan M, Prado V, Pickering LK: A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005, 16:125-136.
10. Grimprel E, Rodrigo C, Desselberger U: Rotavirus disease: impact of coinfections. *Pediatr Infect Dis J* 2008, 27:53-510.
11. Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL: The nature and consequences of coinfection in humans. *J Infect* 2011, 3:200-206.
12. Bhavnani D, Goldstick JE, Cevallos W, Trueba G, Eisenberg JN: Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. *Am J Epidemiol* 2012, 5:387-395.
13. Lello J, Norman RA, Boag B, Hudson PJ, Fenton A: Pathogen interactions population cycles, and phase shifts. *Am Nat* 2008, 2:176-182.
14. Pedersen AB, Fenton A: Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol* 2007, 3:133-139.
15. Tupler T, Levy JK, Sabshin AJ, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM: Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 2012, 241:338-343.

16. Richter KP: Clinical evaluation of dogs and cats with specific clinical signs. In *Small Animal Gastroenterology*. Edited by Stalner JM. Hannover: Schluetersche; 2008:115-120.
17. Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Mellis AC: Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2002, 16:533-540.
18. Castro TX, Uchoa CMA, Albuquerque MC, Labarthe NV, Garcia RCNC: Canine parvovirus (CPV) and intestinal parasites: laboratorial diagnosis and clinical signs from puppies with gastroenteritis. *Intern J Appl Res Vet Med* 2007, 5:72-76.
19. Schulz BS, Strauch C, Mueller RS, Eichhorn W, Hartmann K: Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy. *J Small Anim Pract* 2008, 49:84-88.
20. Goddard SA, Clegg SR, Stavisky JH, Radford AD, Pinchbeck G: Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals. *Vet Rec* 2010, 167:196-201.
21. Castro TX, Costa EM, Leite JP, Labarthe NV, Cubel Garcia RC: Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res Vet Sci* 2011, 90:336-340.
22. Decaro N, Buonavoglia C: Canine parvovirus - a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 2012, 155:1-12.
23. Decaro N, Buonavoglia C: An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol* 2008, 132:221-234.
24. Decaro N, Desario C, Billi M, Mari V, Elia G, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C: Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet J* 2011, 187:195-199.
25. Decaro N, Martella V, Desario C, Belladico AL, Camero AL, Camero M, Manna L, d'Alajo D, Buonavoglia C: First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006, 53:468-472.
26. Decaro N, Campolo M, Elia G, Buonavoglia D, Colaianni ML, Lorusso A, Mari V, Buonavoglia C: Infectious canine hepatitis: an "old" disease reemerging in Italy. *Res Vet Sci* 2007, 83:269-273.
27. Decaro N, Camero M, Greco G, Zizzo N, Tinelli A, Campolo M, Pratelli A, Buonavoglia C: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol* 2004, 27:177-181.
28. Westermarck E: Clinical evaluation of patients with chronic diarrhea. In *Small Animal Gastroenterology*. 1st edition. Edited by Stalner JM. Hannover: Schluetersche; 2008:127-133.
29. Dryden MW, Payne PA, Ridley R, Smith RVT: Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet Ther* 2005, 6:14-28.
30. Sloss MW, Zajac AM, Kemp LR: Exame de Fezes Para Diagnostico de Parasitas. In *Parasitologia Clínica Veterinária*. 6th edition. Edited by Zajac AM. São Paulo: Manole Ltda; 1999:03-44.
31. Hendrix CM, Robinson E: Common laboratory procedures for diagnosing parasitism. In *Diagnostic Parasitology For Veterinary Technicians*. 3rd edition. Edited by Hendrix CM, Robinson E. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006:227-245.

doi:10.1186/1746-6148-10-23

Cite this article as: Gizzi et al.: Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Veterinary Research* 2014 10:23.