

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da Prevalência Viral em Carnívoros no Sítio Moura-
Barrancos: Implicações de Conservação**

Cristina Gouveia Maldonado

MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Avaliação da Prevalência Viral em Carnívoros no Sítio Moura-Barrancos: Implicações de Conservação

Cristina Gouveia Maldonado

MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO

Dissertação orientada pela Professora Doutora Margarida Santos-Reis
(DBA/CBA- FCUL)

E co-orientada pela Professora Doutora Ana Duarte
(CIISA-FMV-UTL)

2009

Prefácio

Este trabalho decorreu integrado num projecto de Doutoramento (J.P. Ferreira, SFRH/BD/16114/2004) que tem como objectivo estudar os factores antropogénicos que condicionam a conservação do gato-bravo, em particular no sítio Moura-Barrancos (Alentejo).

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Margarida Santos-Reis por ter aceite a orientação deste trabalho, por todas as ideias, críticas e sugestões, no planeamento deste estudo e no relatório escrito, pela disponibilidade, paciência e amizade.

À minha co-orientadora, Professora Ana Duarte, por ter aceite a orientação deste trabalho, por todas as ideias, críticas e sugestões, no planeamento deste estudo e no relatório escrito, pela disponibilidade, ensinamentos, tolerância, pela amizade e bons momentos.

Ao Joaquim P. Ferreira, pela ideia para o tema da tese, pelo apoio logístico no trabalho de campo, por todas as ideias, críticas e sugestões para a tese, pela paciência e disponibilidade, pelos ensinamentos, e bons momentos.

À Inês Leitão, pela participação na recolha das amostras, pelas críticas e sugestões a este relatório, pela amizade, pelos momentos divertidos e pela companhia durante todo estágio.

À minha mãe, pelas críticas e sugestões no relatório escrito, e pela paciência.

À Elisabete Silva, pelas críticas e sugestões no relatório escrito, pelos salvamentos nas análises laboratoriais, conselhos, amizade, e bons momentos

À minha grande amiga Ana Fletcher e ao meu mano, Manuel Maldonado, por ter transformado o meu Inglês a martelo do artigo em Inglês perfeito, e pela amizade

À Clara Grilo pelos mapas, amizade e paciência

A todos os que me fizeram companhia e me proporcionaram bons momentos durante este estágio:

Aos investigadores do CIISA: Alexandre Filipa, António, Clara, Carla, Duzan, Joana, Ju, Leonor, Mónica, Manuela, Patrícia, Ricardo, Sara, Sofia, Tiago, pela simpatia, amizade, conselhos, e momentos divertidos.

Aos Barranquinhos, pela simpatia, hospitalidade, pelas noites de diversão, e pelo valor demonstrado pela natureza

Aos meus grandes amigos pelo apoio, compreensão, e pela amizade: Alexandre,, Carolina, Cláudia, Filipe, Inês, Cardoso, Kleine, Guida, Chico, Teresa, Vânia

À minha família pelo apoio, compreensão, e enorme paciência para com o meu feitiozinho, e amizade

Resumo

Os agentes infecciosos são um elemento importante na dinâmica populacional e na evolução das populações hospedeiras. No entanto, a actividade humana é um dos principais factores responsáveis pelo desequilíbrio na relação agente patogénico-hospedeiro, contribuindo para o aumento do risco extinção de espécies ameaçadas. Este desequilíbrio, entre outras causas, está associado ao aumento da probabilidade de transmissão de agentes infecciosos entre espécies domésticas e selvagens. Os hospedeiros que actuam como reservatórios desempenham também um importante papel na manutenção dos agentes patogénicos generalistas nas comunidades, assim como na sua transmissão a pequenas populações, podendo causar declínios populacionais significativos.

Este trabalho teve como objectivo determinar a prevalência do vírus da esgana, do parvovírus, e do adenovírus canino, em espécies consideradas abundantes (raposa, fuinha, texugo, geneta e sacarrabos) no sítio Moura-Barrancos. Com esta análise pretendeu-se avaliar o papel destas espécies como reservatórios ou vectores de transmissão de agentes patogénicos para as duas espécies de felinos ameaçados (gato-bravo e lince), e prever a influência desses agentes patogénicos no sucesso do restabelecimento das populações dos mesmos.

Neste estudo foi então avaliada a presença de ácidos nucleicos virais em 143 dejectos das cinco espécies de carnívoros, através da técnica PCR ou RT-PCR. Os resultados evidenciaram uma reduzida prevalência de excreção de parvovírus canino na raposa (3,2%), e de parvovírus felino em geneta (4,3%), e uma prevalência de excreção nula de parvovírus nas restantes espécies; mais ainda não foi detectado o vírus da esgana nas cinco espécies estudadas, e o adenovírus canino na raposa. Estes resultados sugerem que no período de amostragem, as espécies analisadas não estavam a actuar como reservatórios nem vectores destes agentes infecciosos, não parecendo constituir um risco para a recuperação e/ou restabelecimento das populações de felinos.

Palavras Chave: doenças da fauna selvagem; mesocarnívoros; *Vírus da esgana*; *Parvovirus*; *Adenovirus*; paisagens Mediterrânicas.

Abstract

Infectious agents are an important element in host population dynamics, and evolution. Nevertheless, human activity is one of the main factors responsible for host-pathogen relationship unbalance, which has contributed for an increase of the extinction risk of endangered species. This unbalance is associated with a probable increase of pathogen transmission among domestic and wild species. Reservoir animals have an important role in pathogen maintenance in communities, as well as in its transmission to small animal populations, which may cause significant population decreases.

This work aimed to determine canine distemper virus, parvovirus, and canine adenovirus prevalence in species (red fox, European mongoose, common genet, stone marten, and badger) known as abundant in Moura-Barrancos site. With this analysis we intended to evaluate the role of these species as reservoirs or vectors for pathogen transmission to endangered species, and to foresee their influence in the success of recovery and/or reestablishment of the two threatened feline populations in the area (wildcat and Iberian lynx).

The presence of viral nucleic acids in 143 scats from five carnivore's species was evaluated by PCR or RT-PCR. Our results showed a low prevalence of canine parvovirus in red fox (3,2%), and of feline parvovirus in common genet (4,3%), and a null prevalence of parvovirus in the remainder species, of canine distemper virus in the five studied species, and of canine adenovirus in red fox. These results suggest that during the sampling period the analysed species were not acting as reservoirs or vectors of these infectious agents. In this way, the pathogens prevalence may not pose a risk to the recovery and reestablishment of the two threatened felid populations.

Key Words: wildlife diseases; mesocarnivores; *Canine Distemper Virus*; *Parvovirus*; *Adenovirus*; Mediterranean landscapes

Índice

Introdução.....	1
<i>Agentes infecciosos em populações silvestres</i>	1
<i>Características dos agentes virais</i>	4
<i>Agentes Virais em Carnívoros</i>	7
Objectivos.....	10
Materiais e métodos.....	11
<i>Área de estudo</i>	11
<i>Colheita de amostras</i>	12
<i>Detecção de ácidos nucleicos virais</i>	13
<i>Sequenciação de amostras</i>	15
<i>Análise filogenética</i>	15
Resultados.....	17
<i>Detecção viral</i>	17
<i>Análise filogenética</i>	19
Discussão.....	24
Considerações finais.....	32
Referências.....	35

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados nos ensaios de PCR e RT-PCR, posições nucleotídicas, regiões do genoma amplificadas, e tamanho dos fragmentos	14
Tabela 2: Identificação das sequências usadas na análise filogenética e respectivos números de acesso.	15
Tabela 3: Prevalência de DNA viral de CPV/FPV e CAV, e RNA viral de CDV nas amostras das cinco espécies estudadas	18
Tabela 4: Variações aminoacídicas entre sequências de <i>Parvovirus canino</i> tipo 2, <i>Parvovirus felinos</i> , <i>Vírus da enterite dos visões</i> , <i>Parvovírus da raposa do Ártico</i> , e as sequências obtidas neste estudo.....	22

Índice de figuras

Figura 1: Fotografia de microscopia electrónica de vírus da esgana.....	4
Figura 2: Fotografia de microscopia electrónica de Parvovirus Caninos.....	5
Figura 3: Foto de microscopia electrónica de adenovirus caninos.....	7
Figura 4: Localização da área de estudo.....	11
Figura 5: Fotografias do sítio Moura-Barrancos.....	12
Figura 6: Mapa do Sítio Moura-Barrancos (Rede Natura 2000) e localização das amostras recolhidas.....	13
Figura 7: Organização genómica dos parvovirus canino, felino, da enterite dos visões, e da raposa do ártico.....	16
Figura 8: Avaliação da sensibilidade dos ensaios de PCR e RT-PCR para detecção de CAV-2, CPV-2 e CDV.....	17
Figura 9: Detecção de <i>Parvovirus</i> em amostras de geneta e raposa.....	18
Figura 10: Localização das amostras positivas de CPV e FPV em raposa e geneta.....	18
Figura 11: Árvores calculadas por maximum likelihood (modelo de substituição HKY85) para: (A) a sequência completa do gene VP2, com uma taxa de transição/transversão de 4.74 e de transição pirimidina/transição purina de, 0.67 (B) a região amplificada, sem as sequências obtidas neste estudo, com uma taxa de transição/transversão de 3.51, e de transição pirimidina/transição purina de 0.86, e (C) a região amplificada, com as sequências obtidas neste estudo, com uma taxa de transição/transversão de 3.87, e de transição pirimidina/transição purina de 0.86, todas as taxas estimadas a partir dos dados. As escalas representam 0,01 da distância genética.....	19
Figura 12: Árvores calculadas por maximum likelihood (modelo de substituição BLOSUM 62), para a (A) proteína VP2 completa, com (B) sequência de aminoácidos correspondente à região amplificada, sem as sequências obtidas neste estudo, e (C) sequência de aminoácidos correspondente à região amplificada, com as sequências obtidas neste estudo. As escalas representam 0,01 de distância aminoacídica.....	19

Introdução

Agentes infecciosos em populações silvestres

Os agentes infecciosos desempenham um papel relevante nos sistemas naturais, influenciando a dinâmica das populações e a composição específica das comunidades, e condicionando a diversidade genética dos hospedeiros e o processo coevolutivo entre parasitas/agentes patogénicos e hospedeiros. Assim, os agentes infecciosos actuam como importantes elementos selectivos nas populações naturais, regulando processos como a manutenção da diversidade alélica ou a recombinação sexual dos seus hospedeiros. Os hospedeiros possuem uma diversidade alélica que lhes confere resistências e defesas induzidas, sendo o risco de infecção individual e a dinâmica de toda a população influenciadas pela variedade dos mecanismos de defesa (Daszak *et al.*, 2000; Altizer *et al.*, 2003). No entanto, as alterações ambientais causadas pela actividade humana, tais como a introdução de agentes patogénicos em novas áreas geográficas, acções que levem ao aumento da susceptibilidade dos hospedeiros, ou alterações no fluxo de transmissão de agentes patogénicos nas comunidades, têm aumentado a importância dos agentes patogénicos como factores de regulação da sobrevivência das espécies. A actividade humana é considerada a principal causa do aparecimento de doenças infecciosas a taxas elevadas nas populações silvestres, contribuindo para a extinção local de populações e para o declínio de espécies hospedeiras (Roelke-Parker *et al.*, 1996; Härkönen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). As alterações ambientais, que ocorrem a uma escala global, têm um efeito directo e indirecto na sanidade da fauna selvagem, tornando as populações sob *stress* mais susceptíveis a surtos epidémicos (Deem *et al.*, 2001; Lafferty *et al.*, 2002).

A degradação e fragmentação dos habitats naturais aumentam a proximidade dos animais silvestres às populações humanas e animais domésticos, favorecendo a transmissão de doenças. É hoje reconhecido que os animais domésticos actuam como reservatórios de agentes infecciosos. Estes hospedeiros, que actuam como reservatórios, desempenham um papel importante na manutenção deste tipo de agentes patogénicos nas comunidades silvestres porque, em populações de efectivo reduzido a prevalência do agente desce frequentemente abaixo do limiar mínimo de persistência da infecção e este extingue-se por motivos estocásticos. Assim, a transmissão de agentes patogénicos

entre populações reservatório e pequenas populações, permite que estes surjam periodicamente em pequenas populações, que de outro modo não seriam capazes de manter o agente (Laurenson *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 2000; Haydon *et al.*, 2002a).

A ocorrência de uma epidemia de esgana, em 1994, na população de leões do Serengeti, que afectou também outras espécies selvagens tais como a hiena *Crocuta crocuta*, a raposa de orelha de morcego *Otocyon megalotis* e o leopardo *Panthera pardus*, é ilustrativa de uma situação resultante da proximidade entre ecossistemas naturais e áreas humanizadas. Cerca de 85% dos leões de Masai Mara foram afectados, registando-se uma taxa de mortalidade de 30% (Roelke-Parker *et al.*, 1996). Esta epizootia foi precedida por um aumento da seroprevalência de anti-corpos de esgana nos cães domésticos das aldeias locais adjacentes ao parque Nacional (Cleaveland *et al.*, 2000).

A fragmentação do habitat e o isolamento das populações podem também afectar a prevalência dos agentes patogénicos e a resposta adaptativa dos hospedeiros, pois a mobilidade de dos hospedeiros e a transmissibilidade dos parasitas/agentes patogénicos exerce uma acção benéfica interferindo tanto na persistência dos agentes infecciosos, como na dispersão e manutenção dos alelos que conferem mecanismos de defesa aos hospedeiros, superando os riscos associados ao aumento da transmissão dos agentes patogénicos (Altizer *et al.*, 2003). Verifica-se que a ocorrência de surtos epidémicos em populações isoladas é menos frequente, mas quando estes surgem, a prevalência da infecção é superior. Nestas populações a taxa de transmissão de agentes infecciosos entre diferentes populações tende a ser reduzida, pelo que a maioria dos indivíduos não teve contacto com o agente e não adquiriu imunidade. Assim, quando ocorrem epidemias, grande parte da população tende a ser infectada e a mortalidade é elevada (McCallum and Dobson, 1995). Em populações interligadas, a probabilidade do agente patogénico estar presente em cada população é mais elevada, mas a prevalência em cada uma é menor. (Altizer *et al.*, 2003).

A manipulação da fauna selvagem é outra actividade humana que também contribui para o aparecimento de doenças infecciosas. O transporte de animais silvestres para fins de conservação, agricultura ou caça, e a introdução de animais exóticos em novas áreas geográficas, que têm acompanhado a globalização do transporte e do comércio, contribuem para o aumento do risco de exposição das espécies silvestres a agentes infecciosos exóticos (Deem *et al.*, 2001; Lafferty *et al.*, 2002). Esta manipulação de animais, em determinadas circunstâncias, pode contribuir para o sucesso dos

hospedeiros invasores devido ao efeito das doenças introduzidas nas espécies autóctones (Grenfell and Dobson, 1995). A recuperação de populações silvestres com introdução de indivíduos provenientes de programas de reprodução em cativeiro permite igualmente a transferência de agentes patogénicos a que as primeiras não tinham sido previamente expostas. (Daszak *et al.*, 2000; Deem *et al.*, 2001).

A selecção imposta pelo Homem, mediante a vasta aplicação de produtos químicos ao nível da agricultura e pecuária, é mais uma importante ameaça à vida selvagem, pois a maioria dos agentes patogénicos têm tempos de geração curtos e grandes efectivos populacionais, e estão sujeitos a fortes pressões selectivas, pelo que estas alterações ambientais aceleram a sua evolução, aumentando a ocorrência e incidência de agentes patogénicos resistentes (Altizer *et al.*, 2003).

A consanguinidade e a diminuição da variabilidade genética, outras das consequências do declínio, fragmentação e isolamento das populações, têm igualmente um papel de relevo ao condicionar a capacidade das espécies responderem evolutivamente às ameaças impostas pelos agentes patogénicos (Hedrick *et al.*, 2000; Roelke *et al.*, 2008).

O conhecimento dos agentes patogénicos em circulação nos ambientes naturais e do estado sanitário das populações de animais silvestres é pois importante, particularmente para a conservação das espécies ameaçadas, uma vez que permite uma melhor compreensão das epizootias e fornece informação útil para o planeamento de uma estratégia de conservação mais eficiente (Mörmer *et al.*, 2002).

De entre as espécies silvestres que mais sofrem o impacto do homem e suas actividades, destacam-se os mamíferos carnívoros que, pelos seus elevados requisitos espaciais e estratégias de vida, são muito sensíveis a perda e fragmentação dos habitats (Carroll *et al.* 2001; Miller *et al.* 2001).

Entre os agentes infecciosos que podem afectar populações de carnívoros destacam-se alguns agentes virais (Pedersen *et al.*, 2007), como o vírus da esgana, o parvovírus e o adenovírus canino, uma vez que lhes é reconhecida uma elevada capacidade de contágio, infecciosidade e virulência para uma grande variedade de hospedeiros (Green, 1990; 1995; Barrett *et al.*, 1999; Steinell *et al.*, 2001).

Características dos agentes virais

O **vírus da esgana** pertence ao género *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*. É um vírus pleomórfico de simetria helicoidal com genoma de RNA de cadeia simples negativa, não segmentado e com invólucro (Green, 1990; Martella *et al.*, 2002). Este agente, altamente contagioso e frequentemente letal, infecta espécies das famílias *Ailuridae*, *Ailuropodidae*, *Canidae*, *Hyaenidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Viverridae*, *Felidae*, *Ursidae* e *Phocidae*, pertencentes à ordem Carnivora (Delahay and Frölich 2000), e ainda espécies da família *Tayassuidae* (ordem Artiodactyla) e da família *Cercopithecidae* (ordem Primata) (van Moll *et al.*, 1995). A transmissão deste vírus, que é sensível ao calor e à desidratação (Green, 1990), processa-se através de aerossóis ou por contacto directo com exsudados orais, respiratórios ou oculares. A excreção ocorre aproximadamente sete dias após a infecção, por via digestiva e respiratória (Green, 1990). (Figura 1)



Figura 1:Fotografia de microscopia electrónica de vírus da esgana

(www.thefamilypethospital.net/caninevac.htm)

O vírus da esgana foi responsável por importantes declínios populacionais de espécies ameaçadas, nomeadamente no furão de patas negras *Mustela nigripes*, causando uma mortalidade de cerca de 70% (Thorne *et al.*, 1988 in McCallum and Dobson, 1995), e em leões *Panthera leo* do Serengeti, resultando na morte de cerca de 30% os indivíduos (Rolelke-Paker *et al.* 1996), neste último caso transmitido pelos cães domésticos, das povoações adjacentes ao parque nacional (Cleaveland *et al.*, 2000). É também provável que tenha sido responsável pelo declínio do cão selvagem africano *Lycaon picus*, no parque nacional de Masai Mara (Quénia) (Alexander and Appel, 1994).

O género *Parvovirus*, membro da família *Parvoviridae*, incluiu vários vírus genética e antigenicamente muito próximos, nomeadamente o vírus da panleucopénia felina (FPLV), o parvovírus canino (CPV-2), o vírus da enterite dos visões (MEV), o parvovírus da raposa do ártico *Alopex lagopus*, o parvovírus do guaxinim *Procyon*

lotor, o “Aleutian mink disease vírus” (AMDV) e o “canine minute virus”, ou parvovírus canino tipo 1 (Steinel *et al.*, 2001). Os viriões são constituídos por uma nucleocápside de simetria icosaédrica que envolve o DNA viral com uma única cadeia. (Figura 2)

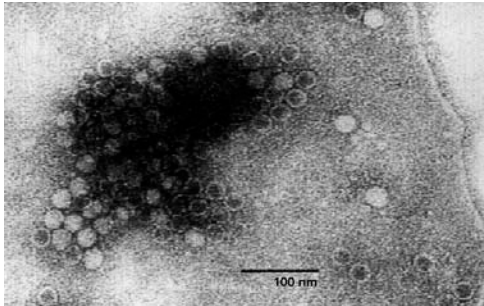


Figura 2: Fotografia de microscopia electrónica de Parvovirus Caninos

(<http://www.b19virus.com/canine-parvovirus-pictures.html>)

A infecção de cães e gatos pelo CPV-2 e pelo FPLV pode causar doença fatal, embora também sejam comuns infecções sub-clínicas, com sintomas ligeiros ou ausentes (Steinel *et al.*, 2001). A transmissão é directa, por via oro-fecal, a partir dos 8-12 dias após a infecção (Steinel *et al.*, 2001; Desario *et al.*, 2005). Os viriões são muito estáveis no ambiente e resistentes ao calor e à desidratação (Green, 1990).

Os primeiros registos de surtos de panleucopénia felina ocorreram nas décadas de 30 e 40 e todos os membros da família *Felidae* são susceptíveis à infecção (Steinel *et al.*, 2001).

Em 1978, o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) foi pela primeira vez detectado em cães, apresentando uma homologia genómica com o FPV superior a 98%. Pensa-se que este vírus surgiu a partir do FPV ou de uma estirpe vacinal viva de FPV. Esta última hipótese é suportada pelo facto de o CPV-2 replicar em células felinas *in vitro* e por apresentar mais locais de restrição comuns com a estirpe vacinal de FPV do que com outros isolados deste vírus. Outra hipótese aponta para que este vírus tenha surgido a partir do BFPV, uma vez que possui uma sequência nucleotídica típica de FPV, com três alterações nucleotídicas idênticas às do CPV. A mudança do hospedeiro primário parece estar relacionada com a alteração no perfil amino-acídico da proteína da cápside viral, que confere a capacidade de infecção de canídeos. São conhecidas infecções pelo CPV-2 em cães domésticos *Canis familiaris*, raposas *Vulpes vulpes*, lobos *Canis lupus*, coiotes *Canis latrans* e dingos *Canis lupus dingo*, sendo muito provável que toda a família *Canidae* seja susceptível. Furões *Mustela furo*, visões Americanos *Mustela*

vison, e gatos domésticos podem ser infectados experimentalmente embora a infecção seja auto-limitante (Steinel *et al.*, 2001).

A estirpe original CPV-2 tem sido progressivamente substituída por novos subtipos, CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c (Green, 1990; Ikeda *et al.*, 2002; Decaro *et al.*, 2007). Estes subtipos podem infectar felinos, tanto em condições experimentais como naturais, sendo as suas seroprevalências elevadas nos grandes felinos (Horiuchi, *et al.*, 1998; Steinel *et al.*, 2001). Esta característica representa uma vantagem selectiva em relação à estirpe original, mas não se observam diferenças selectivas entre os novos subtipos. Estes subtipos têm vindo a disseminar-se com sucesso nas populações de cães por todo o mundo, tendo sido igualmente detectados em gatos. (Decaro *et al.*, 2007).

A inoculação experimental dos MEV e FPV em guaxinis *Procyon lotor* demonstrou que esta espécie é muito susceptível a estes vírus, desenvolvendo doença que pode ser mortal, com sintomas clínicos e lesões típicas de infecção por parvovírus (Barker *et al.*, 1983). Verificou-se ainda que estes vírus são excretados nas fezes em elevados títulos e a resposta serológica é forte. Por outro lado, a inoculação de CPV-2 nesta espécie não provoca doença, a excreção é ocasional e a produção de anticorpos é moderada (Barker *et al.*, 1983).

Tanto o vírus FPV como o MEV infectam e replicam em visões e gatos, mas a infecção entre hospedeiros não homólogos é menos grave do que entre hospedeiros homólogos (Steinel *et al.*, 2001). Em visões, a inoculação com CPV-2 não provoca sintomas nem lesões significativas e a infecção com MEV, FPV e CPV-2 induz resposta serológica (Barker *et al.*, 1983). De igual forma, as raposas vermelhas não mostram sinais de infecção quando inoculadas com MEV, FPV ou CPV-2; nesta espécie, estes vírus são excretados apenas esporadicamente e a produção de elevados títulos de anticorpos é detectada apenas após a inoculação com o FPV (Barker *et al.*, 1983).

Para além das infecções nas famílias *Canidae*, *Felidae*, *Mustelidae* e *Procyonidae*, pouco se conhece acerca da diversidade de hospedeiros e da distribuição dos vírus relacionados com o FPV em carnívoros silvestres (Steinel *et al.*, 2001).

Os vírus pertencentes à família *Adenoviridae* são vírus com simetria icosaédrica, sem invólucro e com um genoma de DNA de cadeia dupla. O **adenovírus canino** tipo-1 (CAV-1) pertencente ao género *Mastadenovirus* é o agente infeccioso da hepatite canina. Cães domésticos, coiotes, raposas, lobos, gambás *Mephitis mephitis*, ursos

pretos americanos *Ursus americanus*, guaxinins (Dalerum *et al.*, 2005), e ursos pardos *Ursus arctos*, assim como outros membros das famílias *Canidae* e *Ursidae* (Green, 1990), são susceptíveis à infecção causada por este vírus. O CAV-1 é excretado em todas as secreções corporais e a sua transmissão ocorre por contacto directo ou indirecto (Green, 1990). (Figura 3)

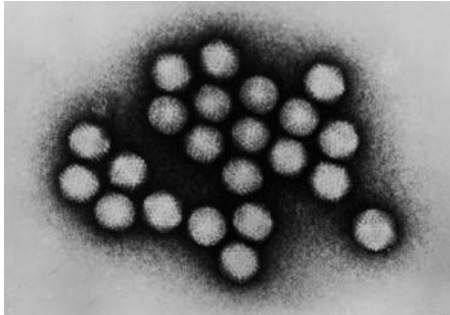


Figura 3: Foto de microscopia electrónica de adenovírus caninos

(www2.vet-lyon.fr/etu/virus-canides/adenovirus.htm)

Agentes Virais em Carnívoros

A influência das doenças infecciosas na conservação da fauna silvestre começou a ser reconhecida na década de 30, e os primeiros estudos relacionados com este tema focam-se no problema da transmissão de doenças de espécies silvestres para espécies com valor económico (domésticas ou cinegéticas) e nas doenças zoonóticas (e.g. Deem *et al.*, 2001).

A partir da década de 70 começaram a ser realizados rastreios a uma grande variedade de espécies silvestres (Millán *et al.*, 2008; Roelke *et al.*, 2008), surgiram as primeiras modelações teóricas sobre a dinâmica das doenças infecciosas, (Haydon *et al.*, 2002b) e identificaram-se importantes declínios na fauna silvestre causados por doenças infecciosas (Roelke-Paker *et al.*, 1996)

No âmbito dos estudos relacionados com os agentes virais, em espécies pertencentes à ordem carnívora, têm sido realizados rastreios para avaliação da prevalência dos vírus com maior impacto em carnívoros, baseados maioritariamente na detecção de anticorpos em populações silvestres. Alguns autores para além da seroprevalência, referem igualmente a detecção de ácido nucleico viral, em amostras biológicas.

Em Portugal foi avaliada a presença de ácidos nucleicos virais coronavírus, parvovírus, e adenovírus, em amostras fecais de lontra, na bacia do Sado, (Oliveira *et al.*, 2007), e

de anticorpos contra o CPV e o CDV em lobos, raposas, gato-bravo, geneta, fuinha, marta, e em arminho (Santos *et al.*, 2009).

Estudos realizados na região mediterrânica detectaram anticorpos contra vários agentes patogénicos com impacto na conservação de espécies ameaçadas (e.g. *vírus da esgana*, *parvovírus*, *Aleutian mink disease virus*, *vírus da leucemia felina* FeLV, *Vírus da imunodeficiência felina* FIV, e *coronavírus felino* FCoV), em hospedeiros domésticos (cão e gato doméstico) e hospedeiros silvestres, sejam estes comuns (raposa, sacarrabos, geneta, texugo, marta *Martes martes*, fuinha, e toirão *Mustela putorius*), exóticos (visão americano *Mustela vison*), ou ameaçados (lince Ibérico, lobo cinzento *Canis lupus* e visão europeu *Mustela vison*, e urso pardo *Ursus arctos*) (Marsilio *et al.*, 1997; Mañas *et al.*, 2002; Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004; Millán *et al.*, 2008; Roelke *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008).

Noutras áreas geográficas Europeias, foram realizados rastreios serológicos para o CDV, CPV, CHV, FPV, FIV, FeLV, *herpesvírus felino* FHV, *cailcivírus felino* FCV, e “*feline foamy vírus*” em hospedeiros como a raposa, gato-bravo, lince euro-asiático *Lynx lynx*, cão guaxinim *Nyctereutes procyonoides*, texugo, marta, fuinha, toirão, e doninha *Mustela nivalis*, e ursos polares *Ursus maritimus*, uma espécie vulnerável, em países como a Suíça, Croácia, Luxemburgo, Alemanha, Reino Unido e Suécia, (McOrist *et al.*, 1991; van Moll *et al.*, 1995; Delahay and Frölich, 2000; Damien *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 1999; Ostrowski *et al.*, 2003; Račnik *et al.*, 2008; Ryser-Degiorgis *et al.*, 2005)

Estima-se que nas populações suíças de lince euro-asiático *Lynx lynx* é provável que as doenças tenham exercido um importante impacto traduzido por cerca de 18% da mortalidade (Schmidt-Posthaus *et al.*, 2002).

Fora do continente europeu, verifica-se que existe um grande número de rastreios realizados na América do Norte. Nesta região foram realizados rastreios serológicos para o CDV, *parvovírus*, CAV, CHV, parainfluenza, FCV, FCoV, FHV, FIV, em espécies comuns (lince do Canadá *Lynx canadensis*, lince pardo *Lynx rufus*, lobo cinzento, coiole *Canis latrans*, raposa cinzenta *Urocyon cinereoargenteus*, guaxinim, urso pardo), vulneráveis (glutões *Gulo gulo*), com populações em declínio (raposa-orelhuda *Vulpes velox*, raposa kit *Vulpes macrotis*), e criticamente ameaçadas (pygmy raccoon *Procyon pygmaeus* no Canadá, Estados Unidos, e México (Zarnke *et al.*, 1989;

Cypher *et al.*, 1998; Zarnke *et al.*, 2001; Biek *et al.*, 2002; Riley *et al.*, 2004; McFadden *et al.*, 2005; Dalerum *et al.*, 2005).

Na Califórnia, um rastreio a vários agentes patogénicos, entre os quais o CDV, CAV, CPV, CCV, CHV, e FCV, em raposas das ilhas *Urocyon littoralis*, uma espécie criticamente ameaçada, e gatos domésticos ferais, não evidenciou transmissão de agentes patogénicos entre as duas espécies, embora tenham sido detectadas elevadas prevalências de agentes patogénicos caninos em populações de raposa, de várias ilhas, que podem ter resultado de infecções transmitidas pelos cães domésticos (Clifford *et al.*, 2006).

Na América do sul foram detectados anticorpos contra CAV, *coronavírus canino* CCV, CDV, CHV, e CPV em cães domésticos em áreas naturais importantes para a conservação de espécies ameaçadas (Parques Nacionais de Kaa-Iya, Madidi), na Bolívia (Fiorello *et al.*, 2004; Fiorello *et al.*, 2006). No Brasil (Amazónia, Pará) verificou-se que o guaraxaim *Cerdocyon thous* entra frequentemente em contacto com zonas rurais, mas não foi encontrada evidência de exposição por parte das raposas aos dois vírus testados (CPV e CDV), nem foi possível concluir se estes agentes eram endémicos nas populações de cães domésticos porque a amostra era demasiado pequena (Courtenay *et al.*, 2001).

No continente Africano, um estudo sobre a dinâmica temporal dos FHV, FIV, FCV, FPV, FCoV, e CDV, em leões do Serengeti e Ngorongoro concluiu que o FHV e o FIV são endémicos em ambas as populações, com prevalências elevadas, enquanto que os restantes surgem em surtos epidémicos quando a proporção de indivíduos susceptíveis é suficientemente elevada para o permitir. Este estudo permitiu ainda concluir que o CDV afecta as taxas de natalidade e mortalidade destas populações Packer *et al.*, 1999).

Na Etiópia (Parque Nacional da Serra de Bale), verificaram-se declínios de 50 a 77% nas matilhas de lobo Etíopiano *Canis simensis*, que podem ter sido causados pela raiva, pois este vírus foi isolado de alguns animais encontrados mortos (Sillero-Zubiri *et al.*, 1996). Verificou-se também a ocorrência de um surto de CDV nas populações de cães domésticos simpátricos ao lobo, que também pode ter afectado esta espécie (Laurenson *et al.*, 1998). Uma análise de viabilidade populacional realizada para esta espécie constatou que o vírus da raiva era o principal factor responsável pela extinção das matilhas, e que, na ausência de epidemias de raiva, as epidemias de CDV tinham pouca

influência na sua probabilidade de extinção das matilhas, e que a vacinação de 20 a 40% dos indivíduos era suficiente para evitar surtos de raiva (Haydon *et al.*, 2002b).

Foram também detectados anticorpos contra o FPV, FCV, FHV, FCoV FIV, FeLV, e CDV em leões, chitas *Acinonyx jubatus*, hienas, cães selvagens africanos, e chacais *Canis mesomelas*, em países como a Tanzânia, Uganda, Namíbia e África do Sul (Alexander *et al.*, 1994; Hofmann-Lehmann *et al.*, 1996; Creel *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2003; Munson *et al.*, 2004; Driciru *et al.*, 2006).

Nos continentes Asiático e Australiano, o tema dos agentes virais e o seu impacto na ecologia e conservação de espécies de carnívoros parece ser ainda pouco explorado. Foram detectados anticorpos contra o FCV, FCoV, FPV, em gatos domésticos ferais e gatos do deserto *Felis margarita*, uma espécie vulnerável (Ostrowski *et al.*, 2003), na Arábia Saudita, no leopardo *Prionailurus bengalensis*, e Formosan gem-faced civet *Paguma larvata taiwana*, na Tailândia e Vietname (Ikeda *et al.*, 1999), e contra o CDV, CPV, CHV, CCV, CAV, em pandas *Ailuropoda melanoleuca*, na China (Mainka *et al.*, 1994).

Objectivos

Este estudo tem por objectivo principal contribuir para o conhecimento do estado sanitário das populações de mesocarnívoros Mediterrânicos, no sítio Moura-Barrancos, através da avaliação da presença de agentes virais com reconhecido impacto patogénico em carnívoros.

Os objectivos específicos incluíram a determinação da prevalência dos vírus da esgana, parvovírus canino e felino, e adenovírus canino. Nas espécies consideradas comuns na área de estudo (raposa *Vulpes vulpes*, sacarrabos *Herpestes ichneumon*, geneta *Genetta genetta*, fuinha *Martes foina*, e texugo *Meles meles*), e verificar se estas podem desempenhar um papel importante na transmissão destes agentes patogénicos a espécies ameaçadas, actuando desta forma como vectores ou reservatórios. Esta análise tem por último objectivo prever o sucesso do restabelecimento e recuperação das duas espécies de felinos ameaçadas: o lince Ibérico *Lynx pardinus* e o gato-bravo *Felis silvestris*.

Materiais e métodos

Área de estudo

Este estudo foi realizado na zona especial de conservação (ZEC - nº 23) Moura-Barrancos (Rede Natura 2000) (ICN, 2006) localizada na região do Alentejo, no Sul de Portugal, entre as 38°13'N e 37°57'N, e as longitudes de 7°24'O a 6°59'O, com uma área de cerca de 43309 ha. (ICN 2006). (Figura 4)

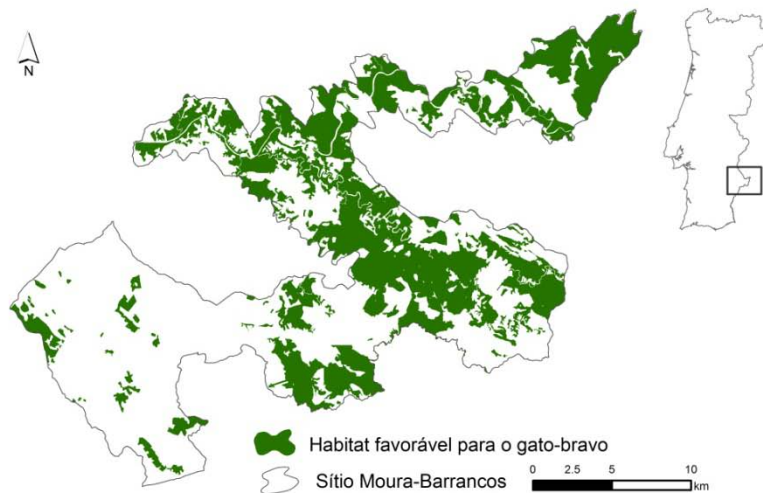


Figura 4: Localização da área de estudo

A opção da realização deste estudo nesta área geográfica relaciona-se com o facto de ser uma das áreas menos perturbadas de Portugal, que alberga habitat adequado para algumas das espécies de carnívoros com estatuto de conservação prioritário, como o lince-Ibérico e o gato bravo. A este facto, acresce ainda a continuidade desta área com a zona ocidental da Serra Morena, uma das regiões melhor conservadas da Andaluzia e Estremadura espanhola, e de vital importância na conservação do lince-ibérico (ICN 2004).

Esta região é caracterizada por uma grande diversidade de habitats, com áreas extensas de matos, matagais, e floresta bem conservados, dominados por montados de sobre (*Quercus suber*) e azinho (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*) com subcoberto (33,4%) e sem subcoberto (30,6%). A vegetação subarbustiva é composta pela esteva *Cistus landifer*, sargaços *Cistus salvifolius* e *Cistus monspeliensis*, roseira pequena *Cistus crispus*, tojo *Ulex* spp., giesta *Genista* spp., urze *Erica* spp., rosmaninho *Lavandula*

spp., aroeira *Pistacia lentiscus* e carrasco *Quercus coccifera* (Baltazar, 2001). Estas áreas estão intercaladas com zonas abertas para culturas de cereais não intensivas, e pastagens permanentes, formando um mosaico. Este local é atravessado por diversas ribeiras de regime torrencial, que correm ao longo de vales rochosos encaixados. A vegetação ribeirinha é caracterizada pelo tamujo *Securinega tintorea* e o aloandro *Nerium oleander*. Os solos são xistosos e grauvaques (ICN 2006). (Figura 5)

Esta região situa-se na zona climática pré-mediterrânica, caracterizada por Verões quentes e secos e Invernos frios e chuvosos.



Figura 5: Fotografias do sítio Moura-Barrancos

Esta zona do Alentejo tem uma reduzida densidade populacional, concentrada em quatro localidades (Barrancos, Moura, Mourão e Serpa). A densidade populacional nos concelhos de Barrancos e Moura é de 10,3 e 17,1 Habitantes/Km², respectivamente. A actividade económica é centrada na agricultura, na pecuária e na actividade cinegética (ICN 2006).

Colheita de amostras

Com o objectivo de obter uma amostra representativa das principais espécies de carnívoros, presentes no sítio Moura-Barrancos, foi realizada uma amostragem estratificada e aleatória. Tendo por base uma grelha de quadrículas UTM (2x2 km²) do sistema de projecção Gauss (elipsoid Hayford Datum Lisboa), distribuída pelas cartas militares 502, 503, 504, 513, 514, 524, 525 e 525A, de um total de 158 quadrículas foram seleccionadas 30, através de um processo de sub-amostragem aleatória em áreas conservadas, representando cerca de 30% da área de habitat favorável ao gato bravo. (Figura 6)

Entre Janeiro e Março de 2008, em cada quadrícula seleccionada foi realizado um transecto, que percorreu caminhos pouco utilizados, trilhos, afloramentos rochosos e

vales de ribeiras, sendo recolhidos apenas as fezes recentes que permitiam a identificação da espécie de carnívoro através das suas características morfológicas (dimensão, cor, odor) e localização.

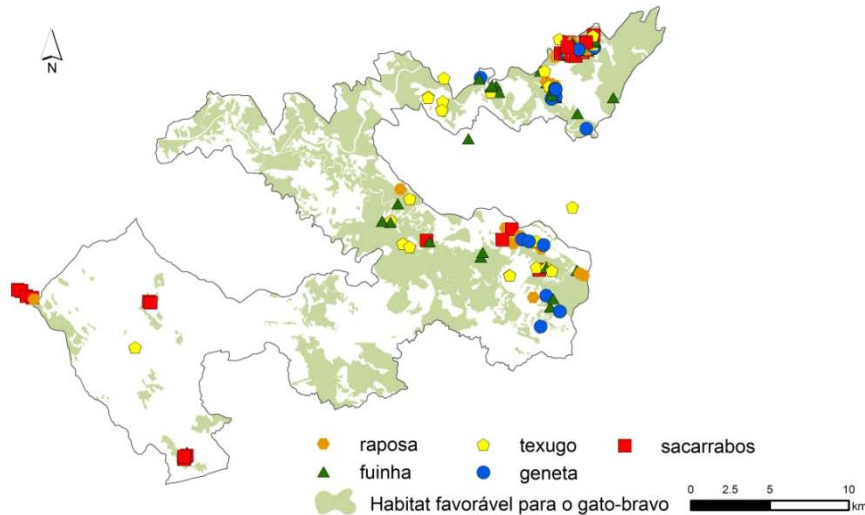


Figura 6: Mapa do Sítio Moura-Barrancos (Rede Natura 2000) e localização das amostras recolhidas

Após a colheita, as amostras fecais foram armazenadas a 4°C e posteriormente homogeneizadas em tampão salino fosfatado (PBS) (1gr/1ml) e centrifugadas durante 10 min a 10000xg a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e conservado a -20°C, até ser realizada a extracção de ácidos nucleicos virais.

Detecção de ácidos nucleicos virais

A extracção de DNA e RNA viral foi efectuada a partir de 200 µL do homogeneizado fecal, utilizando um *kit* comercial (QIAamp MinElute Virus Spin Kit - Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os controlos positivos para o DNA de parvovírus e adenovírus canino e para o RNA de vírus da esgana, foram extraídos a partir da vacina Tetradog, e o controlo do DNA de parvovírus felino, a partir da vacina Tricat. Para tal, a fracção liofilizada de cada vacina foi ressuspensa em 1 mL PBS, tendo sido utilizados 200 µL para a extracção de ácidos nucleicos, correspondendo a 10³ DICC50 de parvovírus canino e felino (estirpe Bristol), 10^{2,5} DICC50 de adenovírus canino, e 10³ DICC50 de vírus da esgana.

Após extracção, os ácidos nucleicos foram armazenados a -80°C, até posterior utilização. A detecção dos ácidos nucleicos virais nas amostras biológicas foi efectuada pela técnica de reacção de polimerase em cadeia (PCR), para vírus de DNA, ou por

transcrição reversa seguida de PCR, para o vírus de RNA. Em cada ensaio de PCR ou RT-PCR foram incluídos o controlo positivo e o controlo negativo. A sequência dos oligonucleótidos iniciadores usados no PCR e RT-PCR, e a dimensão dos fragmentos amplificados, estão indicados na tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados nos ensaios de PCR e RT-PCR, posições nucleotídicas, regiões do genoma amplificadas, e tamanho dos fragmentos

Virus	Primer	Sequência (5'-3')	Posições nucleotídicas	Região do genoma amplificada	Tamanho do fragmento	Ref.
Vírus da esgana	P1	ACAGGATTGCTGAGGATAT	769-789	Gene da nucleoproteína	287pb	Frisk <i>et al.</i> , 1999
	P2	CAAGATAACCATGTACGGTGC	1055-1035			
Parvovírus (CPV-2, FPV)	555for	CAG GAA GAT ATC CAG AAG GA	4003-4022	Gene da proteína da cápside	583 pb	Desario <i>et al.</i> , 2005
	555rev	GG TGC TAG TTG ATA TGT AAT AAA CA	4561-4585			
Adenovírus canino -1	CAV-VP1 e	CTG GGC GGG ATT TAG AGG GTG G	18804-18825	Gene da proteína da cápside	704pb	Erles <i>et al.</i> , 2004
	CAV-VP2	CAA GGG CGT GGG CGG AGT TAG A	19507-19486			

A reacção para a amplificação do *Parvovírus* foi efectuada num volume final de 25 µL, utilizando o *kit* comercial Fidelity™ PCR Master Mix (2×) (USB), 2 mM MgCl₂, 5 µL de amostra, e 50 pmol de cada primer, de acordo com as condições descritas por Desario *et al.* (2005). A amplificação do *Adenovírus canino* decorreu num volume total de 25 µL, utilizando o *kit* Fidelity™ PCR Master Mix (2×) (USB), 5µL de amostra e 50 pmol de cada primer, de acordo com Erles *et al.* (2004). No que se refere à amplificação do RNA do *Vírus da esgana*, a RT-PCR foi efectuada num só passo, também num volume final de 25µL, com 10 µL de amostra e 50 pmol de cada primer, utilizando o *kit* comercial RT-PCR Master Mix (2x) (USB), de acordo com Frisk *et al.*, (1999).

Para avaliar a sensibilidade do PCR e da RT-PCR, para detecção dos ácidos nucleicos virais nos materiais biológicos, foram realizadas diluições em série dos controlos positivos de DNA de CPV, FPV e CAV e de RNA de CDV, até uma diluição final correspondente a 0,1 DICC50 para os *parvovírus*, *canino* e *felino*, e para o *adenovírus canino*, e a 10 DICC50 para o *vírus da esgana*. Estas diluições foram depois utilizadas nos ensaios de PCR e RT-PCR.

Sequenciação de amostras

A região viral amplificada a partir das amostras biológicas foi extraída do gel de agarose, utilizando o *kit* comercial Illustra™ GFX™ DNA Gel Band Purification kit, e sequenciado pela empresa STAB VIDA.

Análise filogenética

As relações filogenéticas entre diferentes isolados de *Parvovirus* foram inferidas por análise filogenética, utilizando sequências do gene VP2 de vários *Parvovirus* isolados a partir de carnívoros, disponíveis no Genbank, através do seu número de acesso (EMBL/Genbank/DDBJ) (Tabela 2). As sequências nucleotídicas foram alinhadas utilizando o programa Pileup (GCG v10.0) com os parâmetros por defeito (penalidade de criação de espaços: 8, e penalidade de extensão de espaços: 2). O alinhamento foi corrigido manualmente, para maximizar as semelhanças genéticas.

Tabela 2: Identificação das sequências usadas na análise filogenética e respectivos números de acesso.

Identificação da sequência	Número de acesso
FPV 1	EF418568
FPV 2	EF418569
FPV3	EU498715
FPV4	AB000068
FPV5	AB000056
FPV6	EU018144
MEV 7	EU137663
MEV 8	EF428258
MEV 9	M23999
MEV 10	D00765
BFPV 11	U22185
BFPV 12	EU698028
CPV-2 13	M19296
CPV-2 14	M38245
CPV-2a 15	M24000
CPV-2a 16	M24003
CPV-2a 17	DQ340418
Novo CPV-2A 18	DQ340408
CPV-2b 19	M74852
CPV-2b 20	M74849
Novo CPV-2A 21	AB054222
Novo CPV-2A 22	AB054224

Por não ter sido possível amplificar a sequência completa do gene VP2 dos parvovírus detectados neste rastreio, foram inferidas filogenias para o gene VP2 com 1754 pb, que se localiza entre as posições 2628 e 4382 do genoma viral e para a proteína completa de 583 aminoácidos, e posteriormente para a região amplificada (Figura 7). Este fragmento

de 583 pb incluído no gene VP2 (da posição nucleotídica 4003 à 4585), corresponde a uma sequência peptídica de 179 amino ácidos.

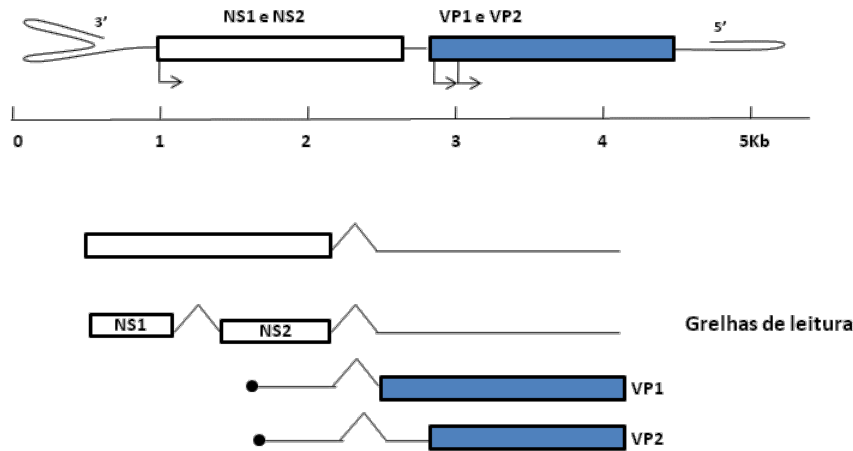


Figura 7: Organização genômica dos parvovírus canino, felino, da enterite dos visões, e da raposa do ártico

(Murphy *et al.*, 1999, adaptado)

As filogenias para as sequências de nucleótidos foram inferidas por *maximum likelihood*, com o modelo de substituição HKY (Hasegawa *et al.*, 1985), através do programa TREE-PUZZLE 5.1., e os valores de *bootstrap* foram obtidos através de uma análise de 100 réplicas.

As sequências de nucleótidos foram traduzidas através do programa MAP (GCG v10.0), e alinhadas com o programa Pileup. A relação filogenética foi calculada por *maximum likelihood*, pelo mesmo programa, através do modelo de substituição BLOSUM 62 (Henikoff and Henikoff, 1992). Os valores de *bootstrap* foram obtidos através de uma análise de 10 000 réplicas.

As árvores filogenéticas resultantes foram posteriormente comparadas para avaliar possíveis diferenças, resultantes da perda de locais informativos. Subsequentemente, foram adicionadas ao alinhamento nucleotídico e amino-acídico as sequências amplificadas a partir das fezes positivas e a análise filogenética foi repetida utilizando a mesma metodologia.

Resultados

Detecção viral

Através da amostragem, foram recolhidos 143 dejectos de cinco espécies de carnívoros abundantes na área de estudo, correspondendo a 31 de fuinha; 31 raposa; 30 de sacarrabos; 23 de geneta, e 29 de texugo. Todos os dejectos foram testados para *Parvovírus*, e *Vírus da Esgana*. Os dejectos de raposa foram testados adicionalmente para *Adenovírus canino* tipo 2. Foi também usada uma amostra de intestino delgado de uma fuinha encontrada atropelada para análise de DNA de parvovírus.

A sensibilidade das técnicas de RT-PCR e PCR foi determinada pela amplificação de 0,1 DICC do CPV, FPV, e CAV, e 10 DICC do CDV, dos controlos positivos, para o DNA de *Parvovírus canino e felino*, e de *Adenovírus canino*, e para o RNA do *Vírus da Esgana*, em todas as análises efectuadas, revelando uma elevada especificidade e sensibilidade. (Figura 8)

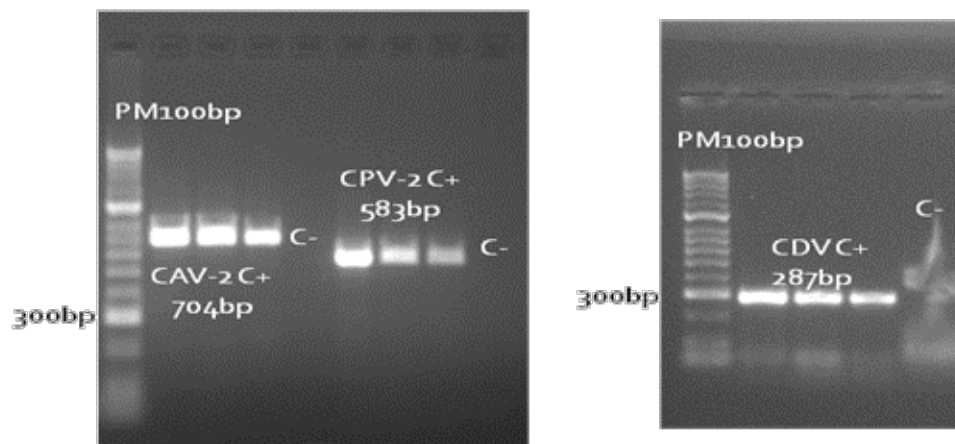


Figura 8: Avaliação da sensibilidade dos ensaios de PCR e RT-PCR para detecção de CAV-2, CPV-2 e CDV.

Em duas amostras fecais, uma de raposa e outra de geneta foram detectados DNA de parvovírus, com uma prevalência de 3,2% (1/31) e 4,3% (1/23) respectivamente (Tabela 3) (Figuras 9 e 10). As restantes amostras deram resultados negativos para todos os vírus analisados.

Tabela 3: Prevalência de DNA viral de CPV/FPV e CAV, e RNA viral de CDV nas amostras das cinco espécies estudadas

Espécie	n	CPV/FPV	CAV	CDV
Raposa	31	1 (3,2%)	0 (0%)	0 (0%)
Fuinha	31	0 (0%)	-	0 (0%)
Texugo	29	0 (0%)	-	0 (0%)
Geneta	23	1 (4,3%)	-	0 (0%)
Sacarrabos	30	0 (0%)	-	0 (0%)

Após sequenciação das duas amostras positivas de *Parvovirus*, as sequências nucleotídicas foram submetidas à base de dados do Genebank revelando uma identidade superior a 98% com *Parvovirus canino e felino*, respectivamente.

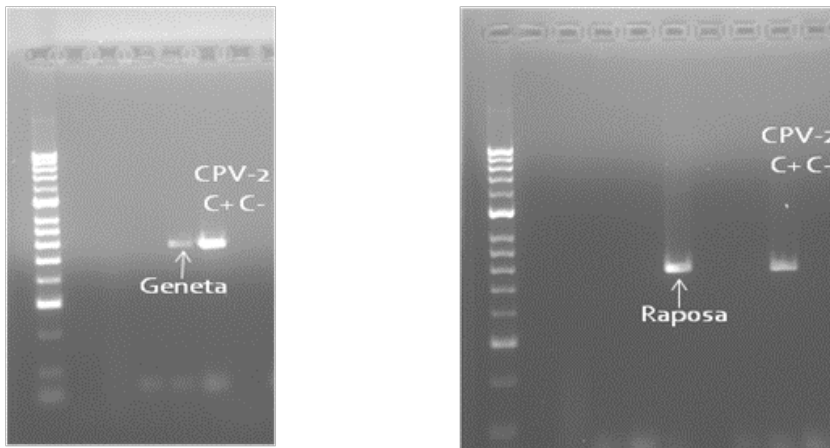


Figura 9: Detecção de Parvovírus em amostras de geneta e raposa.

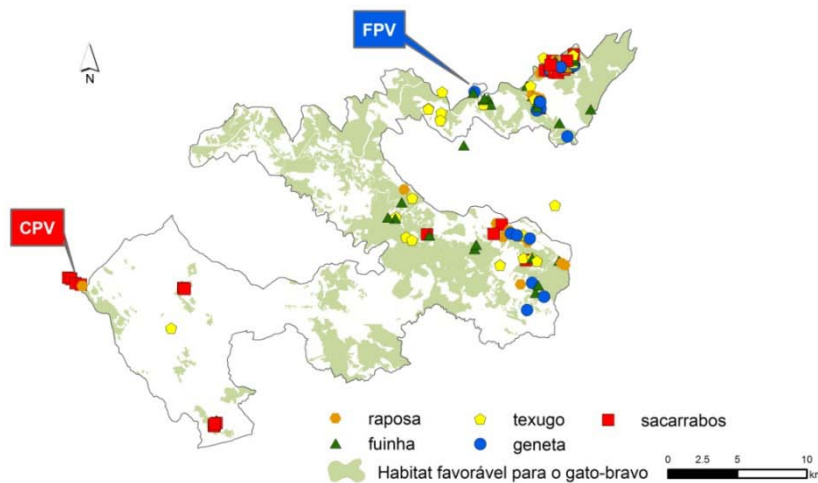


Figura 10: Localização das amostras positivas de CPV e FPV em raposa e geneta

Análise filogenética

As filogenias calculadas com a sequência nucleotídica e amino acidica do gene/proteína VP2 completa e com a região que corresponde ao fragmento amplificado, apresentam topologias muito semelhantes definindo dois grupos principais, suportados por valores consistentes de *bootstrap* (Figuras 11 A e 12 A).

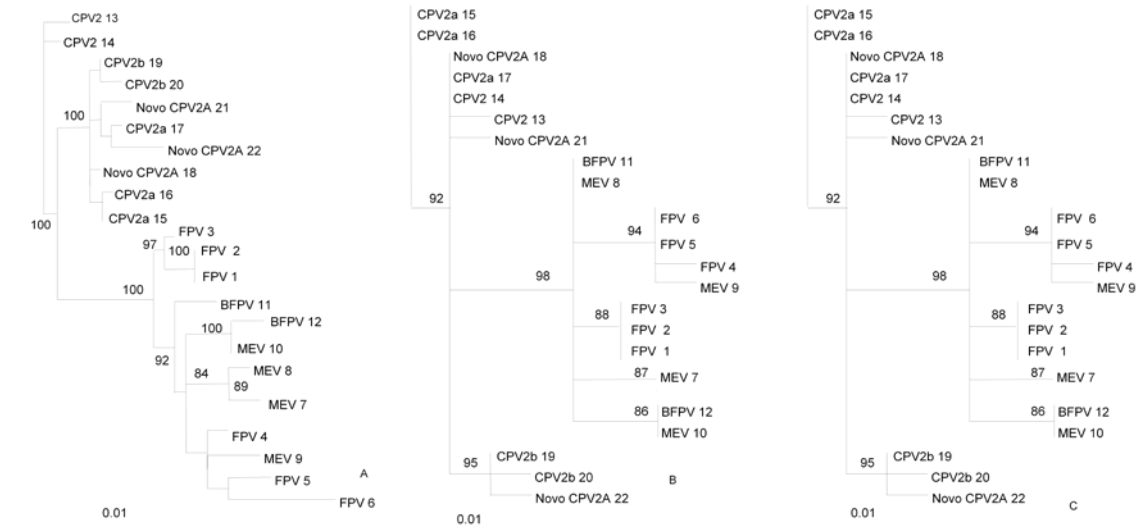


Figura 11: Árvores calculadas por maximum likelihood (modelo de substituição HKY85) para: (A) a sequência completa do gene VP2, com uma taxa de transição/transversão de 4.74 e de transição pirimidina/transição purina de, 0.67 (B) a região amplificada, sem as sequências obtidas neste estudo, com uma taxa de transição/transversão de 3.51, e de transição pirimidina/transição purina de 0.86, e (C) a região amplificada, com as sequências obtidas neste estudo, com uma taxa de transição/transversão de 3.87, e de transição pirimidina/transição purina de 0.86, todas as taxas estimadas a partir dos dados. As escalas representam 0,01 da distância genética.

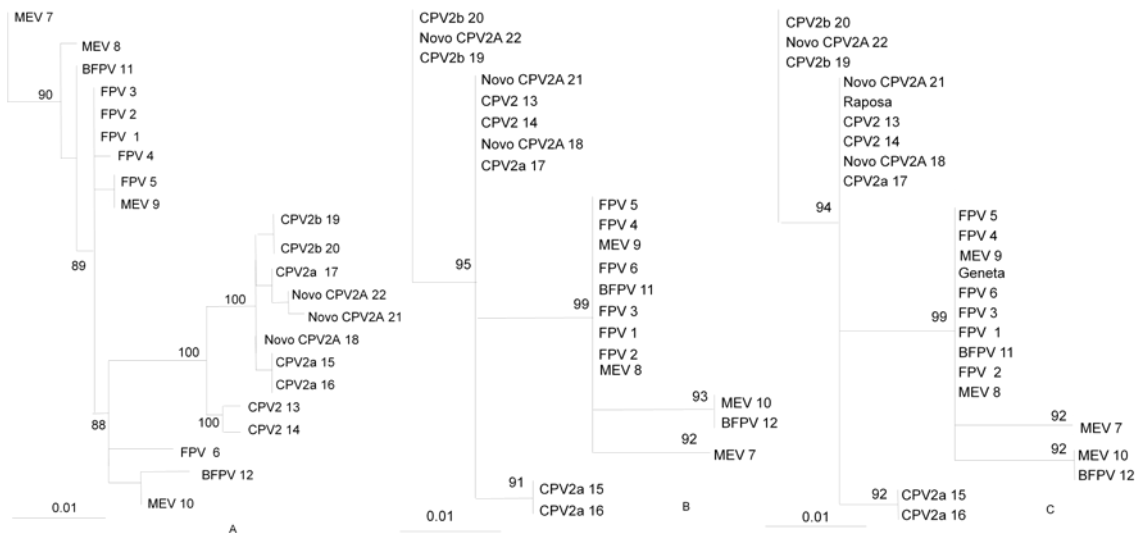


Figura 12: Árvores calculadas por maximum likelihood (modelo de substituição BLOSUM 62), para a (A) proteína VP2 completa, com (B) sequência de aminoácidos correspondente à região amplificada, sem as sequências obtidas neste estudo, e (C) sequência de aminoácidos correspondente à região amplificada, com as sequências obtidas neste estudo. As escalas representam 0,01 de distância aminoacídica.

O primeiro grupo é constituído pelas sequências de *Parvovirus canino* tipo 2, que apresentam uma distância média entre si de $0,003 \pm 0,001$ substituições nucleotídicas no gene inteiro. Nas árvores com o gene e a proteína completa, os diferentes subtipos CPV-2, CPV-2a, CPV2b, e o novo CPV2A encontram-se separados, embora apenas os CPV-2 formem um grupo consistente, e o CPV-2a 17 tenha sido agrupado com os subtipos e novo CPV2A.

O segundo grupo é formado pelas sequências de FPV, MEV e BFPV com uma distância média de $0,009 \pm 0,004$ substituições nucleotídicas no gene inteiro, apresentando uma distribuição heterogénea das sequências. Na árvore de nucleótidos observa-se um grupo formado por sequências de FPV (FPV 1, FPV 2, e FPV 3), e um segundo grupo formado por sequências de MEV (MEV 7 e MEV 8), ambos com um valor de *bootstrap* consistente. Para além destes grupos a árvore de nucleótidos apresenta três grupos heterogéneos com valores de *bootstrap* consistentes, e a de aminoácidos apenas um. A sequência MEV 7 surge distinta das restantes sequências de FPV, MEV e BFPV em ambas as árvores, com um valor de *bootstrap* elevado.

Os dois grupos de *parvovirus canino* e *felino* estão separados por uma distância média de $0,01 \pm 0,008$ substituições.

O cálculo das filogenias com a região que corresponde ao fragmento amplificado, embora mantenha a topologia geral idêntica às calculadas com o gene/proteína completo, revela uma diminuição de resolução dos subgrupos incluídos nos grupos principais.

As duas sequências de CPV-2, que formavam um grupo consistente nas árvores com a sequência completa, surgem agrupadas com as sequências CPV-2a 17, novo CPV-2A 18 e novo CPV-2A 21. As sequências de CPV-2a 15 e 16, as duas de CPV-2b (CPV2b 19 e CPV2b 20) e o novo CPV2A 22 passam a formar dois grupos consistentes. As sequências de FPV, MEV e BFPV mantiveram o padrão de agrupamento observado na filogenia calculada com o gene inteiro, à excepção das MEV 8 e BFPV 11 que foram reagrupadas (Figuras 11 B e 12B).

A adição das sequências de parvovírus amplificadas a partir das fezes de raposa e geneta manteve a topologia da árvore anterior. A sequência da geneta foi incluída no subgrupo constituído unicamente por sequências de FPV (FPV Tigre 1, FPV leão 2 e FPV 3). A sequência amplificada a partir da raposa foi incluída nos parvovírus caninos, no grupo composto pelos CPV-2, o CPV-2a 17, o novo CPV-2A 18, e o novo CPV-2A 21. Assim, parece provável que a sequência da raposa não corresponda ao CPV-2b, pois as

duas sequências deste subtipo usadas na análise mantiveram-se separadas do grupo anterior com um valor de suporte fidedigno. Ambos os grupos onde as novas sequências foram incluídas estão suportados com valores de *bootstrap* elevados (Figuras 5 C e 6C). A análise filogenética com base na sequência amino-acídica do segmento amplificado, mantém a topologia geral da árvore calculada com a proteína VP2 completa, embora tenha havido reagrupamentos e uma perda de resolução, à semelhança do que se sucedeu com a árvore de nucleótidos. O grupo principal formado pelos *Parvovirus caninos* tipo 2 manteve o mesmo padrão de agrupamento observado na árvore de nucleótidos calculada com esta região, e o grupo formado pelos FPV, MEV e BFPV, distinguiu apenas três grupos com valores de suporte elevados, o primeiro formado unicamente pela sequência MEV 7, o segundo constituído pelas sequências BFPV 12 e MEV 10, e o terceiro incluindo as restantes sequências de FPV, MEV e BFPV com uma topologia semelhante à observada na árvore calculada com a proteína VP2 inteira, embora a sequência MEV 6 tenha sido reagrupada, e os grupos que não estavam suportados por um valor de *bootstrap* consistente tenham colapsado.

Ao adicionar as sequências amplificadas a partir das fezes de raposa e geneta, o padrão de agrupamento manteve-se igual ao da árvore anterior e ambas as sequências foram agrupadas do mesmo modo que na árvore nucleótidos parcial (Figuras 11 C e 12 C).

Os parvovírus felinos e caninos são geneticamente muito próximos partilhando homologias superiores a 98%. A distinção entre FPV, MEV e BFPV é efectuada com base no hospedeiro a partir do qual são isolados e são indistinguíveis através das propriedades biológicas *in vitro*. (Horiuchi *et al.*, 1998; Steinel *et al.*, 2001).

A proteína VP2 inclui 6 locais amino-acídicos conservados em todos os CPV e FPV (80, 93, 103, 323, 564 e 568). Os locais 93, 103 e 323 determinam a capacidade de o vírus replicar em hospedeiros caninos, enquanto os locais 80, 564 e 568 determinam a replicação em hospedeiros felinos. A capacidade de infecção de hospedeiros felinos dos novos subtipos CPV-2a e CPV-2b é determinada pelas alterações aminoacídicas nas posições 87, 300 e 305, que são informativos na definição destes subtipos. O aminoácido 426 é conservado no FPV, CPV-2 e CPV-2a, mas é diferente no CPV-2b, enquanto o 555 diferencia CPV-2a dos FPV, CPV-2 e CPV-2b (Steinel *et al.*, 2000). Os aminoácidos 246, 297, e 300 permitem distinguir o CPV-2c (Nakanura *et al.*, 2001; Decaro *et al.*, 2006).

A diferenciação das sequências ao nível da proteína VP2 é efectuada através da detecção de mutações não sinónimas em catorze locais (80, 87, 93, 103, 232, 297, 300,

305, 323, 426, 555, 564 e 568). Os *Parvovirus caninos* são diferenciados dos *Parvovirus felinos*, *Vírus da enterite dos visões*, e *Parvovirus da raposa do ártico* através de seis alterações aminoacídicas (80, 93, 103, 323, 564 e 568), e também diferenciados dos *Parvovirus felinos* através uma alteração no aminoácido 232. Os subtipos CPV-2 a, b e novos CPV-2A são diferenciados dos CPV-2 e dos restantes parvovírus (FPV, MEV e BFPV), através das posições 87 e 305, e apenas do CPV-2 através das posições 101 e 300. O aminoácido 297 permite a distinção dos novos CPV-2A (Tabela 3).

Tabela 4: Variações aminoacídicas entre sequências de *Parvovirus canino* tipo 2, *Parvovirus felinos*, *Vírus da enterite dos visões*, *Parvovirus da raposa do Ártico*, e as sequências obtidas neste estudo

Sequências	Resíduos amino-acídicos													
	80	87	93	101	103	232	297	300	305	323	426	555	564	568
FPV 1	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
FPV 2	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
FPV3	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
FPV4	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
FPV5	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
FPV6	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
MEV 7	K	M	K	T	V	V	S	V	D	D	N	V	N	A
MEV 8	K	M	K	T	V	V	S	V	D	D	N	V	N	A
MEV 9	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
MEV 10	K	M	K	T	V	I	S	A	D	D	N	V	N	A
BFPV 11	K	M	K	T	V	V	S	V	D	D	N	V	N	A
BFPV 12	K	M	K	T	V	I	S	P	D	D	N	V	N	A
CPV-2 13	R	M	N	I	A	I	S	A	D	N	N	V	S	G
CPV-2 14	R	M	N	I	A	I	S	A	D	N	N	V	S	G
CPV-2a 15	R	L	N	T	A	I	S	G	Y	N	N	I	S	G
CPV-2a 16	R	L	N	T	A	I	S	G	Y	N	N	I	S	G
CPV-2a 17	R	L	N	T	A	I	S	G	Y	N	N	V	S	G
NovoCPV-2A 18	R	L	N	T	A	I	A	G	Y	N	N	V	S	G
CPV-2b 19	R	L	N	T	A	I	S	G	Y	N	D	V	S	G
CPV-2b 20	R	L	N	T	A	I	S	G	Y	N	D	V	S	G
Novo CPV-2A 21	R	L	N	T	A	I	A	D	Y	N	N	V	S	G
Novo CPV- 2A 22	R	L	N	T	A	I	A	D	Y	N	D	V	S	G
Raposa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V	S	G
Geneta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	V	N	A

A diferentes cores estão assinalados os aminoácidos que permitem a distinção entre os diferentes parvovirus

A azul: FPV, MEV, e BFPV dos CPV

A vermelho: FPLV

A Lilás: subtipos CPV-2a, b e c, dos CPV-2, FPV, MEV, e BFPV

A Rosa: As estirpes vacinais CPV-2 dos restantes parvovírus

A Laranja claro: Os novos subtipos CPV-2A dos restantes parvovírus

A Laranja: As estirpes vacinais CPV-2 dos restantes parvovírus caninos

Embora a utilização de apenas um terço da sequência completa da proteína VP2 na análise filogenética perca 10 locais filogeneticamente informativos, a distinção dos tipos de parvovírus com maior distância genética e antigénica, que permite distinguir os CPV dos FPV, MEV e BFPV mantém-se, estando incluídos dois locais que a tornam possível (564 e 568). Esta situação representa uma perda de resolução, principalmente ao nível da distinção entre os diferentes subtipos do CPV-2, onde estão incluídos apenas um local que permite distinguir os subtipos CPV-2b e uma das sequências de um novo CPV-2A (CPV-2A 22) (426), e dois CPV-2a (555), justificando o colapso dos subgrupos de *Parvovirus canino* observado nas árvores filogenéticas.

Através da análise filogenética, a sequência amplificada a partir das fezes da geneta foi identificada como parvovírus felino, e a de raposa como parvovírus canino. Este último é provavelmente um subtipo CPV-2a, um novo CPV2-A, ou uma estirpe vacinal CPV-2, pois os CPV2b usados na análise encontram-se separados do grupo constituído por *Parvovirus caninos* onde a raposa foi incluída, por um elevado valor de *bootstrap*, tanto nas filogenias calculadas com as sequências de nucleótidos como de aminoácidos, e actualmente o CPV-2 original foi substituído pelos novos subtipos CPV2a; CPV2b e CPV2c. A sequência amplificada a partir das fezes de raposa apresenta a mesma variação de aminoácidos que as sequências de CPV-2a 17, novo CPV-2A 18, 21 e 22, e as estirpes vacinais, na região amplificada.

Discussão

Os resultados do rastreio virológico revelaram uma reduzida prevalência de *Parvovírus*, e uma ausência de excreção de *Adenovírus Canino* e *Vírus da Esgana*, nas fezes colhidas entre o início Janeiro e o final de Março, sugerindo que as espécies abordadas neste estudo, muito provavelmente, não representam uma fonte de infecção para as espécies mais raras.

A reduzida prevalência detectada pode ser justificada por várias razões de ordem técnica e/ou do ponto de vista ecológico. Como a metodologia usada indica a prevalência de animais infectados que estão a excretar o vírus, a detecção é influenciada pelo período de excreção viral através das fezes, e pela resistência dos agentes infecciosos a condições ambientais adversas. A possibilidade de degradação ambiental dos ácidos nucleicos foi minimizada pela recolha de dejectos recentes.

A realização alternativa de rastreios serológicos, embora mais informativa sobre a exposição da população a agentes infecciosos, pois a imunidade aos agentes patogénicos analisados pode durar vários anos, no caso do *vírus da esgana*, ou ser vitalícia, no caso dos *parvovírus* e *adenovírus* (Green, 1990; Murphy *et al.*, 1999), é consideravelmente mais invasiva, pois implica a captura e manuseamento dos indivíduos, e, consequentemente, de difícil realização.

A prevalência detectada pode também ser justificada pelo facto de apenas terem sido colhidos dejectos cuja morfologia permitisse identificar a espécie, excluindo assim, os dejectos diarreicos que poderiam traduzir uma das manifestações de doença, causada por qualquer um dos vírus analisados. Por outro lado, também é possível ter ocorrido um enviesamento da amostragem, porque os animais infectados por estes agentes patogénicos tendem a reduzir a mobilidade, sendo menos provável encontrar os seus dejectos nos locais comuns. De facto, espécies silvestres infectadas experimentalmente com estes agentes patogénicos (visão, raposa, guaxinim, e gamba) manifestaram sintomas clínicos de depressão, apatia, perda de apetite, e letargia (Barker *et al.*, 1983).

Numa perspectiva ecológica os resultados obtidos podem igualmente ser justificados pela possibilidade de ocorrência de oscilações na prevalência viral nas populações (Grenfell and Dobson, 1995, Roelke-Parker *et al.*, 1996), e as amostragens efectuadas coincidirem com um período de reduzida prevalência.

Por outro lado a detecção de ácidos nucleicos virais nas fezes é igualmente influenciada pela resistência ambiental do agente. Os *parvovirus* são altamente estáveis na natureza

podendo persistir durante cinco meses ou mais no meio exterior ao hospedeiro, o que pode justificar o facto de ter sido detectado. As infecções causadas por este vírus são mais frequentes na época quente (A. Duarte com. pess.), o que pode estar relacionado com a detecção de um pequeno número de animais infectados no final do Inverno e início da Primavera, neste rastreio.

Os vírus em estudo são altamente contagiosos, sendo excretados nas fezes em títulos elevados. A infecção é adquirida por contacto directo com fezes ou objectos contaminadas, e através do contacto directo entre os indivíduos. Os viriões podem igualmente ser dispersos por vectores, como mamíferos ou insectos, que o podem transportar por períodos extensos. Assim, apesar de o período de excreção ser curto, com um máximo de 7 a 10 dias após a infecção (Green, 1990; Steinel *et al.*, 2001), o período de infecciosidade pode ser prolongado.

A virulência dos *Parvovirus* é moderada em animais adultos, mas é no entanto muito elevada para os animais jovens, infectados durante a gestação ou nos dois meses após o nascimento (Green, 1990; Murphy *et al.*, 1999; Steinel *et al.*, 2001).

Apesar das amostras processadas neste trabalho terem sido obtidas numa fase em que os indivíduos podiam estar mais susceptíveis à infecção (período em que ocorre o pico de acasalamento e os primeiros nascimentos para as espécies estudadas), como a prevalência detectada foi reduzida, este vírus não parece representar um perigo para as populações em estudo. Seria interessante alargar rastreio temporalmente, e incluir vários anos, procurando compreender a influência deste agente infeccioso na fertilidade e na sobrevivência dos juvenis, e verificar se ocorrem variações sazonais na prevalência e quais as causas das mesmas.

Embora a informação sobre a susceptibilidade das espécies selvagens aos *Parvovirus* seja diminuta, Barker *et al* (1983) relataram a ausência de sintomatologia clínica em seis raposas inoculadas experimentalmente com o CPV-2, e em duas raposas inoculadas com o FPV. No entanto foram observados sintomas clínicos causados pelo CPV noutros canídeos selvagens, como lobos e coiotes, pelo que se esperava que as raposas também os tivessem manifestado, pois são espécies filogeneticamente próximas (Barker *et al.*, 1983).

Quanto à susceptibilidade na geneta e no sacarrabos, esta não está documentada. No entanto, visões inoculados experimentalmente com FPV e CPV, para além de excreção viral pelas fezes, exibiram sintomas ligeiros e uma forte resposta serológica (Barker *et*

al., 1983), pelo que os mustelídeos presentes no sítio Moura-Barrancos (doninha, toirão, texugo e lontra *Lutra lutra*) podem apresentar uma susceptibilidade semelhante.

Vários rastreios serológicos realizados em diferentes espécies de carnívoros na Europa, demonstraram que a prevalência de contra o parvovírus varia entre valores moderados a elevados, podendo no entanto ser endémico e ter uma influência reduzida na mortalidade nessas populações. Em Espanha, os valores variam entre 5,1 e 11% nas raposas (Truyen *et al.*, 1998; Sobrino *et al.*, 2008), sendo de 15% em sacarrabos, 10% em genetas, 5% em linceas (Millán *et al.*, 2008). Na Alemanha foram detectados valores de 5 a 9% nas raposas, e de 31% nas fuinhas (Frölich *et al.*, 2000, 2005), enquanto na Suíça foi detectado um valor de 2% no gato bravo (Leuteneger *et al.*, 1999).

A ausência de detecção de Adenovírus canino nas amostras de Moura Barrancos, pode sugerir que o vírus não está presente na população de raposas, ou que a prevalência da infecção é muito reduzida. Esta situação, não parece dever-se à degradação viral, pois este vírus é moderadamente resistente à inactivação ambiental, sendo estável quando exposto a radiação UV, e permanece viável durante dias à temperatura ambiente e durante meses a temperaturas inferiores a 4°C (Green, 1990).

A maioria das infecções causadas pelo Adenovírus canino tipo 1 são assintomáticas ou manifestam-se por uma infecção respiratória indiferenciada, apesar de em alguns casos provocar uma doença sistémica que pode causar a morte (Murphy *et al.*, 1999). A contagiosidade é também elevada devido à excreção viral pela urina dos animais que sobrevivem, durante um período de seis meses após a infecção (Green, 1990; Murphy *et al.*, 1999). A transmissão pode ocorrer por contacto directo ou indirecto. Assim, pode ser provável que estejam presentes raposas seropositivas, neste local, pela elevada contagiosidade do vírus, e pelo facto de nem sempre ser letal.

Na Alemanha foram detectados anticorpos contra este vírus, com uma prevalência de 3,5% em raposas (Truyen *et al.*, 1998).

O *Vírus da esgana* pelo contrário, é susceptível à radiação UV e extremamente susceptível ao calor e desidratação, embora a sobrevivência no ambiente seja mais prolongada a temperaturas mais reduzidas podendo permanecer activo durante semanas, perto da temperatura de congelação (Green, 1990).

A ausência de detecção deste vírus nas amostras processadas pode assim dever-se à elevada susceptibilidade viral a factores físicos (Green, 1990; Murphy *et al.*, 1999). O *Vírus da esgana* é altamente contagioso e frequentemente letal e os animais infectados podem excretar o vírus por um período de 2-3 meses (Green, 1990). Esta situação

associada à reduzida resistência no ambiente, pode justificar igualmente a ausência de detecção.

Cerca de 25% a 75% dos cães susceptíveis sobrevivem e podem eliminar o vírus, sem manifestar sinais de doença (Green, 1990). Também é frequente que indivíduos selvagens resistam à infecção. Várias análises serológicas realizadas na Europa revelam valores que variam entre 0 e 30% nas raposas em Espanha, Itália, Alemanha, e Luxemburgo (Truyen *et al.*, 1998; Damien *et al.*, 2002; Frölich *et al.*, 2000, 2005; Martella *et al.*, 2002; Millán *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008;) e 20% a 39% nas fuinhas na Alemanha (Frölich *et al.*, 2000, 2005). Em Espanha, na região de Donña e Sierra Morena (Millán *et al.*, 2008), na Alemanha (Delahay and Frölich 2000; Frölich *et al.*, 2000), e em Inglaterra (van Moll, *et al.*, 1995) foram encontrados valores de 0 a 33% nos texugos, demonstrando o contacto destes animais com o agente infeccioso.

A comparação da homologia genómica entre as sequências nucleotídicas obtidas neste estudo, amplificadas a partir de material fecal de geneta e raposa, e sequências disponíveis no GeneBank, permitiu confirmar que as mesmas eram específicas de parvovírus. A análise filogenética permitiu associar a sequência amplificada a partir das fezes de geneta com o parvovírus felino, e a de raposa com o parvovírus canino. A detecção de parvovírus felino e canino sugere a participação de gatos e cães domésticos na transmissão de agentes infecciosos à fauna selvagem na área de estudo.

Embora não tenha sido possível subtipificar o Parvovírus canino amplificado, este é muito provavelmente um CPV2a, CPV2c, ou uma estirpe vacinal CPV-2, devido ao padrão de variação de locais amino-ácidos na região terminal da VP2 amplificada.

Os subtipos CPV2a, CPV2b e CPV2c já foram isolados em chitas *Acinonyx jubatus* e tigres siberianos *Panthera tigris* com sintomas clínicos de parvovirose (Steinel *et al.*, 2000), e igualmente em gatos-bravos asiáticos, gatos leopardo *Felis bengalensis* (Ikeda *et al.*, 1999) e gatos domésticos *Felis catus*, (Nakamura *et al.*, 2001), sugerindo a transmissão cruzada entre felinos domésticos e selvagens.

As espécies raposa, geneta, sacarrabos e fuinha são generalistas no que respeita à dieta e à utilização de habitat, sendo talvez uma das razões pelas quais foi detectada excreção viral em duas destas. Sendo frequente aproximarem-se de povoações onde utilizam recursos alimentares, correm um maior risco de transmissão de doenças a partir de animais domésticos. Apesar de o texugo ser também uma espécie generalista em termos alimentares, é mais sensível à perturbação e consequentemente mais restrito na

utilização do habitat (Blanco, 1998), pelo que o risco de contacto com animais domésticos pode ser inferior.

A amostra positiva para parvovírus correspondente à raposa, foi colhida a cerca de 2km de St Aleixo da Restauração, e a correspondente à geneta, perto do castelo de Noudar, a cerca de 9km de Barrancos, onde estão presentes gatos domésticos para os quais não foi detectada infecção com o FPV (A. Duarte com. pess.)

A raposa possui territórios de 1 a 6,6 km², e os machos em dispersão deslocam-se em média 20 a 30 km, podem percorrer mais de 100 km (Doncaster and Macdonald, 1991; Lucherini and Lovari 1996; Kauhala *et al.*, 2006). A geneta estabelece territórios de 2 a 3,4km², (Santos-Reis *et al.*, 2004; Zuberogitia *et al.*, 2002), pelo que é possível que tenham tido contacto com as povoações. Contudo, os dados não permitem relacionar a ocorrência de excreção viral com a localização das amostras, nem com nenhuma espécie, pois a grande maioria das amostras foram negativas, independentemente da espécie analisada, e da distância às localizações principais, e aos montes, que se encontram relativamente próximos e equidistantes na maior parte da área de estudo.

Relativamente à possibilidade das espécies abundantes na zona actuarem como reservatórios ou vectores dos agentes infecciosos em estudo, os resultados obtidos, embora indiquem que aparentemente esta situação não se verifica, não excluem a hipótese de estes agentes patogénicos terem estado presentes nestas espécies numa prevalência de infecção mais elevada, num período anterior à amostragem. É ainda necessário reforçar que a prevalência de excreção viral possa estar subestimada, devido à exclusão de fezes diarreicas, à maior dificuldade em encontrar fezes de animais infectados, e à possibilidade de degradação dos ácidos nucleicos virais, durante os processos de congelação/descongelação das amostras.

Quanto à possibilidade de a reduzida prevalência de excreção viral, determinada neste estudo, se dever a um contacto pouco frequente entre animais domésticos infectados e animais selvagens, os dados obtidos não o permitem afirmar. O tipo de contacto mais provável é o contacto directo ou indirecto com os cães de caça que, por norma, têm de estar vacinados. No entanto, em zonas rurais com reduzida densidade populacional é frequente que os animais silvestres se aproximem das zonas humanizadas, onde os recursos alimentares são mais abundantes e onde se encontram cães e gatos domésticos não vacinados, induzindo perturbações fracas a moderadas, como é o caso da área de estudo.

No sítio Moura-Barrancos já foi observada a dispersão de gatos domésticos, infectados pelo parvovírus felino, ou seropositivos para o vírus da leucemia felina, ou da imunodeficiência felina para zonas de habitat natural, ainda que a tendência da maioria dos indivíduos é de se concentrar em torno das habitações (A. Duarte, J.P. Ferreira, dados não publicados). Também já foram determinadas elevadas prevalências de anticorpos e de ácidos nucleicos dos vírus com maior importância para os felinos selvagens em gatos domésticos presentes, dos quais o FPV, que é transmissível às espécies estudadas, com uma prevalência de 26% (Duarte com. pess.).

A presença de ácidos nucleicos virais em tecidos de carnívoros foi determinada por vários autores na Alemanha, indicando valores de infecção pelo CPV de 0% em raposas, e pelo CDV de 0-5% em raposas, 15% em fuinhas, 33% em texugos e 0% em cães guaxinis (Frölich *et al.*, 2000, 2005), de 37% em mustelídeos (van Moll *et al.*, 1995), e de 0% em raposas do ártico (Ballard *et al.*, 2001).

Em Portugal, um rastreio serológico realizado em todo o país demonstrou uma prevalência anticorpos contra o CDV de 11,1% em lobos e de 9,1% em raposas, e de CPV de 32,1% em lobos, 14,3% em raposas, 12,5% em gato-bravo, 94,5% em geneta, 73,9% em fuinha, 17,6% em marta, e 8,1% em arminho (Santos *et al.*, 2009).

Numa zona relativamente próxima da área de estudo (bacia do Sado), não foram detectados ácidos nucleicos virais de coronavírus, parvovírus, adenovírus, nem de vírus parainfluenza em nenhuma das 31 amostras fecais de lontra analisadas (Oliveira *et al.*, 2008).

Em Espanha (Costa Cantábrica, Castela e Leão, Aragão e La Mancha) foi detectada exposição ao CDV e CPV, em carnívoros silvestres (Sobrino *et al.*, 2008), revelando prevalências em lobos de 24% e 63% e em raposas de 17% e 5% de CDV e CPV respectivamente. As seroprevalências de CPV diferiram entre as espécies, tendo sido observadas variações significativas em algumas regiões entre as duas espécies (Sobrino *et al.*, 2008). Outros estudos equivalentes efectuados também em Espanha em Donãna e na Serra Morena (Millán *et al.*, 2008; Roelke *et al.*, 2008) revelaram seroprevalências de CPV, FPV, CAV, e CDV muito variáveis entre as diferentes espécies carnívoras testadas. Os valores determinados variaram entre 0-5% no lince (Millán *et al.*, 2008; Roelke *et al.*, 2008), 12% nas raposas, 14% nos sacarrabos, 10% na geneta, e 0% nos texugos para o CPV. Para o CAV foram encontrados valores de 30% nas raposas e para o CDV, 18% em raposas e 5% nos sacarrabos (Millán *et al.*, 2008). Foram também

demonstradas infecções activas causadas por parvovírus em 5% dos lincos e dos gatos amostrados, pelo CDV em 5% das raposas e dos cães domésticos, pelo CAV em 10% das raposas, e não foram detectadas infecções activas nas restantes espécies estudadas (sacarrabos, geneta e texugo) (Millán *et al.*, 2008). Parece provável, devido à proximidade geográfica, que o CDV, o CAV, o CPV, e o FPV estejam igualmente presentes no sítio Moura-Barrancos, podendo haver indivíduos de várias espécies seropositivos, mesmo que a prevalência da infecção seja muito reduzida ou nula. A variabilidade das seroprevalências entre as regiões e entre as espécies é concordante com os nossos resultados e pode representar uma variação regional ou temporal.

À semelhança do verificado noutros países, a variabilidade nas prevalências encontradas nos rastreios no contexto nacional indica uma grande variação entre locais e espécies.

Teria interesse relacionar a prevalência encontrada com os factores que possam influenciar a transmissão ou dinâmica das infecções, tais como o estado de conservação dos habitats, ou o grau de ocupação humana.

Os resultados obtidos, ainda que preliminares devido ao reduzido número de amostras e à sua expressão temporal, sugerem uma reduzida preocupação relativamente à presença e circulação de agentes patogénicos neste sítio de interesse comunitário, com impacto na recuperação e no estabelecimento de novas populações de gato bravo e lince ibérico na zona. Contudo, não permitem inferir se estes agentes patogénicos tiveram uma prevalência mais ou menos elevada nas espécies de carnívoros simpátricos num período anterior.

Os estudos realizados em Espanha (Millan *et al.*, 2008; Roelke *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008), ao revelarem elevadas taxas de exposição a diversos agentes patogénicos nas populações de carnívoros simpátricos ao lince ibérico, sugerem que esta situação pode ser um risco de conservação para esta espécie, caso ocorra um surto epidémico nas restantes. Este risco deve-se à elevada vulnerabilidade desta espécie a agentes patogénicos, consequência da elevada proporção de indivíduos susceptíveis (Millan *et al.*, 2008; Roelke *et al.*, 2008) e da perda de capacidade de resposta imunológica (Peña *et al.*, 2006), causada pela diminuição da variabilidade genética devida aos *bottleneck* sofridos e à elevada consanguinidade (Johnson *et al.*, 2004). O risco de ocorrência de um surto epidémico pode ser semelhante no sítio Moura-Barrancos, pelo que o seu esclarecimento seria útil num cenário de recolonização do gato-bravo (a partir de

populações adjacentes) ou de re-introdução do lince, como perspectivado no seu Plano de Acção (ICN, 2004).

Os dados fornecidos neste rastreio contribuem para o conhecimento do estado sanitário das populações silvestres e para o planeamento de medidas de gestão ambiental. Embora indiquem que aparentemente estas espécies não estão a actuar como reservatórios dos agentes infecciosos em análise, e não evidenciem a existência de um importante fluxo de transmissão entre animais domésticos e selvagens, referem-se a um período de tempo restrito. Por este motivo parece importante conhecer melhor a influência destes agentes patogénicos na dinâmica da comunidade de carnívoros domésticos e selvagens deste local, de forma a evitar os efeitos negativos que estes possam causar nas espécies mais vulneráveis e de interesse em termos de conservação.

Considerações finais

As epidemias, muitas vezes potenciadas pela actividade humana, causam o desequilíbrio da relação agente patogénico/hospedeiro nas populações selvagens. Vários autores têm demonstrado, que os agentes infecciosos contribuem de uma forma significativa para o declínio de espécies ameaçadas, e que as espécies reservatório desempenham um papel relevante tanto na manutenção dos agentes patogénicos nas comunidades, como na sua transmissão às espécies ameaçadas (Laurenson *et al*, 1998; Haydon *et al.*, 2002).

Estes estudos revelam que o contacto entre espécies selvagens e domésticas pode ser responsável por um maior fluxo de agentes patogénicos. Na Alemanha foi detectada uma prevalência de anticorpos contra o CDV, significativamente maior em raposas nas zonas urbanas (Frölich *et al*, 2000).

Na Bolívia, no Parque Nacional de Kaa-Iya, uma região com importância para a conservação de carnívoros, foram verificadas as condições necessárias para a ocorrência de transmissão de agentes patogénicos entre as populações de carnívoros domésticos de elevada densidade e as de carnívoros silvestres, bem como de epidemias nas espécies ameaçadas. Neste estudo, foram documentadas prevalências de anticorpos muito elevadas (contra CDV, CPV, FPV e *Toxoplasma gondii*) e elevadas (CHV, CAV, CCV, *Leptospira*, *Dirofilaria* e *Sarcoptes*) em carnívoros domésticos ferais e em cães de caça não vacinados, bem como o contacto entre as populações domésticas e silvestres (Fiorello *et al.*, 2004; Fiorello *et al.*, 2006).

Já foi também demonstrado, que as populações de animais domésticos em elevada densidade são capazes de manter agentes patogénicos por períodos de tempo entre os surtos de doença, e que estas podem ser a fonte de infecção para as espécies selvagens, enquanto que nas populações de reduzida densidade tal não se verifica.

Por outro lado, as espécies introduzidas podem ter um papel importante no declínio de espécies autóctones, não só pela competição directa, como também por poderem actuar como reservatórios de agentes infecciosos e os transmitirem a espécies menos abundantes. Um rastreio serológico realizado no sudoeste de França, em mustelídeos, com o objectivo de avaliar o papel do visão americano na transmissão do *aleutian mink disease virus* ao visão europeu, e a influência do vírus no declínio desta espécie, demonstrou uma prevalência significativamente superior nos visões americanos, e uma tendência para o aumento da prevalência nos mustelídeos simpátricos, pelo que foi

sugerido que esta espécie actuasse como uma importante fonte de excreção do vírus (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004).

Estes trabalhos demonstram que a compreensão das epizootias tem uma grande importância na avaliação dos agentes patogénicos como ameaça para a conservação de espécies selvagens, e que também é indispensável intervir de forma a minimizar a influência humana no equilíbrio agente-patogénico hospedeiro.

Assim, a prevalência dos agentes infecciosos, pelo menos nas populações domésticas rurais de elevada densidade, deve ser controlada e a aproximação das espécies selvagens às zonas humanizadas deve ser desencorajada, por exemplo barrando a acessibilidade a presas domésticas e evitando a acumulação de resíduos urbanos, assim como deve ser ainda evitada a introdução de espécies exóticas.

Este estudo é uma primeira abordagem à avaliação do estado sanitário de espécies selvagens no sítio Moura-Barrancos e fornece informação complementar a outros estudos no âmbito da conservação do gato bravo e do lince (Ferreira, 2003, Rosa 2003, Janeiro 2007, Leitão, 2008), podendo ser uma base para futuros estudos, que procurem aprofundar o conhecimento das epizootias e tenham em vista uma abordagem integrada da conservação de espécies ameaçadas.

Os seus resultados permitiram confirmar que os *Parvovirus canino* e *felino*, estão presentes pelo menos nas populações de raposa e geneta, aparentemente com uma prevalência muito reduzida, e que o *Adenovirus canino* e o *vírus da esgana* parecem estar ausentes não tendo sido detectados em nenhuma das espécies de carnívoros simpátricos alvo de análise.

A detecção de vírus que igualmente infectam cães e gatos domésticos, sugerem o envolvimento destas duas espécies na transmissão de agentes patogénicos à fauna selvagem.

Pelo facto de a prevalência de excreção ser muito reduzida, ou nula para alguns dos agentes, muito provavelmente as espécies analisadas não actuam como reservatórios dos agentes patogénicos analisados, e por isso aparentemente não se colocam preocupações quanto à conservação das espécies ameaçadas.

No entanto, os dados representam apenas o período de amostragem, e a prevalência da infecção por estes agentes patogénicos pode sofrer variações ao longo do tempo. Por isso a hipótese de estes vírus terem tido uma prevalência suficientemente elevada para terem causado algum impacto negativo nas espécies ameaçadas num período anterior, não pode ser excluída.

A metodologia seguida na elaboração deste trabalho esteve relacionada com a facilidade de obtenção de amostras fecais a necessidade de obter informação representativa das populações dos carnívoros num curto espaço de tempo, de modo a poder aferir a possibilidade de as espécies analisadas estarem a actuar como reservatórios ou vectores do adenovírus canino, do vírus da esgana e do parvovírus felino e canino, e avaliar a influência das mesmas, na recuperação do lince ibérico e do gato bravo, na área de estudo.

A detecção de excreção viral informa a presença de animais infectados que estão a excretar vírus, durante o período de amostragem, enquanto uma análise serológica informa sobre a exposição dos indivíduos aos agentes patogénicos. Como os dados obtidos através destas duas metodologias se complementam, teria interesse usar ambas, pois a representatividade temporal da amostragem é essencial para a compreensão do comportamento dos agentes patogénicos nas populações, já que estes podem não ser endémicos surgindo periodicamente; no entanto por limitações logísticas e pela dificuldade de captura de animais, não foi incluída uma análise serológica.

Por último, este tipo de investigação faz sentido que seja alargada a outras áreas com interesse para a conservação, pois há variações na composição das comunidades, nas características dos habitats e no grau de ocupação humana, que é necessário conhecer.

Referências

- Alexander, K. A. & Appel, M. J. G. (1994). African Wild dogs (*Lyacon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among dogs near the Masai Mara national reserve, Kenya. *Journal of Wildlife Diseases* 30 (4), 481-485
- Alexander, K.A., Kat, P.W., Wayne, R.K., Fuller, T.K. (1994) Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. *Journal of Wildlife Diseases* 30, 486-491.
- Altizer, A., Harvell, D. & Friedle, E. (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 589-596
- Artois, M. & Remond, M. (1994). Viral diseases as a threat to free-living wild cats (*Felis silvestris*) in continental Europe. *The Veterinary Record* 134, 651-652
- Ballard, W. B., Follmann, E. F., Ritter, D., Robards, M. D., Cronin, M. A. (2001) Rabies and canine distemper in an arctic fox population. *Journal of Wildlife Diseases* 37(1) 133–137
- Baltazar, C. (2001). Modelação espacial da probabilidade de ocorrência de coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus* L.) na Zona Especial de Conservação:Moura-Barrancos. Relatório de Estágio para a Obtenção da Licenciatura em Biologia Aplicada aos Recursos Animais. F.C.U.L. 37 pp.
- Barcker, I. K. Povey, R. C. & Viogt, D. R. (1983). Response of monk, skunk, red fox, and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 47,188-197
- Biek, R., Zarnke, R.L., Gillin, C., Wild, M., Squires, J.R., Poss, M. (2002) Serologic survey for viral and bacterial infections in western populations of Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 38, 840-845.
- Blanco, J.C. (1998). Mamíferos de España I – Insectívoros, quirópteros, primates y carnívoros de la Península Ibérica, Baleares y Canarias – Guía de campo. Editorial Planeta, Barcelona, 457 pp.
- Barrett, T. (1999) Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology* 69 3-13
- Carroll, C., Noss, R. F., Paquet, C. C. (2001) Carnivores as focal species for conservation planning in the Rocky Mountain region. *Ecological Applications* 11(4), 961-980

- Cleaveland, S. Appel, M. G. J., Chalmers, W. S. K., Chillingworth, C., Kaare, M. & Dye, C. (2000). Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary Microbiology* 72, 217-227
- Clifford, D. L., Mazet, J.A.K., Dubovi, E J., Garcelon, D. K., Coonan, T. J., Conrad, P. A., Munson, L. (2006) Pathogen exposure in endangered island fox (*Urocyon littoralis*) populations: Implications for conservation management. *Biological Conservation* 131 230–243
- Courtenay, O., Quinell, R.J., Chalmers, W.S. (2001) Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. *Vet Microbiol* 81, 9-19.
- Creel, S., Creel, N.M., Munson, L., Sanderlin, D., Appel, M.J. (1997) Serosurvey for selected viral diseases and demography of African wild dogs in Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 823-832.
- Cypher, B.L., Scrivner, J.H., Hammer, K.L., O'Farrell, T.P. (1998) Viral antibodies in coyotes from California. *Journal of Wildlife Diseases* 34, 259-264.
- Dalerum, F., Shults, B. & Kunkel, K. (2005). A serologic survey for antibodies to three viruses in wolverines (*Gulo gulo*) from the Brooks range, Alaska. *Journal of Wildlife Diseases* 41(4), 792-7959
- Damien, B. C., Martina, B. E. E., Losch, S., Mossong, J., Osterhaus, A. D. M. E., Muller, C. P. (2002) Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembourg. *Journal of Wildlife Diseases* 38(4) 856-859
- Daniels, M. J., Golder, M. C., Jarrett, O., MacDonald D. W. (1999) Feline Viruses in Wildcats from Scotland. *Journal of Wildlife Diseases* 35(1) 121–124
- Daszak, P. Cunningham, A.A. & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife – Threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449
- Decaro, N., Martella V, Desario, C., Bellacicco, A. L., Camero, M., Manna, L., Aloja, D. D., & Buonavoglia, C. (2006) First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *Journal of Veterinarian Medicine* 53, 468–472
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D. D., Martella, V., Vieira, M. J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U. & Buonavoglia, C. (2007). Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 13(8) 1222-1222

- Deem, S. L., Karesh, W. B. & Weisman, W. (2001). Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation Biology* 15, 1224-1233
- Delahay, R. & Frölich, K. (2000). Absence of antibodies against canine distemper virus in free-ranging populations of the Eurasian badger in Great Britain. *Journal of Wildlife Diseases* 36(3), 576-579
- Desario, C. Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Camero, M. & Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *Journal of Clinical Methods* 126, 179-185
- Doncaster, D. & Macdonald, D. W. (1991) Drifting territoriality in the red fox *Vulpes vulpes*. *Journal of Animal Ecology* 60, 423-439
- Driciru, M., Siefert, L., Prager, K.C., Dubovi, E., Sande, R., Princee, F., Friday, T., Munson, L. (2006) A serosurvey of viral infections in lions (*Panthera leo*), from Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Journal of Wildlife Diseases* 42, 667-671.
- Erles, K., Dubovi, E., Brooks, H. W. & Brownlie, J. (2004). Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10), 4524-4529
- Ferreira, J.P. (2003). Análise dos factores condicionantes na distribuição de gato-bravo (*Felis silvestris*) no Sítio Moura-Barrancos. Tese de Mestrado em Gestão de Recursos Biológicos, Universidade de Évora, 69 pp.
- Fiorello, C.V., Deem, S.L., Gompper, M.E., Dubovi, E.J., 2004, Seroprevalence of pathogens in domestic carnivores on the border of Madidi National Park, Bolivia. *Animal Conservation* 7, 45-54.
- Fiorello, C. V., Noss, A. J. & Deem, S. L. (2006). Demography, hunting ecology, and pathogen exposure of domestic dogs in the Isoso of Bolivia. *Conservation Biology* 20, 762-771
- Fournier-Chambrillon, C., Aasted, B., Perrot, A., Pontier, D., Sauvage, F., Artois, M. Cassière, J. M., Chauby, X. & Molin, A. D. (2004). Antibodies to Aleutian mink disease parvovirus in free-ranging European mink (*Mustela lutreola*) and small carnivores from southwestern France. *Journal of Wildlife Diseases* 40(3), 394-402
- Frisk, A. L., König, M., Moritz, A. & Baumgärtner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum,

- whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology* 31(11), 3634-3643
- Frölich, K., Czupalla, O., Haas, L., Hentschke, J., Dedek, J. & Fickel, J. (2000). Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Veterinary Microbiology* 74, 283-292
- Frölich, K., Streich, W. J., Fickel, J., Jung, S., Truyen, U., Hentschke, J., Dedek, J., Prager, D. & Latz, N. (2005). Epizootiologic investigations of parvovirus infections in free-ranging carnivores from Germany. *Journal of Wildlife Diseases* 41(1), 231-235
- Green E. C. (1990) *Infectious diseases of the dog and cat*. (2nd ed.). St. Louis, Missouri: Saunders
- Grenfell, B. T. & Dobson, A. P. (1995) *Ecology of infectious diseases in natural populations*. Cambridge, UK, 536 pp.
- Härkönen, T., Dietz, R., Reijnders P., Teilmann J, Harding, Hall K. A., Brasseur, S., Siebert, U., Goodman, S. J., Jepson, P. D. , Rasmussen, T. D., Thompson, P. (2006) A review of the 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals. *Diseases of Aquatic Organisms* 68 115–130,
- Hasegawa, M., Iida, Y., Yano, T., Takaiwa, F., Iwabuchi, M. (1985) Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 22, 32-38
- Haydon, D. T., Laurenson, M. K. & Sillero-Zubiri, C. (2002) b Integrating epidemiology into population viability analysis: managing the risk posed by rabies and canine distemper to the Ethiopian wolf. *Conservation Biology* 16 (5), 1372-1385
- Haydon, D. T., Cleaveland, S. & Taylor, L. H. (2002) a Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical Challenge. *Emerging Infectious Diseases* 8 (12), 1468-1473
- Hedrick, P. W., Lee, R. N. & Parker, K. M. (2000) Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity* 85, 617-624
- Henikoff, S., Henikoff, J.G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 89, 10915-10919.
- Hofmann-Lehmann, R., Fehr, D., Grob, M., Elgizoli, M., Packer, C., Martenson, J.S., O'Brien, S.J., Lutz, H. (1996) Prevalence of antibodies to feline parvovirus,

- calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3, 554-562.
- Horiuchi, M., Yamaguchi, Y., Gojobori, T., Mochizuki, M., Nagasawa, H., Toyoda Y., Ishiguro, N. & Shinagawa, M. (1998). Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Virology* 249, 440-452
- ICN (2004) *The Iberian Lynx in Portugal, status survey and conservation action plan*. Instituto de Conservação da Natureza, 61 pp.
- ICN (2006). Plano sectorial da Rede Natura 2000. Sítios da Lista Nacional – Sítio Moura-Barrancos. Instituto de Conservação da Natureza, 15 pp.
- Ikeda, Y., Miyazawa, T., Nakamura, K., Naito, R., Inoshima, Y., Tung, K. C., Lee, W. M., Cheen, M. C., Kuo, T. F., Lin, J. A., & Mikami, T. (1999) Serosurvey for selected virus infections of wild carnivores in Taiwan and Vietnam. *Journal of Wildlife Diseases* 35 (3), 578-581
- Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Toya, Y., Takahashi, E. & Mochizuki, M. (2002). Feline host range of *canine parvovirus*: Recent emergence of new antigenic types in cats. *Emerging Infectious diseases* 8 (4), 341-346
- Janeiro, C. (2007). Adequabilidade e perspectivas de gestão do habitat para o lince Ibérico *Lynx pardinus* no Sítio Moura-Barrancos. Tese de mestrado em Gestão de Recursos Biológicos. Universidade de Évora, Évora, XX pp..
- Johnson, W. E., Godoy, A. J., Palomares, F., Delibes, M., Fernandes, m., Revilla, E., O'Brien, S. J. (2004) Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity* 95(1) 19-28
- Kauhala, K., Holmala, K., Lammers, W., & Schregel, J. (2006). Home ranges and densities of medium-sized carnivores in south-east Finland, with special reference to rabies spread. *Acta Theriologica* 51(1), 1–13
- Kennedy, M., Kania, S., Stylianides, E., Bertschinger, H., Keet, D., van Vuuren, M. (2003) Detection of feline coronavirus infection in southern African nondomestic felids. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 529-535.
- Lafferty, K. D. & Gerber, L. R. (2002) Good medicine for conservation biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. *Conservation Biology* 16(3) 593-604

- Laurenson, K., Sillero-Zubiri, C., Thompson, H., Shiferaw, F., Thirgood, S., Malcolm, J. (1998) Disease as a threat to endangered species: Ethiopian wolves, domestic dogs and canine pathogens. *Animal Conservation* 1, 273-280.
- Leuteneger, C. M., Hofmann-Lehmann, R., Riols, C. Libereck, M. Worl, G. Lups, P., Ferh, D., Hartmann, M., Weilenmann, P. & Lutz, H. (1999). Viral infections in free-ranging populations of the European wildcat. *Journal of Wildlife Diseases* 35(4), 678-686
- Leitão, (2008). Dieta e impacto da predação de gatos domésticos (*Felis catus*) em ambientes rurais. Tese de mestrado em Biologia da Conservação. Universidade de Lisboa, Lisboa, 79pp.
- Lucherini, M. & Lovari, S. (1996) Habitat richness affects home range size in the red fox *Vulpes vulpes*. *Behavioural Processes* 36, 103-106
- Mainka, S.A., Qiu, X., He, T., Appel, M.J. (1994) Serologic survey of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*), and domestic dogs and cats in the Wolong Reserve, China. *Journal of Wildlife Diseases* 30, 86-89.
- Manas, S., Cena, J.C., Ruiz-Olmo, J., Palazon, S., Domingo, M., Wolfenbarger, J.B., Bloom, M.E. (2001) Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 138-144.
- Marsilio, F., Tiscar, P.G., Gentile, L., Roth, H.U., Boscagli, G., Tempesta, M., Gatti, A. (1997) Serologic survey for selected viral pathogens in brown bears from Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 304-307.
- Martella, V., Pratelli, A., Cirone, F., Zizzo, N., Decao, N., Tinelli, A., Foti, M. & Buonavoglia, C. (2002). Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Molecular and Cellular Probes* 16, 77-83
- McCallum, H. & Dobson, A. (1995). Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 10(5), 190-193
- McFadden, K.W., Wade, S.E., Dubovi, E.J., Gompper, M.E. (2005) A serological and fecal parasitologic survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *Journal of Wildlife Diseases* 41, 615-617.

- McOrist, S., Boid, R., Jones, T. W., Easterbee, N., Hubbard, A. L. & Jarrett, O. (1991). Some viral and protozoal diseases in the European wildcat (*Felis silvestris*). *Journal of Wildlife Diseases*. 27 (4), 693-696
- Miller, D.S., Covell, D.F., McLean, R.G., Adrian, W.J., Niezgodá, M., Gustafson, J.M., Rongstad, O.J., Schultz, R.D., Kirk, L.J., Quan, T.J. (2000) Serologic survey for selected infectious disease agents in swift and kit foxes from the western United States. *Journal of Wildlife Diseases* 36, 798-805.
- Miller, B., Dugelby, B., Foreman, D., Martínez del Río, C., Noss, R., Philips, M., Reading, R., Soulé, M. E., Terborgh, J., Willcox, L. (2001) The importance of Large Carnivores to Health Ecosystems. *Endangered Species UPDATE* 18 (8), 202-210
- Millán, J., Candela, M. G., Palomares, F., Cubero, M. J., Rodríguez, A. Barral, M., Fuente, J., Almería, S. & León-Vizcaíno. (2008). Disease threats to endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *The Veterinary journal* doi:10.1016/j.tvjl.2008.04.005
- Mörmer, T., Obendorf, D. L., Artois, M. & Woodford, H. M. (2002). Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 21(1), 67-76
- Munson, L., Marker, L., Dubovi, E., Spencer, J.A., Evermann, J.F., O'Brien, S.J. (2004) Serosurvey of viral infections in free-ranging Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Wildlife Diseases* 40, 23-31.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. & Student, M. J. (1999). *Veterinary Virology* (3rd ed.). Academic Press, San Diego, California, USA
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Kawakami, K., Miyazawa, T., Tohya, Y. & Takahashi, M., (2001). Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8(3), 663–668
- Ostrowski, S., Van Vuuren, M., Lenain, D.M., Durand, A. (2003) A serologic survey of wild felids from central west Saudi Arabia. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 696-701.
- Oliveira, M., Sales-Luís, T., Duate, A., Nunes, S. F., Carneiro, C., Tenreiro, T., Tenreiro, R., Santos-Reis, M., Tavares, L. & Vilela, C. L. (2008). First assessment of microbial diversity in faecal microflora of Eurasian otter (*Lutra*

- lutra* Lineaeus, 1758) in Portugal. *European Journal of Wildlife Research* 54, 245–252
- Packer, C., Altizer, S., Appel, M., Brown, E., Marterson, J., O'Brien, S. J., Roelke-Parker, M., Holmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (1999). Viruses of the Serengeti: patterns of infection and mortality in African lions. *Journal of Animal Ecology* 68, 1161-1178
- Pedersen, A. B., Jones, K. E., Nunn, C. L. & Altizer, S. (2007) Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. *Conservation Biology* 21, 1269-1279
- Peña, L., Garcia, P., Jiménez, M. A., Benito, A., Alenza, M. D. P., Sánchez, B. (2006) Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases* 29 114-126
- Račnik, J., Skrbinšek, T., Potočnik, H., Kljun, F., Kos, I., Tozon, N., 2008, Viral infections in wild-living European wildcats in Slovenia. *European Journal of Wildlife Research* 54, 767-770.
- Riley, S.P., Foley, J., Chomel, B. (2004) Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 11-22.
- Ryser-Degiorgis, M.-P., Hofmann-Lehmann, R., Leutenegger, C.M., af Segerstad, C.H., Morner, T., Mattsson, R., Lutz, H. (2005) Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging eurasian lynx from Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 41, 58-66.
- Roelke-Parker, M., Munson, L., Parcker, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S. J., Pospischil, A. Holmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G. L. M. & Mgas, M. N. (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379, 441-445
- Roelke, M. E., Jonshon, W. E., Millán, J., Palomares, F., Revilla, E., Rodríguez, A. Calzada, J., Ferreras, P., León-Vizcanío L., Delibes, M. & O'Brien, S. (2008). Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) *European Journal of Wildlife Research* 54, 171-178
- Rosa, S. (2003). Distribuição e avaliação da qualidade do habitat para o gato-bravo no Troço Médio do Vale do Guadiana – Proposta de medidas de gestão. Estágio Profissionalizante da licenciatura em Biologia Aplicada aos Recursos Animais -

- Variante Terrestre. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa, Lisboa, 51pp.
- Santos, N., Almendra, C., Tavares, L. (2009) Serologic Survey for Canine Distemper Virus and Canine Parvovirus in Free-ranging Wild Carnivores from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases* 45, 221-226
- Schmidt-Posthaus, H., Breitenmoser-Würsen, C., Posthatus, H., Bacciarini, L. & Breitenmoser, U. (2002). Causes of mortality in reintroduced Eurasian lynx in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases* 38(1), 84-92
- Sillero-Zubiri, C., King, A.A., Macdonald, D.W. (1996) Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 32, 80-86.
- Smith, K. E., Sax, D. E. & Lafferty, K. D. (2006). Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology* 20(5), 1349-1357
- Sobrino, R., Arnal, M.C., Luco, D. F. & Gortázar, C. (2008). Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Veterinary Microbiology* 126, 251-256
- Steinel, A., Nunson, L., van Vuuren, M. & Truyen, U. (2000) Genetic characterization of the feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology* 81, 345-350
- Steinel, A., Parrish, C. R., Bloom, M. E. & Truyen, U. (2001). Parvovirus Infections in Wild Carnivores. *Journal of Wildlife Diseases* 37(3) 594-607
- Truyen, U., Müller, T., Heidrich, R., Tackmann, K., & Carmichael, L. E. (1998) Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infection* 121, 433-440
- van Moll, P., Alldinger, S., Baumgartner, W. & Adami, M. (1995). Distemper in wild carnivores: An epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Veterinary Microbiology* 44, 193-199.
- Zarnke, R.L., Evans, M.B. (1989) Serologic survey for infectious canine hepatitis virus in grizzly bears (*Ursus arctos*) from Alaska, 1973 to 1987. *Journal of Wildlife Diseases* 25, 568-573
- Zarnke, R.L., Evermann, J., Ver Hoef, J.M., McNay, M.E., Boertje, R.D., Gardner, C.L., Adams, L.G., Dale, B.W., Burch, J. (2001) Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 740-745.

Zuberogitia, I., Zabala, J., Garin, I. & Aihartz, J. (2002) Home range size and habitat use of male common genets in the Urdaibai biosphere reserve, Northern Spain. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*. 48, 107-113

Anexos

Anexo 1 - Alinhamento das sequências da proteína VP2 inteira, dos parvovírus usados na análise filogenética.

```
1 100
{MEV 7_EU137663} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{BFPV 12_EU698028} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{BLUEFOX_EU698028} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{MEV 10_D00765} PMSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{FPV 4_AB000068} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{MEV 9_M23999} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{FPV 3_EU498715} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{FPV 2_EF418569} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{FPV 1_EF418568} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{BFPV 11_U22185} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{FPV 5_AB000056} MSDGAVQPDGGQPAVRNERAAGSNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{MEV 8_EF428258} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTAVKGNMALD
{FPV 6_EU018144} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYKRVVVNNMDKTSVKGNMALD
{N CPV2A 21_AB054222} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{N CPV2A 22_AB054224} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{CPV2b 20_M74849} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{CPV2b 19_M74852} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{CPV2a 15_M24000} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{CPV2a 16_M24003} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{N CPV2A 18_DQ340408} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{CPV2a 17_DQ340418} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNLDKTAVNGNMALD
{CPV2 13_M19296} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNMDKTAVNGNMALD
{CPV2 14_M38245} MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGSGGVGISTGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHLNMPESENYRVRVVNNMDKTAVNGNMALD

101 200
{MEV 7_EU137663} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{BFPV 12_EU698028} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{MEV 10_D00765} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{FPV 4_AB000068} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{MEV 9_M23999} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{FPV 3_EU498715} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{FPV 2_EF418569} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{FPV 1_EF418568} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{BFPV 11_U22185} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{FPV 5_AB000056} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{MEV 8_EF428258} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{FPV 6_EU018144} DTHVQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{N CPV2A 21_AB054222} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{N CPV2A 22_AB054224} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2b 20_M74849} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2b 19_M74852} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2a 15_M24000} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2a 16_M24003} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{N CPV2A 18_DQ340408} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2a 17_DQ340418} DTHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2 13_M19296} DIHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
{CPV2 14_M38245} DIHAQIVTPWSLVDANAWGVWVFNPGDWQLIVNTMSELHLVSFEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYP
```

201 300
{MEV 7_EU137663} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGSDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTRTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{BFPV 12_EU698028} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGSDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTRTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{MEV 10_D00765} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{FPV 4_AB000068} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{MEV 9_M23999} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{FPV 3_EU498715} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{FPV 2_EF418569} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{FPV 1_EF418568} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{BFPV 11_U22185} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{FPV 5_AB000056} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNVYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{MEV 8_EF428258} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{FPV 6_EU018144} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{N CPV2A 21_AB054222} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{N CPV2A 22_AB054224} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2b 20_M74849} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2b 19_M74852} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2a 15_M24000} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2a 16_M24003} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{N CPV2A 18_DQ340408} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2a 17_DQ340418} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2 13_M19296} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG
{CPV2 14_M38245} WKPTIPTPWRYFFQWDRTLIPSHGTSGTPTNIYHGTD PDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDEFATGTFFFDCKPCRLTHTWQTNRALGLPPFLNSLPQSEG

301 400
{MEV 7_EU137663} VTNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{BFPV 12_EU698028} VTNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{MEV 10_D00765} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{FPV 4_AB000068} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{MEV 9_M23999} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{FPV 3_EU498715} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{FPV 2_EF418569} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{FPV 1_EF418568} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{BFPV 11_U22185} VTNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{FPV 5_AB000056} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{MEV 8_EF428258} VTNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{FPV 6_EU018144} ATNFGDIGVRQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{N CPV2A 21_AB054222} DTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{N CPV2A 22_AB054224} DTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2b 20_M74849} GTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2b 19_M74852} GTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2a 15_M24000} GTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2a 16_M24003} GTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{N CPV2A 18_DQ340408} GTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2a 17_DQ340418} GTNFGYIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2 13_M19296} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT
{CPV2 14_M38245} ATNFGDIGVQQDKRRGVTQMGN TDYITEATIMRPAEVGY SAPYYSFEASTQGPFKTP IAAGRGAQT DENQAADGDP RYAFGRQH GQKTTTTGETPERFT

401

500

{MEV 7_EU137663} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{BFPV 12_EU698028} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{MEV 10_D00765} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{FPV 4_AB000068} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{MEV 9_M23999} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{FPV 3_EU498715} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{FPV 2_EF418569} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{FPV 1_EF418568} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{BFPV 11_U22185} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{FPV 5_AB000056} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{MEV 8_EF428258} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{FPV 6_EU018144} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{N CPV2A 21_AB054222} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{N CPV2A 22_AB054224} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2b 20_M74849} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2b 19_M74852} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2a 15_M24000} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2a 16_M24003} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{N CPV2A 18_DQ340408} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2a 17_DQ340418} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2 13_M19296} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF
{CPV2 14_M38245} YIAHQDTGRYPEGDWIQINFNFLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRLHVNAPFVCQNNCPGQLF

501 586
{MEV 7_EU137663} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMGINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{BFPV 12_EU698028} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMGINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{MEV 10_D00765} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{FPV 4_AB000068} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{MEV 9_M23999} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{FPV 3_EU498715} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{FPV 2_EF418569} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{FPV 1_EF418568} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{BFPV 11_U22185} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{FPV 5_AB000056} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{MEV 8_EF428258} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{FPV 6_EU018144} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPNNIGAMKIVYEKSQLAPRKLY
{N CPV2A 21_AB054222} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{N CPV2A 22_AB054224} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2b 20_M74849} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2b 19_M74852} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2a 15_M24000} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2a 16_M24003} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{N CPV2A 18_DQ340408} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2a 17_DQ340418} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2 13_M19296} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2 14_M38245} VKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY

Anexo 2: Alinhamento das sequências do fragmento da proteína VP2, dos parvovírus usados na análise filogenética.

```

1
{CPV2b 20_M74849} RYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{N CPV2A 22_AB054224} RYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{N CPV2A 21_AB054222} RYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{CPV2 13_M19296} PEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{CPV2 14_M38245} YPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{N CPV2A 18_DQ340408} EGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{CPVa 17_DQ340418} EGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{CPV2a 15_M24000} EGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{CPV2a 16_M24003} EGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{CPV2b 19_M74852} EGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{MEV 7_EU137663} PEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{FPV 4_AB000068} RYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{FPV 5_AB000056} RYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{MEV 9_M23999} RYPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{VP2_FPLVM38246_555} YPEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{MEV 10_D00765} PAGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{FPV 6_EU018144} FNLPTVTDNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{BFPV 11_U22185} INFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{FPV 3_EU498715} INFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{FPV 1_EF418568} INFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{FPV 2_EF418569} INFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{MEV 8_EF428258} INFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{BFPV 12_EU698028} INFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{Raposa_555Rev} PEGDWIQNINFNLPVTDDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT
{Geneta_555Rev} FNLPTVTDNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTLKPRHLVNAFFVVCQNNCPGQLFVKVAPNLT

101
{CPV2b 20_M74849} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{N CPV2A 22_AB054224} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{N CPV2A 21_AB054222} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{CPV2 13_M19296} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{CPV2 14_M38245} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{N CPV2A 18_DQ340408} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPR
{CPVa 17_DQ340418} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPR
{CPV2a 15_M24000} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKL
{CPV2a 16_M24003} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY*H
{CPV2b 19_M74852} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{MEV 7_EU137663} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKL
{FPV 4_AB000068} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{FPV 5_AB000056} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{MEV 9_M23999} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{VP2_FPLVM38246_555} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{MEV 10_D00765} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{FPV 6_EU018144} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{BFPV 11_U22185} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPR
{FPV 3_EU498715} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{FPV 1_EF418568} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{FPV 2_EF418569} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKL
{MEV 8_EF428258} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY
{BFPV 12_EU698028} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPR
{Raposa_555Rev} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP
{Geneta_555Rev} NEYDPDASANMSRIVTYSDFWFKGLVFKAKLRASHTWNP IQQMS INVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAP

```

Anexo 3 - Aminoácidos agrupados segundo as suas características bioquímicas e o respectivo código de uma letra

Amino ácidos (AA)	Denominação	Código de uma letra
AA ácidos	Glutamato	E
	Aspartato	D
AA polares neutros	Glicina	G
	Serina	S
	Treonina	T
	Glutamina	Q
	Asparagina	N
	Cisteína	C
AA hidrofóbico alifáticos	Alanina	A
	Valina	V
	Leucina	L
	Prolina	P
	Isoleucina	I
	Metionina	M
AA básicos	Arginina	R
	Lisina	K
	Histidina	H
AA hidrofóbicos aromáticos	Triptofano	W
	Tirosina	Y
	Fenilalanina	F
	Asparagina/Aspartato	B
	Glutamina/Glutamato	Z
	Leucina/Isoleucina	J
	Aminoácido desconhecido	X

Anexo 4 – Tabela de distâncias genéticas entre as sequências do gene VP2 completo, das sequências usadas na análise filogenética.

	CPV2 13	CPV2 14	CPV2a 15	CPV2a 16	N CPV2A 18	CPV2b 20	CPV2b 19	CPV2a 17	N CPV2A 21	N CPV2A 22	MEV 7	MEV 8	FPV 4	MEV 9	FPV 5	BFPV 12	MEV 10	FPV 2	FPV 1	FPV 3	BFPV 11	FPV 6
CPV2 13	0.00000	0.00171	0.00458	0.00401	0.00401	0.00400	0.00515	0.00515	0.00516	0.00688	0.01269	0.01095	0.01095	0.01266	0.01328	0.01038	0.00976	0.00919	0.00919	0.00804	0.00920	0.01557
CPV2 14		0.00000	0.00401	0.00343	0.00343	0.00343	0.00458	0.00458	0.00458	0.00631	0.01211	0.01038	0.01036	0.01206	0.01270	0.00980	0.00919	0.00862	0.00862	0.00746	0.00862	0.01499
CPV2a 15			0.00000	0.00057	0.00171	0.00171	0.00285	0.00285	0.00343	0.00515	0.01329	0.01155	0.01212	0.01387	0.01330	0.01272	0.01097	0.00921	0.00921	0.00921	0.00979	0.01681
CPV2a 16				0.00000	0.00114	0.00114	0.00228	0.00228	0.00285	0.00457	0.01270	0.01097	0.01154	0.01329	0.01388	0.01214	0.01038	0.00979	0.00979	0.00863	0.00921	0.01622
N CPV2A 18					0.00000	0.00114	0.00228	0.00228	0.00285	0.00457	0.01270	0.01097	0.01154	0.01329	0.01388	0.01214	0.01038	0.00979	0.00979	0.00863	0.00921	0.01622
CPV2b 20						0.00000	0.00114	0.00228	0.00285	0.00343	0.01270	0.01096	0.01154	0.01328	0.01387	0.01213	0.01038	0.00978	0.00978	0.00863	0.00921	0.01621
CPV2b 19							0.00000	0.00342	0.00400	0.00457	0.01328	0.01154	0.01212	0.01387	0.01446	0.01271	0.01096	0.01036	0.01036	0.00920	0.00979	0.01680
CPV2a 17								0.00000	0.00285	0.00342	0.01270	0.01097	0.01271	0.01446	0.01505	0.01331	0.01155	0.01095	0.01095	0.00979	0.01037	0.01740
N CPV2A 21									0.00000	0.00400	0.01387	0.01213	0.01270	0.01446	0.01505	0.01331	0.01155	0.01095	0.01095	0.00979	0.01038	0.01622
N CPV2A 22										0.00000	0.01445	0.01271	0.01445	0.01622	0.01680	0.01506	0.01330	0.01269	0.01269	0.01153	0.01212	0.01916
MEV 7											0.00000	0.00286	0.00631	0.00804	0.00862	0.00805	0.00631	0.00803	0.00803	0.00688	0.00573	0.01210
MEV 8												0.00000	0.00574	0.00747	0.00805	0.00748	0.00574	0.00631	0.00631	0.00516	0.00516	0.01153
FPV 4													0.00000	0.00401	0.00458	0.00632	0.00458	0.00630	0.00630	0.00515	0.00516	0.00804
MEV 9														0.00000	0.00516	0.00805	0.00630	0.00803	0.00803	0.00688	0.00573	0.00975
FPV 5															0.00000	0.00863	0.00689	0.00630	0.00630	0.00746	0.00746	0.00805
BFPV 12																0.00000	0.00171	0.00804	0.00804	0.00689	0.00689	0.01095
MEV 10																	0.00000	0.00631	0.00631	0.00516	0.00516	0.00918
FPV 2																		0.00000	0.00000	0.00228	0.00573	0.01093
FPV 1																			0.00000	0.00228	0.00573	0.01093
FPV 3																				0.00000	0.00458	0.01093
BFPV 11																					0.00000	0.01094
FPV 6																						0.00000

Anexo 5 - Tabela de distâncias entre as sequências da proteína VP2 completa, das sequências usadas na análise filogenética.

	MEV 7	BFPV 12	MEV 10	FPV 4	MEV 9	FPV 3	FPV 2	FPV 1	BFPV 11	FPV 5	MEV 8	FPV 6	N CPV2A 21	N CPV2A 22	CPV2b 20	CPV2b 19	CPV2a 15	CPV2a 16	N CPV2A 18	CPV2a 17	CPV2 13	CPV2 14
MEV 7	0.00000	0.01786	0.01409	0.01046	0.01046	0.00870	0.00870	0.00870	0.00694	0.01049	0.00701	0.01767	0.02734	0.02925	0.02741	0.02741	0.02734	0.02734	0.02550	0.02734	0.02534	0.02507
BFPV 12		0.00000	0.00521	0.01232	0.01232	0.01054	0.01054	0.01054	0.01057	0.01236	0.01425	0.01603	0.02549	0.02739	0.02559	0.02559	0.02553	0.02553	0.02369	0.02553	0.01980	0.01959
MEV 10			0.00000	0.00695	0.00695	0.00520	0.00520	0.00520	0.00695	0.00697	0.01053	0.01054	0.02174	0.02363	0.02166	0.02166	0.02160	0.02160	0.01979	0.02160	0.01800	0.01781
FPV 4				0.00000	0.00000	0.00171	0.00171	0.00171	0.00344	0.00345	0.00695	0.01046	0.02156	0.02343	0.02147	0.02147	0.02142	0.02142	0.01962	0.02142	0.01785	0.01766
MEV 9					0.00000	0.00171	0.00171	0.00171	0.00344	0.00345	0.00695	0.01046	0.02156	0.02343	0.02147	0.02147	0.02142	0.02142	0.01962	0.02142	0.01785	0.01766
FPV 3						0.00000	0.00000	0.00000	0.00172	0.00172	0.00520	0.00869	0.01972	0.02158	0.01964	0.01964	0.01959	0.01959	0.01780	0.01959	0.01602	0.01586
FPV 2							0.00000	0.00000	0.00172	0.00172	0.00520	0.00869	0.01972	0.02158	0.01964	0.01964	0.01959	0.01959	0.01780	0.01959	0.01602	0.01586
FPV 1								0.00000	0.00172	0.00172	0.00520	0.00869	0.01972	0.02158	0.01964	0.01964	0.01959	0.01959	0.01780	0.01959	0.01602	0.01586
BFPV 11									0.00000	0.00345	0.00346	0.01046	0.01978	0.02165	0.01983	0.01983	0.01979	0.01979	0.01797	0.01978	0.01785	0.01767
FPV 5										0.00000	0.00697	0.01049	0.02162	0.02350	0.02154	0.02154	0.02149	0.02149	0.01968	0.02149	0.01790	0.01772
MEV 8											0.00000	0.01409	0.02363	0.02552	0.02369	0.02369	0.02363	0.02363	0.02180	0.02363	0.02165	0.02143
FPV 6												0.00000	0.02545	0.02735	0.02535	0.02535	0.02529	0.02529	0.02347	0.02529	0.02167	0.02145
N CPV2A 21													0.00000	0.00172	0.00520	0.00520	0.00519	0.00519	0.00346	0.00173	0.01076	0.01065
N CPV2A 22														0.00000	0.00346	0.00346	0.00694	0.00694	0.00520	0.00347	0.01260	0.01247
CPV2b 20															0.00000	0.00000	0.00344	0.00344	0.00172	0.00344	0.01072	0.01061
CPV2b 19																0.00000	0.00344	0.00344	0.00172	0.00344	0.01072	0.01061
CPV2a 15																	0.00000	0.00000	0.00172	0.00344	0.01069	0.01059
CPV2a 16																		0.00000	0.00172	0.00344	0.01069	0.01059
N CPV2A 18																			0.00000	0.00172	0.00890	0.00881
CPV2a 17																				0.00000	0.01069	0.01058
CPV2 13																					0.00000	0.00348
CPV2 14																						0.00000