

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA

**Deteccção molecular do bocavírus felino (FBoV) e parvovírus felino (FPV) em
gatos filhotes com diarreia**

Uberlândia

2023

JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA

**Deteção molecular do bocavírus felino (FBoV) e parvovírus felino (FPV) em
gatos filhotes com diarreia**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
da Faculdade de Medicina Veterinária, da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Investigação
Etiológica

Orientadora: Prof^ª. Dra. Aline Santana da
Hora

Uberlândia

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A447 2023	Almeida, Julio Cesar Neves de, 1996- Detecção molecular do bocavírus felino (FBoV) e parvovírus felino (FPV) em gatos filhotes com diarreia [recurso eletrônico] / Julio Cesar Neves de Almeida. - 2023. Orientadora: Aline Santana da Hora. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.33 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Veterinária. I. Hora, Aline Santana da, 1978-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências Veterinárias. III. Título. CDU: 619
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 07/2023				
Data:	23 de fevereiro de 2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	15:50
Matrícula do Discente:	12112MEV021				
Nome do Discente:	JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA				
Título do Trabalho:	Detecção molecular do parvovírus felino (FPV) e bocavírus felino (FBoV) em gatos filhotes com diarreia				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INVESTIGAÇÃO DA ETIOPATOGENIA DAS INFECÇÕES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS				

Reuniu-se por videoconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Senhores Matheus Matioli Mantovani - FAMEV/UFU; Karen Miyuki Asano - Instituto Pasteur; e Aline Santana da Hora - FAMEV/UFU, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Aline Santana da Hora, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Aline Santana da Hora, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2023, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Miyuki Asano, Usuário Externo**, em 23/02/2023, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Matioli Mantovani, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 14:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4221769** e o código CRC **3191F6DE**.

JULIO CESAR NEVES DE ALMEIDA

**Deteção molecular do bocavírus felino (FBoV) e parvovírus felino (FPV) em
gatos filhotes com diarreia**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Investigação
Etiológica

Uberlândia, 23 de fevereiro de 2023

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Aline Santana da Hora – Professora Doutora (UFU)

Dra. Karen Miyuki Asano – Pesquisadora Científica (Instituto Pasteur)

Prof. Dr. Matheus Mantovani Matioli – Professor Doutor (UFU)

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó – Professor Doutor (UFU)

Dedicatória

Aos gatos, os seres mais peculiares do universo

Agradecimentos

Aos meus pais, Marcos Ferraz de Almeida e Irene Neves de Almeida, que me deram todo o suporte necessário para que eu pudesse concluir meus objetivos. À Jaqueline Neves, Henrique Marques e Amanda Moura, por poder contar sempre com vocês. Eu os amo.

À Profa. Dra. Aline Santana da Hora, orientadora, que me acolheu e guiou durante todo o mestrado com sua inteligência e engenhosidade. Foram meses de orientações, conversas, reuniões e cobranças para que eu pudesse crescer intelectualmente e me desenvolver como pesquisador e médico veterinário. Espero que no futuro eu possa contribuir com outros alunos, como recompensa por todo o conhecimento compartilhado. Além disso, gostaria de destacar a magnitude de sua perseverança desde a concepção à coordenação do Laboratório de Investigação Etiológica Veterinária (LIvE Vet) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU) que permitiu que o meu mestrado fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão e M.V. Sueli Akemi Taniwaki, pela parceria científica que possibilitou a realização das reações de sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Agradeço também pela contribuição com as correções dos artigos provenientes da pesquisa.

À equipe do LIvE Vet por todo o auxílio em minha pesquisa, Marianne Souto, Marcelo Miranda, Nathana Martins, Lana Gila, Isabelle Pedrosa vocês são incríveis, muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo financiamento do presente trabalho através da concessão da bolsa de mestrado.

Aos gatos, responsáveis pelos gatos, protetores e médicos veterinários que contribuíram com minha pesquisa, para que o conhecimento científico tratado possa ser acessível a todos, com o objetivo de ajudar muitos outros animais.

Resumo

O bocavírus felino (FBoV) e o protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1) são vírus de DNA de fita simples linear, não envelopados, pertencentes à família *Parvoviridae* e são potenciais causadores de enteropatias em gatos. FBoV foi pouco avaliado quanto à sua ocorrência no mundo. Já o CPPV-1 possui caráter reemergente por relatos recentes de surtos em diversos países. Assim, objetivou-se avaliar a ocorrência e realizar a caracterização gênica de FBoV e CPPV-1 em gatos com menos de um ano de idade e manifestação clínica de diarreia. O estudo incluiu a amostragem de 75 gatos para investigação quanto a presença de FBoV e 85 gatos para CPPV-1. Os filhotes foram separados em dois grupos: Grupo 1 (G1), composto de gatos de diferentes origens, amostrados em domicílios, hospitais veterinários ou clínicas veterinárias; e o Grupo 2 (G2) composto por gatos diarreicos da mesma ninhada ou pertencentes ao mesmo abrigo. Foram coletadas amostras de fezes por swab retal ou sonda uretral flexível. Posteriormente, foi realizada a clarificação e a extração do DNA das amostras. O produto da extração foi submetido à PCR para detecção do gene 16S rRNA bacteriano (controle interno), PCR para região do gene NP1 do FBoV e qPCR para região do gene VP2 de CPPV-1. As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene NS1 para a determinação da espécie do bocavírus felino e ao sequenciamento completo do gene VP2 para determinação da variante de CPPV-1. Duas amostras foram negativas no controle interno e então excluídas do estudo. FBoV foi detectado em 17,8% (13/73) das amostras, com 12,8% (5/39) pertencentes ao G1 e 23,5% (8/34) ao G2. Dentre as amostras sequenciadas, 42,8% (3/7) correspondiam ao FBoV-1, 28,5% (2/7) ao FBoV-2 e 28,5% (2/7) ao FBoV-1 e FBoV-3, simultaneamente. CPPV-1 foi detectado em 43,4% (36/83) das amostras, com 40,9% (18/44) dos animais pertencentes ao G1 e 46,1% (18/39) ao

G2. Quatro amostras positivas para o CPPV-1 foram sequenciadas, três das amostras foram classificadas como parvovírus felino e uma como parvovírus canino. Esse estudo forneceu dados da ocorrência de FBoV e CPPV-1 em gatos filhotes com diarreia. Destacou-se a presença das variantes felina e canina de CPPV-1, além da primeira evidência molecular da presença de FBoV em gatos no Brasil, com comprovação da circulação das três espécies conhecidas (FBoV-1, 2 e 3).

Palavras-chave: *Parvoviridae*; parvovírus emergentes; parvovírus reemergentes; doenças entéricas; protoparvovírus carnívoro 1

Abstract

Feline bocavirus (FBoV) and *Carnivore protoparvovirus-1* (CPPV-1) are non-enveloped, linear single-stranded DNA viruses that belong to the *Parvoviridae* family and, these viruses are a potential cause of enteropathies in cats. Feline bocavirus was poorly evaluated with respect to its occurrence in the world. Although feline parvovirus has a reemerging character due to recent reports of outbreaks in several countries. Thus, the aim of the study was to evaluate the occurrence and the genetic characterization of FBoV and CPPV-1 in cats with less than one year old and clinical manifestation of diarrhea. The study included a sampling of 75 cats to be investigated for the presence of FBoV and 85 cats for CPPV-1. The kittens were separated into two groups: Group 1 (G1), which consisted of diarrheal kittens from different origins, sampled at domiciles, veterinary hospitals or clinics; and Group 2 (G2), which consisted of diarrheic group-housed kittens or from the same shelters. Fecal samples were collected using rectal swabs or flexible urethral catheters for rectal samples. Subsequently the clarification and extraction of DNA from the samples were performed. The extraction product was subjected to PCR targeting the bacterial 16S rRNA gene and the NP1 gene region for the FBoV screening, and to qPCR targeting the VP2 gene region for CPPV-1 detection. FBoV was detected in 17,8% (13/73), 12,8% (5/39) of the cats belonging to G1 and 23,5% (8/34) to G2. Seven samples of the 13 were sequenced, 42,8% (3/7) were classified as FBoV-1, 28,5% (2/7) as FBoV-2 and 28,5% (2/7) as FBoV-1 and FBoV-3 simultaneously. Positive samples were submitted to complete sequencing of the variant VP2 gene to determine the CPPV-1 and to the partial sequencing of the NS1 gene for FBoV genotyping. As a result, two samples were negative in the internal control, one in each group. CPPV-1 was detected in 43,4% (36/83) samples, with 40,9% (18/44) of the cats belonging to G1

and 46,1% (18/39) to G2. Four CPPV-1-positive samples and one FPV vaccine were sequenced, three of the samples were classified as feline parvovirus and one as canine parvovirus. This study provides data on the occurrence of FBoV and CPPV-1 in kittens with diarrhea. It highlighted the presence of feline and canine variants of CPPV-1, in addition to the first molecular evidence of the presence of FBoV in cats in Brazil, with proof of the circulation of the three known species (FBoV-1, 2 and 3).

Key-words: *Parvoviridae*; emerging parvovirus; reemerging parvovirus; enteric diseases; *Carnivore protoparvovirus-1*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Comparação do capsídeo de membros da subfamília <i>Parvovirinae</i> . Superfície com indicação de profundidade radial em Ångström. Representação do capsídeo do parvovírus humano B19 (<i>Eritroparvovirus</i>), parvovirus bovino (<i>Bocaparvovirus</i>), adenovírus-associado tipo 2 (AAV2; <i>Dependoparvovirus</i>), vírus da doença aleutiana do visão (AMDV; <i>Amdoparvovirus</i>) e vírus minuto do camundongo (MVM; <i>Protoparvovirus</i>).....	21
Figura 2. Organização do genoma de diferentes espécies de bocavírus.....	22
Figura 3. Diagrama esquemático da organização do genoma parvovírus canino com representação do DNA genômico e das proteínas estruturais e não estruturais.....	24
Figura 4. Processo da evolução das variantes antigênicas do FPLV, baseado nas proteínas do capsídeo viral (VP2).....	33
Figura 5. Diagrama da patogenia da infecção pelo CPPV-1.....	37

CAPÍTULO 2

Figura 1. Geographical location of the states of Brazil in which the study was conducted; Minas Gerais (MG) is highlighted in green, and São Paulo (SP) is highlighted in red.....	56
Figura 2. Phylogenetic tree based on the partial NS1 gene of feline bocavirus. The evolutionary history of the nucleotide sequences (615 nt) was inferred by using the maximum likelihood method and the Tamura-Nei model with 1,000 bootstrap replicates using MEGA 11 software. The percentage of >50% in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The scale represents the number of substitutions per site. The strains obtained in this study are highlighted in bold. FBoV-1, feline bocavirus 1; FBoV-2, feline bocavirus 2; FBoV-3, feline bocavirus 3.....	64

CAPÍTULO 3

Figura 1. Árvore filogenética baseada no gene VP2 completo de <i>Carnivore protoparvovirus-1</i> (CPPV-1). Árvore filogenética de nucleotídeos (1.755 nt) inferida utilizando o método <i>Maximum Likelihood</i> e o modelo Tamura 3-parâmetros com 1.000 réplicas de <i>bootstrap</i> usando o <i>software</i> MEGA11. A	
--	--

porcentagem superior a 50% em que os táxons se agrupam é mostrada ao lado dos nós. A escala representa o número de substituições por região. Sequências de referências e de vacinas já sequenciadas e disponíveis no GenBank foram utilizadas para a construção da árvore. Bem como a vacina sequenciada e as variantes obtidas neste estudo, que estão destacadas em **negrito**.....

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Espécies membros do gênero <i>Bocaparvovirus</i> descritas em hospedeiros animais.....	24
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1. Description of the primers used in this study.....	58
Table 2. Occurrence of FBoV in diarrheic kittens from Group 1 (diarrheic kittens from different origins) and Group 2 (diarrheic kittens from shelters or siblings) of this study.....	60
Table 3. Summary of relevant clinical-epidemiological information of FBoV-positive diarrheic kittens.....	62
Table 4. Summary of relevant clinical-epidemiological information of the diarrheic kittens and data analyses from the different groups.....	72

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados para detecção e sequenciamento do <i>Carnivore protoparvovirus-1</i> (CPPV-1) e para controle interno.....	82
Tabela 2. Ocorrência de <i>Carnivore protoparvovirus-1</i> em gatos filhotes com diarreia pertencentes ao G1 (filhotes com diarreia com diferentes origens) e ao G2 (filhotes da mesma ninhada ou provenientes de abrigos) e dados de coinfeção com bocavírus felino deste estudo.....	86
Tabela 3. Ocorrência de <i>Carnivore protoparvovirus-1</i> e correlação às variáveis (idade, sexo, acesso à rua e vacinação) e apresentação do número médio de contactantes caninos e felinos de cada grupo.....	87
Tabela 4. Resumo de informações clínico-epidemiológicas relevantes sobre os animais positivos para o sequenciamento genético de <i>Carnivore protoparvovirus-1</i>	90
Tabela 5. Diferenças nos resíduos de aminoácidos da proteína do capsídeo VP2 do protoparvovírus dos carnívoros (CPPV-1) e de vacinas disponíveis no mercado brasileiro em comparação às sequências encontradas no presente estudo.....	104

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Família <i>Parvoviridae</i>	20
3.2 Bocavírus felino.....	24
3.3 Vírus da panleucopenia felina.....	31
4 REFERÊNCIAS.....	39

CAPÍTULO 2 - Artigo I

Abstract.....	54
Introduction.....	55
Materials and methods.....	56
Results.....	60
Discussion.....	65
Conclusion.....	67
References.....	69
Supplementary Material.....	72

CAPÍTULO 1 - Artigo II

Resumo.....	76
Introdução.....	78
Materiais e Métodos.....	80
Resultados.....	85
Discussão.....	90
Conclusão.....	95
Referências.....	96
Material Suplementar.....	104

ANEXOS

Anexos 1 - Normas: Journal of feline medicine and surgery.....	105
Anexos 2 - Comitê de Ética.....	124

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Os membros da família *Parvoviridae* são vírus DNA de fita simples linear, não envelopados. A subfamília *Parvovirinae* é composta por oito gêneros: *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Eritroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus* e *Copiparvovirus* (COTMORE et al., 2019). Os gêneros *Bocaparvovirus* e o *Protoparvovirus* possuem espécies de vírus capazes de infectar gatos, dentre estas o bocavírus felino 1 (FBoV-1, *Carnivore bocavirus 3*), o bocavírus felino 2 (FBoV-2, *Carnivore bocaparvovirus 4*) e o bocavírus felino 3 (FBoV-3, *Carnivore bocaparvovirus 5*) e o protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1, *Carnivore protoparvovirus 1*) (COTMORE et al., 2019; DIAKOUDI et al., 2019).

O bocavírus felino é um parvovirus emergente, detectado pela primeira vez em gatos sem manifestações clínicas, em 2012, na China (LAU et al., 2012). Porém novos estudos apontam que o vírus pode causar enterites em gatos domésticos (LIU et al., 2018; PIEWBANG et al., 2019; CAPOZZA et al., 2021).

O protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1, *Carnivore protoparvovirus 1*) abrange o parvovírus felino (FPV, *Feline parvovirus*) ou vírus da panleucopenia felina (FPLV, *Feline panleukopenia virus*) e o parvovírus canino (CPV, *Canine parvovirus*) (COTMORE et al., 2013; 2019). O CPV é uma variante do FPV que emergiu, após a passagem em um hospedeiro carnívoro selvagem, ao adquirir a capacidade de replicação em cães domésticos, causando uma doença fatal em cães com sinais clínicos similares aos observados na infecção pelo FPV em gatos (PARRISH, 1990; BARRS, 2019). O CPV foi posteriormente substituído por novas variantes genéticas (CPV-2a, 2b e 2c) devido à sua alta capacidade de mutação. As modificações

provenientes das mutações, proporcionaram ao vírus, a recuperação da capacidade de infectar felinos (IKEDA et al., 2000; HOELZER & PARRISH, 2010).

A reemergência do vírus da panleucopenia felina e a evidência da ocorrência de surtos, deve ser um alerta para responsáveis de gatos e médicos veterinários do mundo (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019). Visto que a panleucopenia felina, causada pela infecção em gatos por FPV, é altamente infecciosa, além de frequentemente fatal para gatos filhotes não vacinados, devido a enterite grave, desidratação e depleção linfóide (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019).

A panleucopenia felina é uma síndrome clínica causada pela infecção pelo CPPV-1 (FPV ou CPV), sendo que o CPV raramente acomete gatos. Os principais sinais clínicos são diarreia, letargia, vômito, anorexia, perda de peso e morte súbita (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019; CAPOZZA et al., 2021).

Além disso, o sinergismo entre o bocavírus felino e o parvovírus felino é relatado em surto de enterite hemorrágica em gatos de abrigo, onde 17 animais foram acometidos e em 13 a doença foi fatal. Três gatos foram necropsiados e foi observada, por meio de análises imunohistoquímicas, a presença de ambos os vírus nas criptas intestinais (PIEWBANG et al., 2019).

A alta resistência dos parvovírus ao ambiente contribui para a manutenção viral e transmissão do agente (TRUYEN et al., 2009; BARRS, 2019). Principalmente em gatos provenientes de abrigos, em que o grande número de animais facilita a transmissão direta e a presença do ambiente contaminado favorece a transmissão indireta (VAN BRUSSEL et al., 2019; CAPOZZA et al., 2021).

O diagnóstico da panleucopenia felina era infrequente devido à vacinação (BARRS, 2019), porém, foi considerada uma doença reemergente devidos a surtos descritos na última década na Austrália, Nova Zelândia, Emirados Árabes Unidos (VAN BRUSSEL et al., 2019), China (NIU et al., 2018; LIU et al., 2020; TANG et al., 2022), Índia (KARANAM et al., 2022) e Alemanha (REHME et al., 2022). Também foram reportados novos surtos na Índia em 2020, Austrália em 2021, África do Sul e quatro surtos distintos nos Estados Unidos em 2022 por meio da Sociedade Internacional para Doenças Infeciosas (*International Society for Infectious Diseases*, PROMED, 2022).

A prevenção através do manejo ambiental é imprescindível, inclui o isolamento do animal infectado, além da limpeza diária das caixas de areia (TRUYEN et al., 2009) e do ambiente com posterior desinfecção com hipoclorito de sódio 0,37% por 15 minutos (CAVALLI et al., 2018). Em casos de abrigos de gatos, é sugerido o isolamento do animal positivo por no mínimo 14 dias (JANKE et al., 2022).

Ainda não há vacina disponível para prevenção da infecção pelo bocavírus felino, mas há contra o vírus da panleucopenia felina, um dos potenciais vírus capazes de coinfetar o animal e causar manifestações clínicas no gato (VAN BRUSSEL et al., 2022). Considerada uma vacina essencial, a imunização dos filhotes contra o vírus da panleucopenia felina deve ser realizada a partir da sexta semana de idade. Devem ser realizadas novas doses com intervalos de duas a três semanas contados a partir da primeira dose, até a décima sexta semana de idade do animal e aos seis meses (STONE et al., 2020; DAY et al., 2020).

Há diversas evidências de parvovírus emergentes e reemergentes causando doenças em gatos, da ocorrência do bocavírus felino e de alertas de surtos de

panleucopenia felina no mundo (VAN BRUSSEL et al., 2019; PIEWBANG et al., 2019; LI et al., 2020), além de um relato da ocorrência do FPV no Brasil (MÓSENA et al., 2019). Porém, o bocavírus felino, recém classificado como potencial causador de enteropatias em gatos (PIEWBANG et al., 2019), ainda não foi pesquisado no Brasil e pouco se conhece sobre sua diversidade gênica e de FPV no país. Dessa forma, o estudo da ocorrência e a análise gênica desses patógenos em gatos domésticos é de grande relevância epidemiológica e clínica.

2 OBJETIVO

Investigar a ocorrência e realizar a caracterização gênica do bocavírus felino (FBoV) e do protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1) em amostras de gatos filhotes com diarreia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família *Parvoviridae*

Os membros da família *Parvoviridae* são pequenos (23-28 nm de diâmetro) vírus DNA de fita simples linear, não envelopados, com aproximadamente 5.1kb nucleotídeos. São distribuídos em 3 subfamílias: *Parvovirinae* (Figura 1), *Hamaparvovirinae* e *Densovirinae*. A subfamília *Parvovirinae* é composta por oito gêneros: *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Eritroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus* e *Copiparvovirus*, contendo diversas espécies capazes de infectar diversos vertebrados, como aves, répteis e mamíferos (COTMORE et al., 2019). Os gêneros *Protoparvovirus* e *Bocaparvovirus* possuem espécies virais capazes de infectar gatos, como os parvovírus felino e canino e os bocavírus felinos 1, 2 e 3 (DIAKOUDI et al., 2019).

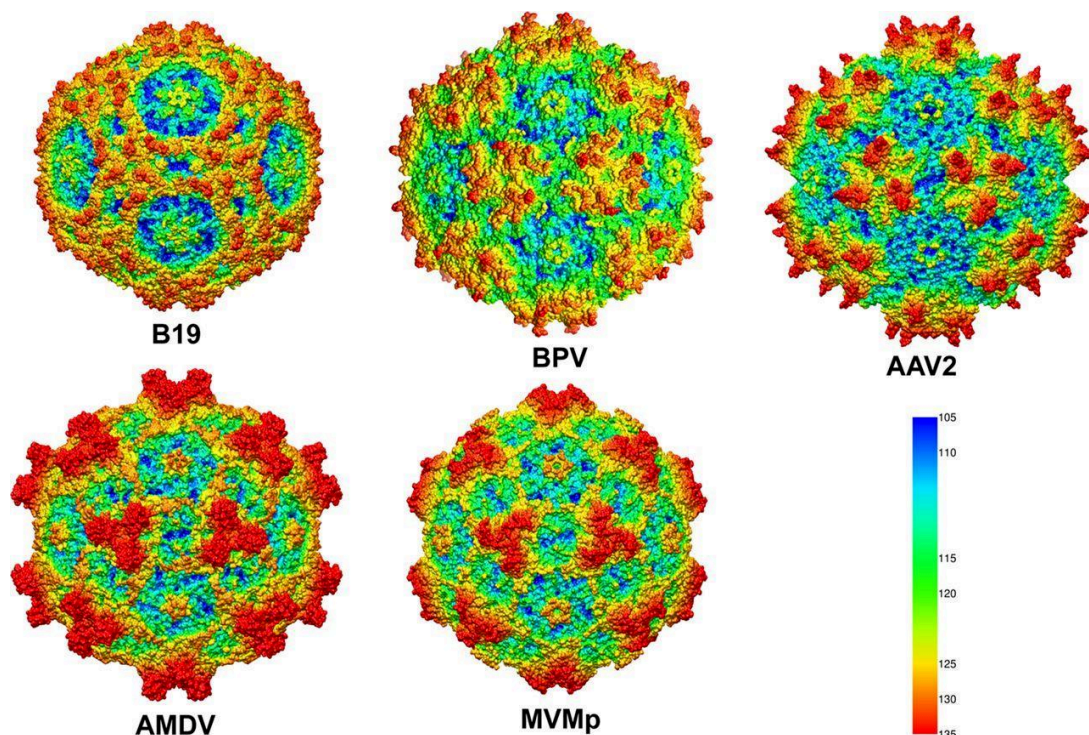


Figura 1. Comparação do capsídeo de membros da subfamília *Parvovirinae*. Superfície com indicação de profundidade radial em Ångström. Representação do capsídeo do parvovírus humano B19 (*Eritroparvovirus*), parvovírus bovino (*Bocaparvovirus*), adenovírus-associado tipo 2 (AAV2; *Dependoparvovírus*), vírus da doença aleutiana do visão (AMDV; *Amdoparvovirus*) e vírus minuto do camundongo (MVM; *Protoparvovirus*). Fonte: Kailasan et al., 2015.

O gênero *Bocaparvovirus* é composto por 26 espécies, dentre estas, os bocaparvovírus carnívoro 3, 4 e 5, também conhecidos como bocavírus felino 1, 2 e 3, respectivamente (COTMORE et al, 2019). O genoma consiste em três ORFs (ORF1, ORF2 e ORF3) que codificam a proteína não estrutural (NS1), proteínas de capsídeo viral (VP1 e VP2) e fosfoproteína nuclear (NP1), respectivamente. Os vírus desse gênero compartilham mais do que 30% da identidade de aminoácidos do gene NS1, o qual é utilizado para diferenciar as espécies de bocavírus (CHEN et al., 1986; COTMORE et al., 2019). A proteína NP1 é uma proteína auxiliar codificada próxima ao centro do genoma, parcialmente sobreposta ao terminal C da NS1, mas em uma

ORF diferente (Figura 2), ambas são necessárias no processo de replicação (CHEN et al., 1986; SHEN et al., 2015).

Para sua replicação, os bocavírus utilizam um promotor transcricional (RNA polimerase II) para gerar um pré-mRNA, que sofrerá *splicing* alternativo além de poliadenilação em diferentes posições para formar o mRNA (ZHAO et al., 1994; QIU et al., 2004; FASINA et al., 2017).

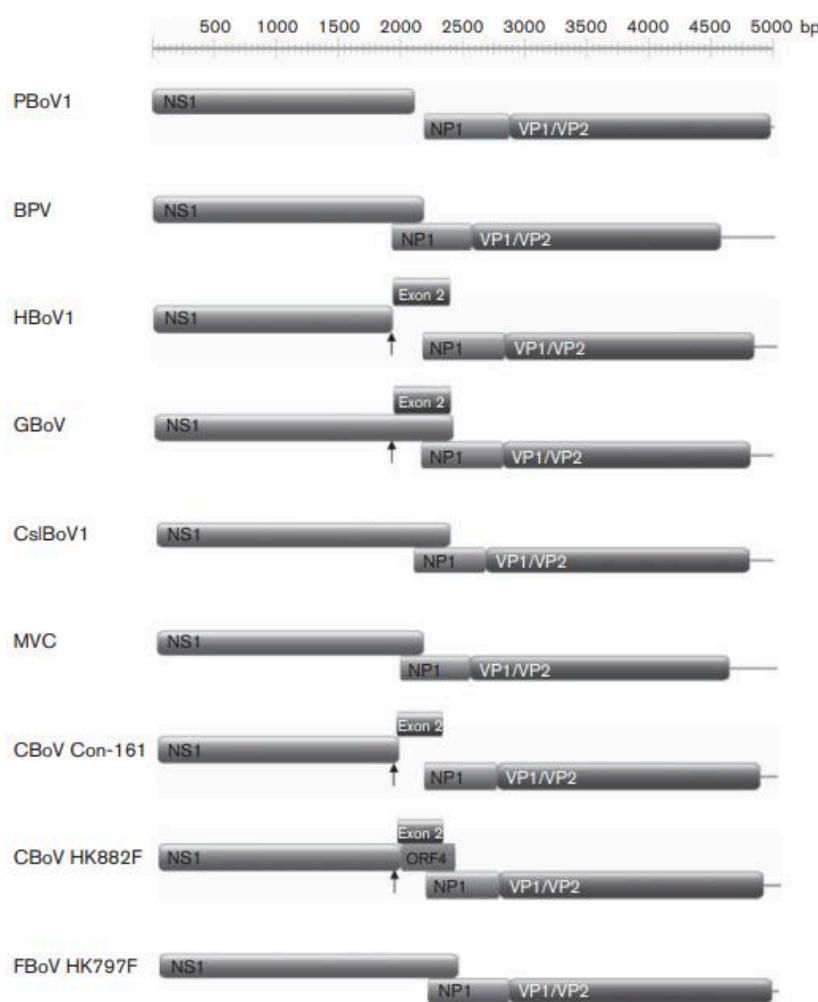


Figura 2. Organização do genoma de diferentes espécies de bocavírus. Fonte: Lau et al. (2012).

O gênero *Protoparvovirus* é composto por 15 espécies, dentre estas, o protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1, *Carnivore protoparvovirus 1*) que inclui o

parvovírus felino (FPV, *Feline parvovirus*) ou também denominado de vírus da panleucopenia felina (FPLV, *Feline panleukopenia virus*); o parvovírus canino (CPV-2, *Canine parvovirus 2*); o vírus da enterite do visão (MEV, *Mink enteritis virus*) e o parvovírus do guaxinim (RPV, *Raccoon parvovirus*) (COTMORE et al., 2013). O genoma é composto de duas regiões de leitura aberta (*open reading frames*, ORFs). A ORF1 codifica duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2), enquanto a ORF2 codifica três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) (Figura 3) (COTMORE et al., 2019).

A NS1 e a NS2 são produtos da tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) que sofrem *splicing* alternativo. Ambas estão associadas com a replicação viral, empacotamento do DNA e com a citotoxicidade (REED et al., 1988; MIRA et al., 2019). Assim como as proteínas anteriores, a VP1 e VP2 também são produtos da tradução do mesmo mRNA e fazem parte da estrutura do capsídeo (REED et al., 1988). A VP2 está relacionada às rápidas taxas de evolução do FPLV e CPV e sua capacidade de interação com os receptores celulares, definindo assim o tropismo tecidual e a variedade de hospedeiros suscetíveis (HUEFFER et al., 2003), e devido a isso, constituem-se como foco dos estudos epidemiológicos para determinação das variantes virais. A proteína VP3 é uma proteína separada da VP2 pela ação da enzima protease do hospedeiro que é composta por uma sequência de aproximadamente 19 aminoácidos da região amino-terminal da VP2 (NELSON et al., 2008).

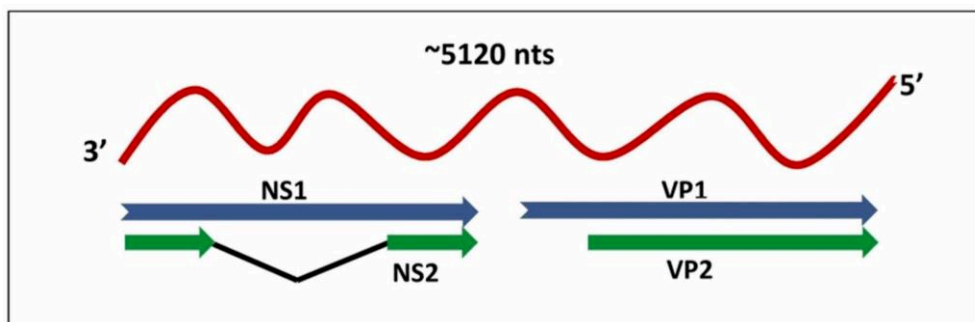


Figura 3. Diagrama esquemático da organização do genoma parvovírus canino com representação do DNA genômico e das proteínas estruturais e não estruturais. Fonte: Tuteja et al. (2022).

3.2 Bocavírus felino

O nome bocavírus foi dado de acordo com as primeiras espécies em que esse foi reportado, parvovírus **bo**vino 1 (BPV1, *Ungulate bocaparvovirus 1*) (SPAHN et al., 1966) e o vírus minuto **ca**nino (MVC, *Carnivore bocaparvovirus 1*) (BINN et al., 1970). Posteriormente, muitos bocavírus foram descobertos ao longo dos anos, acometendo diferentes espécies (Tabela 1).

Para classificação de novas espécies bocavírus é necessário que vírus apresente menos do que 85% de identidade de aminoácidos na proteína NS1, de acordo as diretrizes do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV, 2022).

O bocavírus felino (FBoV-1, *Carnivore bocavirus 3*) foi inicialmente reportado em Hong Kong (China) em 2012, em amostras de fezes 7,2% (26/363), urina 1,6% (6/364), sangue 0,8% (3/361), swab nasal 0,3% (1/364) e fragmentos de rim 2% (1/51) de gatos sem sinais clínicos (LAU et al., 2012).

Tabela 1. Espécies membros do gênero *Bocaparvovirus* descritas em hospedeiros animais.

Espécie viral	Hospedeiros	Referências
<i>Primate bocaparvovirus 1 e 2</i>	Humana	Allander et al., 2005 e Kapoor et al., 2009
<i>Primate bocaparvovirus 3</i>	Primatas não humanos	AO & Duan, 2020
<i>Pinniped bocaparvovirus 1 e 2</i>	Leões-marinhos-da-califórnia	LI et al., 2011
<i>Chiropteran bocaparvovirus 1-6</i>	Morcegos	Wu et al., 2012; HE et al., 2013; Lau et al., 2016 e 2017
<i>Logomorph bocaparvovirus 1</i>	Coelhos	Lanave et al., 2015
<i>Rodent bocaparvovirus 1 e 2</i>	Roedores	Lau et al., 2017 e Williams et al., 2018
<i>Ungulate bocaparvovirus 1-9</i>	Ungulados	Spahn et al., 1966; Cheng et al., 2010; Zeng et al., 2011; Shan et al., 2011; Lau et al., 2011; Mitra et al., 2016; Woo et al., 2017 e Kumar et al., 2019
<i>Carnivore bocaparvovirus 1-2</i>	Cães domésticos	Binn et al., 1970; Kapoor et al., 2012
<i>Carnivore bocaparvovirus 3-5</i> (Bocavírus felino 1-3)	<u>Gatos domésticos</u>	Lau et al., 2012; Ng et al., 2014 e Zhang et al., 2014
<i>Carnivore bocaparvovirus 6</i>	Mustelídeos	Yang et al., 2016

Em 2014, em Portugal, em uma avaliação metagenômica viral de amostra de fezes de um gato saudável foi detectado uma nova espécie de bocavírus, o bocavírus felino 2 (FBoV-2, *Carnivore bocaparvovirus 4*) (NG et al., 2014). No mesmo ano, foi reportado o bocavírus felino 3 (FBoV-3, *Carnivore bocaparvovirus 5*) resultante também de metagenômica viral de fezes de 25 gatos provenientes de um abrigo da Califórnia (EUA), nesse estudo, o bocavírus felino foi detectado em 8% (2/25), uma FBoV-1 e outra FBoV-3 positiva (ZHANG et al., 2014). As sequências do gene NS1 de FBoV-2 apresentaram 58% de identidade de aminoácidos comparado ao FBoV-1, enquanto o FBoV-3 apresentou 68% (NG et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

A transmissão do bocavírus felino não é particularmente elucidada, porém, assim como outros membros da família *Parvoviridae*, são vírus não envelopados, bastante resistentes no ambiente, presentes predominantemente em amostras de fezes (LAU et al., 2012; ADDIE et al., 2015), transmitidos direta ou indiretamente por contato com as fezes ou fômites contaminados, respectivamente (LAMM & REZABEK, 2008; ADDIE et al., 2015; DI MARTINO et al., 2019). Não obstante, o bocavírus felino já foi detectado também em amostras de swab nasofaríngeo de gatos saudáveis (ABAYLI et al., 2021), assim como o bocavírus humano (ALLANDER et al., 2005) e o canino (KAPOOR et al., 2012), aumentando o espectro de possibilidades de transmissão.

Os bocavírus são associados a sinais clínicos gastroentéricos e respiratórios em diferentes espécies (ALLANDER et al., 2005; KAPOOR et al., 2009; KAPOOR et al., 2012). Apesar de que o bocavírus felino foi inicialmente relatado em gatos sem manifestações clínicas (LAU et al., 2012), estudos mais recentes evidenciam o diagnóstico em gatos com diarreia (TAKANO et al., 2016; LIU et al., 2018; YI et al., 2018; PIEWBANG et al., 2019).

No Japão, foram selecionados 101 gatos para diagnóstico de bocavírus felino por PCR, swabs retais de 48 gatos sem sinais clínicos e de 53 gatos com diarreia foram coletados entre os anos de 2012 e 2015. As amostras foram testadas para as três espécies de bocavírus, porém apenas FBoV-2 foi identificado em 9,9% (10/101) das amostras. Seis dos dez animais positivos eram filhotes com diarreia (TAKANO et al., 2016).

Na China, 197 gatos foram testados para FBoV por PCR entre 2016 e 2017, 105 apresentaram manifestação clínica de diarreia e 92 não. Um total de 25,9%

(51/197) das amostras foi positivo, destes, 33,3% (35/105) foram de gatos com diarreia e 17,4% (16/92) sem diarreia. As amostras positivas foram sequenciadas e foi observada a presença das espécies FBoV-1, FBoV-2 e a coinfeção entre essas também foi evidente (YI et al., 2018). Ambos os trabalhos demonstraram, portanto, uma maior ocorrência do vírus em gatos com manifestação clínica de diarreia.

LIU et al. (2018) relataram a presença do FBoV em amostra de um gato de três meses de idade com enterite severa. Piewbang et al. (2019) corroboram e associam a presença de FBoV-1 com surto de enterite hemorrágica em três diferentes abrigos de gatos na Tailândia em que estava presente o vírus da panleucopenia felina. Nesses abrigos, 17 gatos apresentavam gastroenterite e em 13 a doença foi fatal. Inicialmente, atribuiu-se a causa para o vírus da panleucopenia felina, porém durante a busca por outros patógenos causadores da doença, foi identificada a presença de FBoV-1. Foram realizadas avaliações *post-mortem* de três gatos (um de cada abrigo), todos gatos necropsiados apresentaram hemorragias em cérebro, pulmão, fígado, trato intestinal e linfonodos, em um deles foi observada enterite hemorrágica severa com massiva linfadenopatia hemorrágica. Através de análises de imunohistoquímica, a presença de antígenos de ambos os vírus foi observada nas criptas intestinais dos três gatos, dando suporte ao diagnóstico de enterite viral. No entanto, o antígeno do vírus da panleucopenia felina foi detectado em baixos níveis no tecido linfoide mesentérico, enquanto os antígenos do FBoV-1 foram detectados em larga escala, especialmente em áreas com necrose de córtex e medula dos linfonodos. Portanto, evidenciou-se o possível sinergismo entre os vírus. Além dos linfonodos e intestinos, não foram detectados sinais dos antígenos nos outros tecidos examinados.

Em um surto de diarreia em gatos no Canadá, foram testadas 5 amostras e identificada a presença de alguns patógenos como poliomavírus lyoniARC (LIPyV),

vírus da panleucopenia felina e FBoV-3, esse último presente em amostras sem coinfeção pelos outros vírus (FAHSBENDER et al., 2019).

Li et al. (2020) reportaram um surto de diarreia e vômito em gatos de abrigos no Canadá, entre o final de 2018 e início de 2019. A ocorrência do surto foi atribuída devido à presença de um novo vírus do gênero *Chamaparvovirus* (pertencente à família *Parvoviridae*), então nomeado fechavírus, e ao FBoV. O fechavírus estava presente em 47% (8/17) das amostras testadas, enquanto o FBoV estava em 52,9% (9/17), além de identificada a presença das três diferentes espécies de bocavírus felino (FBoV-1, 2 e 3), apenas uma amostra foi negativa para fechavírus e bocavírus felino e uma amostra apresentou coinfeção entre fechavírus e FBoV-3.

Em 2019 na China, Wang et al.^a (2021) padronizaram a reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) baseada em SYBR Green para detecção do bocavírus. Dentre as amostras de fezes avaliadas, 7% (9/128) foram positivas para FBoV-1, sendo todas de amostras de gatos diarreicos (n=88) e nenhuma positiva em animais não diarreicos (n=40). Posteriormente, Wang et al.^b (2021), realizaram um estudo com amostras coletadas por swab retal (n=55) provenientes de diferentes províncias da China, sendo 35 amostras de gatos com diarreia e 20 amostras sem. Um total de 9,09% (5/55) amostras foi positivo para FBoV, quatro dessas amostras pertenciam a gatos com diarreia. Foi determinado por sequenciamento de Sanger que duas amostras eram FBoV-1, uma FBoV-2 e duas FBoV-3, sugerindo a grande diversidade de espécies de FBoVs presentes na China.

Na Turquia, em 2020, foi realizada uma pesquisa de FBoV em 70 gatos saudáveis, de um mês a cinco anos de idade, com amostras de swab nasofaríngeo procedente de três clínicas (n=23) e dois abrigos (n=43) de duas províncias

diferentes. Um total de 8,5% (6/70) foram positivos para FBoV, sendo todos identificados como FBoV-2 (ABAYLI et al., 2021).

Recentemente foi reportado um estudo na Austrália que avaliou o viroma entérico de gatos naturalmente infectados com vírus da panleucopenia felina (n=23) e animais controle (sem a infecção, n=36) por análises de metatranscriptoma de amostras de fezes coletadas em 2017. Os vírus mais abundantes entre os animais do grupo controle foram o coronavírus felino (72,2%, 26/36), bocavírus felino (52,7%, 19/36) e *Mamastrovírus 2* (50%, 18/36), com frequentes coinfeções entre os três. Enquanto nos animais infectados, os vírus mais abundantes foram *Mamastrovírus 2* (82,6%, 19/23), coronavírus felino (60,8%, 14/23) e bocavírus felino (47,8%, 11/23) (VAN BRUSSEL et al., 2022).

A infecção por FBoV-1 e 3 foi associada a alterações neurológicas. Nesse estudo, foram coletadas amostras de sistema nervoso central (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) de gatos de gatos sem alterações (n=41) e com déficits neurológicos (n=78), incluindo epilepsia, cegueira aguda, tremores musculares, *head tilt*, paralisia e convulsões, entre 2018 e 2021. As amostras foram testadas por PCR para coronavírus felino (FCoV), calicivírus felino (FCV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da panleucopenia felina (FPV), herpesvírus felino (FHV-1), vírus da raiva (RaBV) e bocavírus felino (FBoV). Um total de 6,4% (5/78) gatos com sinais neurológicos foi positivo para FBoV, quatro para FBoV-1 e um para FBoV-3. A presença viral foi detectada no cérebro e tronco encefálico de todos os animais e apenas uma das cinco amostras foi positiva no cerebelo. A idade dos animais positivos variou de dois meses a 12 anos de idade e não foram encontradas coinfeções no caso dos animais FBoV positivos. Na histologia do sistema nervoso, o achado mais frequente foi a vacuolização neuronal,

presente em quatro das cinco amostras, mas também foi observada encefalite, necrose neuronal e gliose. Foi confirmado por hibridização *in situ* a presença do material genético viral em oligodendrócitos e em neurônios vacuolizados (PIEWBANG et al., 2022).

O diagnóstico de FBoV é realizado por meio da PCR direcionada para a detecção de fragmento do gene NP1, região conservada nas diferentes espécies de bocavírus (LAU et al., 2012). Enquanto para o diagnóstico diferencial entre as espécies de FBoV (1, 2 e 3) é realizado pela PCR para o gene NS1 (YI et al., 2018; WANG et al.^b, 2021). Wang et al.^b (2021) desenvolveram uma qPCR baseada em SYBR Green para detecção exclusiva de FBoV-1 (NS1), obtendo uma sensibilidade para $3,87 \times 10^1$ cópias/ μ L como limite de detecção comparado à $3,87 \times 10^3$ cópias/ μ L da PCR convencional.

O tratamento é terapia de suporte, assim como para parvovirose felina, como reposição de fluidos, eletrólitos e correção do balanço ácido-base via intravenosa (TRUYEN et al., 2009).

Não há vacina disponível contra o bocavírus felino, portanto, a prevenção deve incluir o isolamento do animal e o manejo ambiental com limpeza diária das caixas de areia e do ambiente para remoção do material orgânico, bem como a desinfecção com hipoclorito de sódio para inativação do vírus, como é feito para outros vírus da mesma família (TRUYEN et al., 2009; CAVALLI et al., 2018). Além disso, deve-se considerar a frequência de relatos da coinfeção de animais com o bocavírus felino e o vírus da panleucopenia felina, outro potencial vírus causador de diarreia em gatos (PIEWBANG et al., 2019; VAN BRUSSEL et al., 2022). Dá-se assim a importância da imunização de filhotes de gatos contra o vírus da panleucopenia felina com o objetivo

de evitar o sinergismo entre os vírus e potenciais agravamentos das manifestações clínicas.

3.3 Vírus da panleucopenia felina

A panleucopenia felina é uma síndrome clínica causada pela infecção pelo CPPV-1, porém a infecção e a manifestação clínica pelo CPV em gatos é infrequente (COTMORE et al., 2013; 2019; BARRS, 2019).

O parvovírus felino (FPV) é um dos agentes virais mais antigos conhecidos como agentes etiológicos de doenças em gatos. No início do século XX, foram reportados diversos casos de enterites em gatos, com altas taxas de mortalidade que foram revisados em 1934 (LEASURE et al., 1934). Ocorreu um surto no zoológico de Londres em 1947, em que o FPV acometeu diferentes espécies de felinos selvagens (STEINEL et al., 2001). Além disso, foi observada a capacidade do FPV infectar alguns membros da ordem Caniformia, como guaxinins e raposas (TRUYEN et al., 2009; ALLISON et al., 2014), em cães, a replicação do vírus só foi observada no timo, não sendo observado no intestino ou excretando o vírus (TRUYEN et al., 2009). Apenas em 1964, foi isolado em cultura celular para o desenvolvimento de vacinas de vírus vivo modificado (MLV, *modified lived virus*) (POVEY, 1973). Assim, a panleucopenia felina se tornou uma doença de infrequente diagnóstico em gatos no Reino Unido, Austrália, Nova Zelândia e Estados Unidos à medida que a vacinação se tornava popular (BARRS, 2019). A panleucopenia felina atualmente é considerada uma doença reemergente, devido à surtos reportados pelo mundo (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019).

Na década de 70, o CPV-2 emergiu do FPV ao adquirir a capacidade de replicação em cães domésticos, após a passagem em um hospedeiro carnívoro

selvagem, causando uma pandemia em cães (PARRISH, 1990; BARRS, 2019). O CPV-2 diferiu do FPV por seis resíduos de aminoácidos na região VP2 (Figura 4), que foi determinante para a ligação do vírus ao receptor canino e sua habilidade de infectar o hospedeiro (PARRISH, 1990; MIRANDA & THOMPSON, 2016).

Em 1979, surgiu uma variante antigênica (2a) do CPV-2, que substituiu o original em circulação, diferindo em cinco nucleotídeos em VP2 e recuperando a habilidade de ligação aos receptores de felinos, podendo assim, infectar ambos (APPEL et al., 1979; MIRANDA & THOMPSON, 2016). Logo, uma segunda variante antigênica (2b), que difere em dois aminoácidos em VP2 do CPV-2a, foi detectada nos Estados Unidos, em 1984 (PARRISH et al., 1991; MIRANDA & THOMPSON, 2016). Em 2001 surgiu uma nova variante (CPV-2c), identificada em cães na Itália (BUONAVOGLIA et al., 2001). As variantes de CPV-2 circulam em diferentes proporções ao redor do mundo, sendo que as três são capazes de infectar gatos, porém em menor proporção (BARRS, 2019).

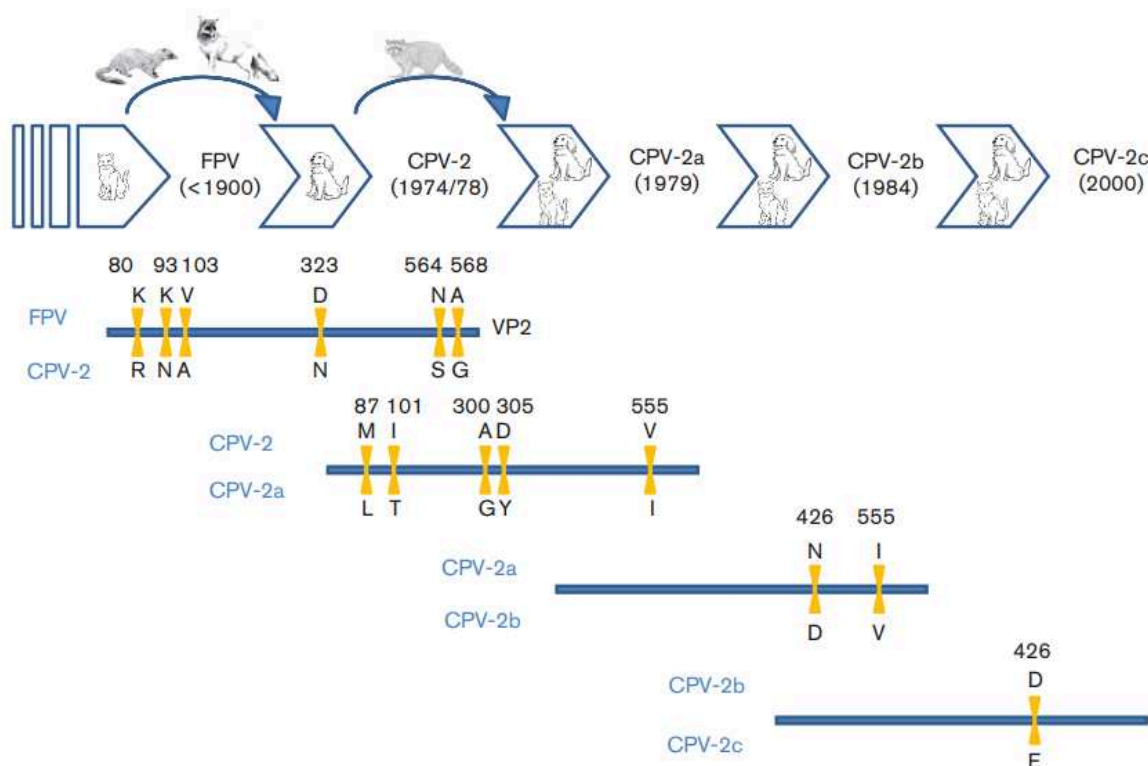


Figura 4. Processo da evolução das variantes antigênicas do FPLV, baseado nas proteínas do capsídeo viral (VP2). Fonte: MIRANDA & THOMPSON (2016).

O CPPV-1 é excretado na saliva, urina, fezes e vômitos, e a principal via de infecção é fecal-oral. A alta resistência dos vírions no ambiente favorece a transmissão do agente, seja por contato direto do gato com fezes de animais infectados, seja por contato indireto do gato com ambientes contaminados. A excreção do vírus nas fezes pode ocorrer em infecções subclínicas ou antes dos sinais clínicos se manifestarem e até seis semanas após a infecção (TRUYEN et al., 2009; BARRS, 2019). Além disso, ambientes com grandes populações de animais por área, como abrigos, aliados à susceptibilidade do hospedeiro como animais jovens e não vacinados são fatores que também favorecem a infecção e propagação do vírus (PESAVENTO & MURPHY et al., 2014; BARRS, 2019).

Na Austrália, entre 2014 e 2018, foram relatados surtos de panleucopenia felina que acometeram um total de 610 gatos. O estudo tinha como critério de inclusão animais com sinais clínicos compatíveis com panleucopenia felina, positivos em testes antigênicos (antígeno de CPV em amostras de fezes) ou PCR de fezes, ou animais com sinais clínicos de abrigos histórico de panleucopenia felina. Do total de animais, 87% pertenciam a abrigos, 12% de hospitais e clínicas veterinárias e 1% correspondia a animais resgatados. Adicionalmente, 87% dos gatos não eram vacinados ou não tinham histórico de vacinação. Além disso, 79% dos animais vacinados não receberam a última dose após 16 semanas de idade. Dos 399 gatos em que se obteve dados sobre idade, observou-se que 84% eram filhotes (até um ano de idade) e 73% tinham até 18 semanas de idade, ou seja, um pouco mais de quatro meses (VAN BRUSSEL et al., 2019).

No mesmo estudo também foram relatados dois surtos que ocorreram na Nova Zelândia, acometendo 365 gatos. O primeiro ocorreu em 2016 e o segundo em 2018, a maioria dos animais (90%) não foi vacinado ou recebeu apenas uma dose da vacina. Nos Emirados Árabes Unidos, 14 gatos receberam o diagnóstico de panleucopenia felina em 2017, destes, apenas um era vacinado (VAN BRUSSEL et al., 2019).

Na China, entre 2016 e 2017, 143 gatos filhotes de um a seis meses de idade, 87 com diarreia e 56 sem manifestações clínicas foram avaliados para FPV por meio da PCR. Os animais eram provenientes de abrigos e clínicas veterinárias e 36,46% (55/143) das amostras de fezes foram positivas, com maior ocorrência em animais com diarreia (55,17%; 48/87) quando comparados aos sem diarreia (12,5%; 7/56). Além disso, animais não vacinados também apresentaram maior ocorrência (NIU et al., 2018). Em análises da ocorrência de vírus em gatos na China, em 16 cidades, observou-se 19,2% (255/1.326) animais positivos para FPV, o critério de inclusão era

apenas de animais doentes, sem especificação da manifestação clínica (LIU et al., 2020). Mais recentemente, 8,5% (60/702) gatos testaram positivos na PCR de fezes para parvovírus. Para o estudo foram avaliados gatos saudáveis e doentes, os sinais clínicos apresentados foram depressão, febre, desidratação, vômito e diarreia. Foi realizado também o sequenciamento do gene VP2 e 55 amostras foram identificadas como FPV, uma como CPV-2b e quatro CPV-2c (TANG et al., 2022).

No sul da Índia foi realizado um estudo com 77 amostras de fezes ou swab retal de gatos saudáveis (n=67) e também de gatos com suspeita de FPV/CPV (n=10) provenientes de abrigos, centros de adoção ou hospitais veterinários, entre 2019 e 2020, diagnosticados por meio de PCR. Um total de 42,86% (33/77) amostras foram positivas. Seis destas amostras foram selecionadas randomicamente, três de gatos pertencentes à abrigos e três de gatos domiciliados, todos aparentemente saudáveis e com menos de um ano de idade, para obtenção do sequenciamento do gene VP2. Cinco sequências tinham características de FPV, enquanto a outra de CPV-2a e de FPV (KARANAM et al., 2022).

Com o objetivo de determinar fatores de risco para surtos de panleucopenia em abrigos, foi realizada a PCR em tempo real (qPCR) de amostras de fezes de 150 gatos de quatro abrigos, em 2020 na Alemanha. Foi observada a panleucopenia felina em 28% (42/150) dos animais e a presença do vírus em 48,7% (73/150) das amostras. De quatro abrigos de onde os animais eram provenientes, o surto não estava presente em apenas um deles. A presença do vírus foi significativamente maior em gatos não vacinados e gatos jovens (de quatro semanas a dois anos de idade) com média de dois meses e meio. Além disso, gatos com panleucopenia felina e gatos jovens (com menos de dois anos de idade) eram significativamente mais propensos a excretar o vírus (REHME et al., 2022).

O CPPV-1 se liga a receptores de transferrina tipo-1 (TfR) expresso em diversos tecidos. Os vírions adentram a célula via endocitose, o DNA viral é liberado do capsídeo e é transportado do citosol para o núcleo. No núcleo, o DNA de fita simples (dsDNA) utiliza a polimerase de DNA do hospedeiro para que ocorra a replicação, onde ele será transcrito em mRNA e, posteriormente, traduzido. Após a liberação do vírion produzido, ocorre a lise e morte celular (PARKER et al., 2001; HUEFFER et al., 2004). Considerando que o CPPV-1 se replica em células em divisão (fase S), possui tropismo para células de alta atividade mitótica, como tecidos linfoides, medula óssea, células das criptas intestinais e cerebelo (em neonatos) (BARRS, 2019; CAPOZZA et al., 2021).

A replicação do vírus tem início no tecido linfoide da região orofaringe até um dia após a infecção, atinge a corrente sanguínea após dois a sete dias e é distribuído para os outros tecidos a partir disso (Figura 5) (TRUYEN et al., 2009; BARRS, 2019). A manifestação clínica pode ocorrer de dois a dez dias de incubação, sendo que os sinais clínicos mais frequentes são a diarreia, letargia, vômito, anorexia, perda de peso e morte súbita. A morte súbita está relacionada à ocorrência de enterites graves, desidratação e depleção linfoide (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019). A linfopenia pode ocorrer devido à replicação direta do vírus à essas células, enquanto a depleção linfoide é causada devido a replicação viral em células progenitoras presentes na medula óssea (PARRISH, 1995; TRUYEN et al., 2009).

Gestantes infectadas podem transmitir o vírus ao feto através da infecção transplacentária, resultando na morte fetal ou nascimento do neonato com déficits neurológicos devido à replicação no cerebelo (TRUYEN et al., 2009; BARRS, 2019).

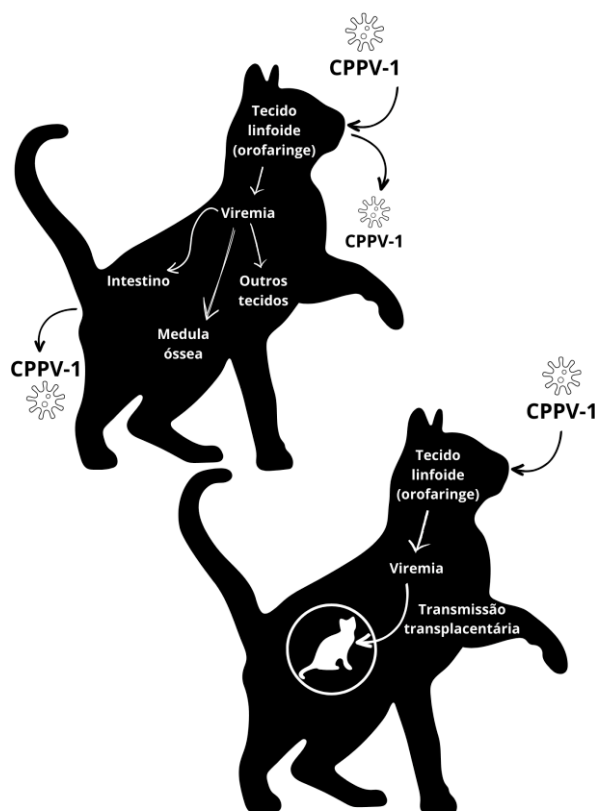


Figura 5. Diagrama da patogenia da infecção pelo CPPV-1.

O teste que avalia a presença de antígeno pode apresentar falsos negativos quando há a presença de anticorpos, devido a indisponibilização dos antígenos (TRUYEN et al., 2009). Falsos negativos também podem estar presentes em testes moleculares, devido à interferência de inibidores de PCR que podem estar presentes principalmente nas fezes (SCHRADER et al., 2012). Porém, nesse caso, há metodologias de extração que diminuem a presença desses inibidores (GOOKIN et al., 2007). Testes sorológicos para detecção de anticorpos também podem ser utilizados, porém não são recomendados para diagnóstico por não diferenciar infecção de vacinação, além de que a maioria dos animais adultos entra em contato com o agente e apresenta anticorpos contra o vírus (LAPPIN et al., 2002; TRUYEN et al., 2009).

Jacobson e colaboradores (2021) realizaram um estudo para otimizar o diagnóstico de FPV em abrigos, comparando o teste rápido, *point-of-care* ELISA (IDEXX SNAP Parvo) e qPCR de amostras de fezes e swab fecal. Foram incluídos 145 gatos com manifestação clínica da doença. Comparados à qPCR de amostra de fezes, a sensibilidade do SNAP de fezes (n=102), SNAP de swab retal (n=55), qPCR de swab retal (n=55) e foi de 55%, 30% e 77% respectivamente; a especificidade foi superior à 96% para os SNAPs e igual a 100% para qPCRs. Os autores concluíram que os testes rápidos demonstraram baixa sensibilidade e alta especificidade e, portanto, deveriam ser vistos como métodos de triagem. Os animais negativos no teste rápido e que apresentem manifestações clínicas deve ser realizada a PCR para confirmação.

Um dos pilares da saúde felina para métodos de controle de doenças infecciosas é a vacinação. Existem diretrizes para a vacinação de gatos, porém a mesma deve ser interpretada por médicos veterinários, para que seja realizada uma avaliação individualizada do animal. Obtendo assim, a recomendação de um protocolo que avalie qual o melhor plano de vacinação específico para o paciente. Considera-se os riscos ambientais, fases da vida, fatores do estilo de vida como a probabilidade de exposição, suscetibilidade à doença e o estado de saúde do animal (STONE et al., 2020).

Em todos os países, a vacinação contra FPV, herpesvírus felino-1 (FHV1) e calicivírus felino (FCV) é considerada essencial. Para FPV, os filhotes são mais suscetíveis a infecção quando comparados aos gatos adultos, sendo prioridade na vacinação quando o alvo for um grande grupo de animais. A primovacinação deve ser realizada a partir da sexta semana de idade, com duas a três doses de reforços em intervalos de três a quatro semanas. O protocolo deve ser finalizado após a décima

sexta semana de idade do animal, para assegurar a menor probabilidade de interferência de anticorpos maternos. Além disso, é recomendado outra dose de reforço aos seis meses de idade (STONE et al.; DAY et al., 2020).

4 REFERÊNCIAS

ABAYLI, H.; CAN-SAHNA, K. First detection of feline bocaparvovirus 2 and feline chaphamaparvovirus in healthy cats in Turkey. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n. 1, p. 127-136, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.130.7.133>.

ADDIE, D. D. et al. Disinfectant choices in veterinary practices, shelters and households: ABCD guidelines on safe and effective disinfection for feline environments. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 17, n. 7, p. 594-605, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X15588450>.

ALLANDER, T. et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 36, p. 12891-12896, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>.

ALLISON, Andrew B. et al. Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004475, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004475>.

AO, Y. & DUAN, Z. Novel primate bocaparvovirus species 3 identified in wild *Macaca mulatta* in China. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 1, p. 34-42, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00163-8>.

APPEL, M. J.; SCOTT, F. W.; CARMICHAEL, L. E. Isolation and immunisation studies of a canine parvovirus-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. **The Veterinary Record**, v. 105, n. 8, p. 156-159, 1979. DOI: 10.1136/vr.105.8.156.

BARRS, V. R. Feline panleukopenia: a re-emergent disease. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p. 651-670, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.006>.

BINN, L. N. et al. Recovery and characterization of a minute virus of canines. **Infection and immunity**, v. 1, n. 5, p. 503-508, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.1.5.503-508.1970>.

BRUSSEL, K. V., et al. Distinct lineages of feline parvovirus associated with epizootic outbreaks in Australia, New Zealand and the United Arab Emirates. **Viruses**, v. 11, n. 12, p. 1155, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11121155>

BUONAVOGLIA, C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 12, p. 3021-3025, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>.

CAPOZZA, P. et al. Emerging Parvoviruses in Domestic Cats. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1077, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13061077>.

CAVALLI, A. et al. In vitro virucidal activity of sodium hypochlorite against canine parvovirus type 2. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 15, p. 2010-2013, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvj.2014.05.027>.

CHEN, Katherine C. et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. **Journal of Virology**, v. 60, n. 3, p. 1085-1097, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.60.3.1085-1097.1986>.

CHENG, W. et al. Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13583, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013583>.

COTMORE, S. F. et al. The family *Parvoviridae*. **Archives of virology**, v. 159, n. 5, p. 1239-1247, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>.

COTMORE, S. F. et al. ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Parvoviridae*. **Journal of General Virology**, v. 100, p. 367-368, 2019. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>.

DAY, M. J. et al. Recomendações sobre a vacinação para médicos veterinários de pequenos animais da América Latina: um relatório do Grupo de Diretrizes de Vacinação da WSAVA. **Journal of Small Animal Practice**, p. 1-39, 2020.

DEUSCH, O. et al. A longitudinal study of the feline faecal microbiome identifies changes into early adulthood irrespective of sexual development. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144881, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144881>.

DI AKOUDI, G. et al. Identification of a novel parvovirus in domestic cats. **Veterinary microbiology**, v. 228, p. 246-251, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.006>.

DI MARTINO, B. et al. Feline Virome—A Review of Novel Enteric Viruses Detected in Cats. **Viruses**, v. 11, n. 10, p. 908, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11100908>.

GOOKIN, J. L. et al. Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 783-787, 2007.

DOI: 10.2460/ajvr.68.7.783.

FAHSBENDER, E. et al. Lyon-IARC polyomavirus DNA in feces of diarrheic cats. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 29, p. e00550-19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.00550-19>.

FASINA, O. O. et al. Minute virus of canines NP1 protein governs the expression of a subset of essential nonstructural proteins via its role in RNA processing. **Journal of Virology**, v. 91, n. 12, p. e00260-17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00260-17>.

HE, B. et al. Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel mammalian viruses. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61950, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061950>.

HOELZER, K., & PARRISH, C. R. The emergence of parvoviruses of carnivores. **Veterinary Research**, v. 41, p. 39, 2010. <https://doi.org/10.1051/vetres/201001>.

HUEFFER, K. et al. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. **Journal of virology**, v. 77, n. 3, p. 1718-1726, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.1718-1726.2003>.

HUEFFER, K.; PALERMO, L. M.; PARRISH, C. R. Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains. **Journal of virology**, v. 78, n. 11, p. 5601-5611, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5601-5611.2004>.

IKEDA, Y. et al. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. **Virology**, v. 278, p. 13–19, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0653>.

International Committee on Taxonomy of Viruses. **Subfamily: *Parvovirinae*. Genus: *Bocaparvovirus*: Species demarcation criteria**. ICTV, 2022. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/parvoviridae/parvoviridae/bocaparvovirus>.

International Society of Infectious Diseases. **Feline panleukopenia**. ProMED-mail Web site, 2022. Disponível em: <https://promedmail.org/promed-posts/>.

JACOBSON, L. S. et al. Diagnostic testing for feline panleukopenia in a shelter setting: a prospective, observational study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 12, p. 1192-1199, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X211005301>.

JANKE, K. J. et al. Fecal viral DNA shedding following clinical panleukopenia virus infection in shelter kittens: a prospective, observational study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 4, p. 337-343, 2022. DOI: [10.1177/1098612X211023056](https://doi.org/10.1177/1098612X211023056).

KAILASAN, S. et al. Structure of an enteric pathogen, bovine parvovirus. **Journal of virology**, v. 89, n. 5, p. 2603-2614, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03157-14>.

KAPOOR, A. et al. Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease. **The Journal of general virology**, v. 93, n. Pt 2, p. 341, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.036624-0>.

KAPOOR, Amit et al. A newly identified bocavirus species in human stool. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 2, p. 196-200, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1086/595831>.

KARANAM, B. et al. Phylodynamic and genetic diversity of parvoviruses of cats in southern India. **Virus Disease**, v. 33, n. 1, p. 108-113, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00760-4>.

KUMAR, D. et al. Metagenomic next-generation sequencing reveal presence of a novel ungulate bocaparvovirus in alpacas. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. 701, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11080701>.

KUMAR, M. & NANDI, S. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. **Journal of Virological Methods**, v. 169, p. 198–201, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.06.007>.

LAMM, C. G. & REZABEK, G. B. Parvovirus infection in domestic companion animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 4, p. 837-850, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.008>.

LANAVE, G. et al. Novel bocaparvoviruses in rabbits. **The Veterinary Journal**, v. 206, n. 2, p. 131-135, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.005>.

LAPPIN, M. R. et al. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 38-42, 2002.

LAU, S. K. P. et al. Bats host diverse parvoviruses as possible origin of mammalian dependoparvoviruses and source for bat–swine interspecies

transmission. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 12, p. 3046-3059, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000969>.

LAU, S. K. P. et al. Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in members of the family *Parvoviridae*, and evidence for inter- and intra-host genetic diversity and recombination. **Journal of general virology**, v. 92, n. 9, p. 2047-2059, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.033688-0>.

LAU, S. K. P. et al. Identification and genomic characterization of a novel rat bocavirus from brown rats in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 47, p. 68-76, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.014>.

LAU, S. K. P. et al. Identification and interspecies transmission of a novel bocaparvovirus among different bat species in China. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3345-3358, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000645>.

LAU, Susanna KP et al. Identification and characterization of bocaviruses in cats and dogs reveals a novel feline bocavirus and a novel genetic group of canine bocavirus. **Journal of general virology**, v. 93, n. 7, p. 1573-1582, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.042531-0>.

LEASURE, E. E.; LIENHARDT, H. F.; TABERNER, F. R. Feline infectious enteritis. **North Am Vet**, v. 15, n. 7, p. 30-34, 1934.

LI, L. et al. The fecal viral flora of California sea lions. **Journal of virology**, v. 85, n. 19, p. 9909-9917, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.05026-11>

LI, Y. et al. Virome of a feline outbreak of diarrhea and vomiting includes bocaviruses and a novel chapparvovirus. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 506, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12050506>.

LIU, C. et al. First report of feline bocavirus associated with severe enteritis of cat in Northeast China, 2015. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 17-0444, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0444>.

LIU, C. et al. Molecular and serological investigation of cat viral infectious diseases in China from 2016 to 2019. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 6, p. 2329-2335, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13667>.

MIRA, F. et al. Molecular characterization and evolutionary analyses of carnivore protoparvovirus 1 NS1 gene. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 308, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11040308>.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 9, p. 2043-2057, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>.

MITRA, N. et al. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **The Journal of general virology**, v. 97, n. 8, p. 1771, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000492>.

MÓSENA, A. C. S. et al. Detection of enteric agents into a cats' shelter with cases of chronic diarrhea in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 630-634, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5987>.

NELSON, C. D. S. et al. Detecting small changes and additional peptides in the canine parvovirus capsid structure. **Journal of virology**, v. 82, n. 21, p. 10397-10407, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00972-08>.

NG, Terry Fei Fan et al. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 1-2, p. 102-111, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.005>.

NIU, J. T. et al. Prevalence and molecular characterization of parvovirus in domestic kittens from Northeast China during 2016-2017. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 3, p. 145-155, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14943/jjvr.66.3.14>.

PARKER, J. S. L. et al. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3896-3902, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3896-3902.2001>.

PARRISH, C. R. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. **Advances in Virus Research**, p. 403–450, 1990. Elsevier. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60867-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60867-2).

PARRISH, C. R. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. **Bailliere's clinical haematology**, v. 8, n. 1, p. 57-71, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(05\)80232-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80232-X).

PARRISH, C. R. et al. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. **Journal of virology**, v. 65, n. 12, p. 6544-6552, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.65.12.6544-6552.1991>.

PESAVENTO, P. A. & MURPHY, B. G. Common and emerging infectious

diseases in the animal shelter. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 478-491, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985813511129>.

PIEWBANG, C. et al. Feline bocavirus-1 associated with outbreaks of hemorrhagic enteritis in household cats: potential first evidence of a pathological role, viral tropism and natural genetic recombination. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52902-2>.

PIEWBANG, C. et al. Naturally acquired feline bocavirus type 1 and 3 infections in cats with neurologic deficits. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 5, p. e3076-e3087, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14664>.

POVEY, R. C. Feline panleukopenia – which vaccine?. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, n. 7, p. 399-406, 1973. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1973.tb06477.x>.

QIU, J.; NAYAK, R.; PINTEL, D. J. Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by both a downstream element within the intron 3' splice acceptor and an element upstream of the P41 initiation site. **Journal of virology**, v. 78, n. 1, p. 83-93, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.78.1.83-93.2004>.

REED, A. P.; JONES, E. V.; MILLER, T. J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. **Journal of virology**, v. 62, n. 1, p. 266-276, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.62.1.266-276.1988>.

REHME, T. et al. Feline Panleukopenia Outbreaks and Risk Factors in Cats in Animal Shelters. **Viruses**, v. 14, n. 6, p. 1248, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14061248>.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.

SHAN, T. et al. Genomic characterization and high prevalence of bocaviruses in swine. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e17292, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017292>.

SHEN, W. et al. Identification and functional analysis of novel nonstructural proteins of human bocavirus 1. **Journal of virology**, v. 89, n. 19, p. 10097-10109, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01374-15>

SPAHN, G. J.; MOHANTY, S. B.; HETRICK, F. M. Characteristics of hemadsorbing enteric (HADEN) virus. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 653-661, 1966. DOI: <https://doi.org/10.1139/m66-091>.

STEINEL, A. et al. Parvovirus infections in wild carnivores. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 3, p. 594-607, 2001. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.3.594>.

STONE, A. E. S. et al. 2020 AAHA/AAFP feline vaccination guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 56, n. 5, p. 249-265, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7123>.

TAKANO, T. et al. Genetic characterization of feline bocavirus detected in cats in Japan. **Archives of virology**, v. 161, n. 10, p. 2825-2828, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2972-y>.

TANG, Y. et al. Molecular characteristics and genetic evolutionary analyses of circulating parvoviruses derived from cats in Beijing. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03281-w>.

TRUYEN, U. et al. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 11, n. 7, p. 538-546, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.002>.

TUTEJA, D.; BANU, K.; MONDAL, B. Canine parvovirology - a brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 101765, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101765>.

TUN, H. M. et al. Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. **Journal of microbiological methods**, v. 88, n. 3, p. 369-376, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.001>.

VAN BRUSSEL, K. et al. The enteric virome of cats with feline panleukopenia differs in abundance and diversity from healthy cats. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 5, p. e2952-e2966, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14646>.

VAN BRUSSEL, K et al. The enteric virome of cats with feline panleukopenia differs in abundance and diversity from healthy cats. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 5, p. e2952-e2966, 2022.

WANG, Y. et al^a. Development of SYBR Green I-based polymerase chain reaction for feline bocavirus 1 detection. **3 Biotech**, v. 11, n. 2, p. 1-6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02577-8>.

WANG, Y. et al^b. Phylogenetic analysis and evolution of feline bocavirus in Anhui Province, eastern China. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 77, p. 101676, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101676>.

WILLIAMS, S. H. et al. Viral diversity of house mice in New York City. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e01354-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01354-17>.

WOO, P. C. Y. et al. Two novel dromedary camel bocaparvoviruses from dromedaries in the Middle East with unique genomic features. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 6, p. 1349-1359, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000775>.

WU, Z. et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. **Journal of virology**, v. 86, n. 20, p. 10999-11012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01394-12>.

YANG, S. et al. A novel bocavirus from domestic mink, China. **Virus Genes**, v. 52, n. 6, p. 887-890, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1380-4>

YI, S. et al. Detection and genetic characterization of feline bocavirus in Northeast China. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1034-3>.

ZENG, S. et al. Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus. **Journal of general virology**, v. 92, n. 4, p. 784-788, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.028340-0>.

ZHANG, Wen et al. Faecal virome of cats in an animal shelter. **The Journal of general virology**, v. 95, n. Pt 11, p. 2553, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.069674-0>.

ZHAO, Q.; SCHOBORG, R. V.; PINTEL, D. J. Alternative splicing of pre-mRNAs encoding the nonstructural proteins of minute virus of mice is facilitated by sequences within the downstream intron. **Journal of virology**, v. 68, n. 5, p. 2849-2859, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.68.5.2849-2859.1994>.

CAPÍTULO 2: Artigo I

Journal of Feline Medicine and Surgery

Feline bocavirus in kittens with diarrhea in Brazil

Abstract

Objectives: Bocaviruses are part of the *Parvoviridae* family, these viruses are a potential cause of enteropathies in cats and the present study was carried out to evaluate the presence of feline bocavirus (FBoV) in diarrheic kittens in Brazil.

Methods: To shed light on the role of bocaviruses as causative agents of enteritis in young cats, 75 cats less than 1-year-old and with diarrhea from Brazil were separated into two groups: Group 1 (n = 40), composed of diarrheic kittens from different origins sampled at domiciles, veterinary hospitals or clinics, and Group 2 (n = 35), composed of diarrheic sibling kittens or diarrheic kittens from the same shelters. All samples were submitted to an internal control and a feline bocavirus (FBoV) screening by PCR; positive samples were submitted to partial sequencing of the NS1 gene for genotyping.

Results: Two samples were negative in the internal control, one in each group. FBoV was detected in 12.8% (5/39) of samples in Group 1 and in 23.5% (8/34) of samples in Group 2. Three known FBoV species (1, 2 and 3), isolated or in coinfection, were observed.

Conclusions and relevance: This study provides the first molecular evidence of the presence of FBoV in cats in Brazil, demonstrating the circulation of three species.

Keywords: *Carnivore bocaparvovirus*; emerging parvovirus; *Parvoviridae*; molecular diagnosis; NS1 gene

Introduction

Bocaviruses belong to the genus *Bocaparvovirus*, family *Parvoviridae*, and are small, nonenveloped, linear, single-stranded DNA viruses.¹ Their genome consists of three open reading frames (ORF1, ORF2 and ORF3) that encode the nonstructural protein (NS1), viral capsid protein (VP1/VP2) and nuclear phosphoprotein (NP1), respectively. The NS1 gene is used to identify different species of bocaviruses.^{1,2}

The name Bocavirus was given according to the first species in which the virus was reported, **b**ovine parvovirus 1 (*Ungulate bocaparvovirus 1*; BPV1)³ and **c**anine minute virus (*Carnivore bocaparvovirus 1*; MVC).⁴ Subsequently, human bocavirus (*Primate bocaparvovirus 1*; HBoV)⁵ and canine bocavirus (*Carnivore bocaparvovirus 2*; CBoV)⁶ were described.

Feline bocavirus (FBoV; *Carnivore bocaparvovirus 3*) was reported in 2012 in healthy cats in China.⁷ Since then, new FBoV species have been discovered, such as feline bocaparvovirus 2 (FBoV-2; *Carnivore bocaparvovirus 4*), detected in fecal samples of healthy cats from shelters and veterinary hospitals in Portugal,⁸ and feline bocaparvovirus 3 (FBoV-3; *Carnivore bocaparvovirus 5*), detected in stool samples from asymptomatic cats in the United States.⁹ The NS1 gene sequences of FBoV-2 and FBoV-3 presented 58% and 68% amino acid identity, respectively, compared to FBoV-1.^{8,9}

Recently, feline bocaviruses have been classified as a potential cause of enteropathies in cats,^{10,11} and there are limited data about feline bocavirus occurrence, species distribution and pathogeny worldwide. Therefore, this study investigated the occurrence and genetic diversity of FBoV in fecal samples of kittens with diarrhea, presenting the first description and characterization of FBoV in Brazil.

Materials and methods

A total of 75 fecal samples were sampled using rectal swabs or flexible urethral catheters for rectal samples from domestic cats up to 1-year-old and with clinical manifestations of diarrhea at domiciles, shelters, veterinary hospitals and veterinary clinics. Samples were collected from May 2021 to April 2022 in the states of Minas Gerais (n = 72) and São Paulo (n = 3), Brazil (Figure 1), and were stored at -20°C in sterile nuclease-free microtubes until processing. This study was approved by The Committee of Ethical Use of Experimental Animals of Federal University of Uberlândia - Brazil (CEUA-UFU Protocol 006/21), and the guidelines established by the Universities Federation for Animal Welfare were followed.



Figure 1. Geographical location of the states of Brazil in which the study was conducted; Minas Gerais (MG) is highlighted in green, and São Paulo (SP) is highlighted in red

The kittens were divided into two groups: Group 1 ($n = 40$), composed of diarrheic kittens from different origins without sampled contacts, collected at domiciles, veterinary hospitals or clinics; and Group 2 ($n = 35$), composed of diarrheic sibling kittens or diarrheic kittens from the same shelters.

Group 2 was composed of kittens from seven shelters (1–7) and three siblings (1–3) of Minas Gerais; all shelters had a high turnover of animals, with no quarantine. Except for Shelter 2, which had a recurring history of kittens with diarrhea, all collected samples were from diarrheic kittens. In this shelter, the stools of the first six kittens (A, B, C, D, E and F) were sampled at a veterinary hospital on different dates: once for kittens A (date: June 2021), B, C and D (September 2021), and E (November 2021); the feces of kitten F were sampled twice (December 2021 and February 2022) due to ongoing diarrhea. After this period in contact with the owner, it was decided to collect samples from all animals with close contact in the shelter (March 2022). There were 22 cats and 8 dogs, but only 18 cats and two dogs were indoors at the time of sampling, and the previous kittens (A to F) were no longer available because they had been adopted. The two dogs were approximately 4 to 6 years old and had a history of intermittent diarrhea; however, at the time of sampling, diarrhea was absent. Of the 18 cats, 3 met the inclusion criteria and were included in Group 2 (Shelter 2), along with the previous six kittens (A-F), totaling nine kittens.

Information regarding breed, age, number of cats and dogs with close contact (living in the same domicile or shelter), sex and behavior (outdoor access) of the kittens was obtained at the time of sampling.

Frozen fecal samples were resuspended in sterile nuclease-free water 30% (v/v) and incubated for three cycles at 4 °C for five minutes and 25 °C for five minutes,

interleaved with vortex mixing. Subsequently, the solution was clarified by centrifugation at $12,000 \times g$ for 16 minutes at 15 °C, and the DNA of the supernatant was extracted using the Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

As DNA extraction from stool samples can be challenging because of PCR inhibitors that are coextracted with DNA, prior to the PCR assay for FBoV, all DNA samples were first submitted to PCR targeting the bacterial 16S rRNA gene as an internal control for DNA extraction efficiency, with 1× GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 400 nM of each primer (Table 1), 1.5 µL of DNA and sterile nuclease-free water q.s.p. 25 µL. The reaction was performed in a thermocycler (Veriti, Applied Biosystems) with cycling conditions according to Gookin et al.¹². The positive control consisted of DNA extracted from the vaccine (Feline-4, Boehringer Ingelheim). As a negative control, ultrapure sterile nuclease-free water was used in place of the sample. Negative samples were excluded from the study, and the possibility of false negatives during the analysis was discarded.

Positive samples were then screened by PCR using primers targeting the conserved NP1 gene of all FBoV species, with 1× GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 400 nM of each primer (Table 1), 2.5 µL of DNA and sterile nuclease-free water q.s.p. 25 µL. The cycling conditions are described in Zhang et al.¹¹. A positive reaction control was acquired after blind PCR runs, and subsequently, the positive sample was sequenced to confirm the FBoV identity. Then, all samples previously tested without a positive control were screened again with an appropriate controlled PCR. As a negative control, ultrapure sterile nuclease-free water was used in place of the sample.

Table 1. Description of the primers used in this study.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Application	Reference
NP1	FBoV-F	AGAACCRCRATCACARTCCACT	465	FBoV Screening	Zhang et al., 2019
	FBoV-R	TGGCRACCGCYAGCATTTCA			
NS1	FBoV1-NS1F	TTTGGGGCTGAAGTCTGCTATGC	705	FBoV-1 Sequencing	Yi et al., 2018
	FBoV1-NS1R	ATGCGGCTGAGATGTACCTTGAC C			
NS1	FBoV2-NS1F	TTCGCGGATCCAGCATACACCTA C	963	FBoV-2 Sequencing	
	FBoV2-NS1R	CTCACAACGGCGCAAGCAGTCTA			
NS1	FBoV3-2F	ACACCTATGTGCTGCGTCTA	872	FBoV-3 Sequencing	Wang et al., 2021
	FBoV3-2R	ACCGAGACCCATCGTGCC			
16S sRNA	515F	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	876	Internal control	Gookin et al. 2007
	1391R	GACGGGCGGTGAGTGCA			

Amplicons were analyzed in 1.5% agarose gel electrophoresis stained with SYBR (Safe DNA Gel Stain) and visualized under UV light and were considered positive when they showed fragments of 876 bp for 16S rRNA and 465 bp for FBoV.

To determine the FBoV species, FBoV-positive samples were submitted to species-specific partial NS1 gene PCRs using 1X GoTaq Green PCR Master Mix (Promega) and primers described by Yi et al.¹³. Three primers were selected to amplify each of the three FBoVs (Table 1). PCR of the partial NS1 fragment of FBoV-1 and FBoV-2 was performed with 1X GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 400 nM of

each primer, 5 μ L of extracted DNA and sterile nuclease-free water q.s.p. 50 μ L; the cycling conditions are described in Yi et al.¹³. PCR of the partial NS1 fragment of FBoV-3 was performed with 1X GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), each primer at 320 μ M, 2 μ L of extracted DNA and sterile nuclease-free water q.s.p. 50 μ L; the cycling conditions are described in Wang et al.¹⁴.

The PCR products were visualized through 1.5% agarose gel electrophoresis and purified using a Purelink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) in accordance with the manufacturer's instructions. Bidirectional Sanger sequencing with BigDye v. 3.1 was performed in an ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies).

The Phred online application (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) was used to evaluate the quality of the chromatograms generated, and only positions with scores above 20 were used. Sequences were assembled with the CAP Contig application using BioEdit 7.2.5 software.¹⁵ Sequence identities were obtained using BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The NS1 partial sequences from each sample were aligned with representative bocavirus homologous sequences retrieved from GenBank using CLUSTAL W. The data set was submitted to the Find Best DNA Model in MEGA 11. Subsequently, a nucleotide tree was constructed by using the maximum likelihood method and the Tamura-Nei model with a discrete gamma distribution.^{16,17}

Data such as age, sex, number of cats and/dogs with close contact, behavior (outdoor access) and breed of the diarrheic kittens were linked with the screening results (positive or negative) for FBoV.

Results

Overall, 2 of the 75 samples, 1 in each group (1 and 2), were negative for the internal control, probably due to the presence of reaction inhibitors, and were therefore excluded from the study (Table 2).

Table 2. Occurrence of FBoV in diarrheic kittens from Group 1 (diarrheic kittens from different origins) and Group 2 (diarrheic kittens from shelters or siblings) of this study.

Category	No. Tested (n=73)	FBoV Occurrence (n=13)	FBoV Species		
			1 (n=3)	2 (n=2)	1 and 3 (n=2)
Group 1	39	5 (12.8%)	2	0	1
Group 2	34	8 (23.5%)	1	2	1
Group 2	No. Tested (n=34)	FBoV Occurrence (n=8)	FBoV Species		
			1 (n=3)	2 (n=2)	1 and 3 (n=2)
Shelter 1	9	2 (22.2%)	0	1	0
Shelter 2	8	4 (50.0%)	1	0	1
Shelter 3	3	0	0	0	0
Shelter 4	2	0	0	0	0
Shelter 5	3	0	0	0	0
Shelter 6	1	0	0	0	0
Shelter 7	1	1 (100.0%)	0	1	0
Siblings 1	2	1 (50.0%)	0	0	0
Siblings 2	3	0	0	0	0
Siblings 3	2	0	0	0	0

A total of 12.8% (5/39) of diarrheic kittens showed positive results in the FBoV screening in Group 1, and 23.5% (8/34) showed positive results in the FBoV screening

in Group 2 (Table 2). Unfortunately, one kitten from each group died, but to respect the owners' wishes, these kittens were not necropsied.

For Shelter 2, kitten B was negative at the internal control, kittens A, C and E were negative for FBoV, and kittens D and F were positive, of which F was positive at the first sampling (December/2021) and negative at the second sampling (February/2022). Two dogs (0/2) were negative for FBoV, and two cats (11,11%, 2/18) were positive; 3/18 met the inclusion criteria and were included in Group 2. A total of 17.4% (4/23) of tested kittens were positive in Shelter 2; however, considering the inclusion criteria (diarrheic kittens), these values were 50% (4/8).

In Groups 1 and 2, 80% (4/5) and 87.5% (7/8) of positive kittens were up to 4 months of age, respectively. Moreover, 80% (4/5) of the positive kittens in Group 1 and all the kittens in Group 2 had outdoor access. Information on exclusively positive kittens is shown in Table 3, and other relevant information on the diarrheic kittens can be found in Table 4 (see supplementary material).

Table 3. Summary of relevant clinical-epidemiological information of FBoV-positive diarrheic kittens.

Cat	Origin	Source	Sex	Age (months)	Outdoor Access [†]	No. of cats in contact	No. of dogs in contact
1*	SP [‡]	VH [¶]	M	3	No	Uninformed	Uninformed
2	MG [§]	VH [¶]	F	3	Yes	0	1
3	MG [§]	VH [¶]	F	2	Yes	0	0
4	MG [§]	VH [¶]	F	11	Yes	0	0
5	MG [§]	VH [¶]	F	1	Yes	3	0
6	MG [§]	Shelter 1	M	1	Yes	55	2
7	MG [§]	Shelter 1	F	1	Yes	55	2
8	MG [§]	Shelter 2	M	4	Yes	23	11
9	MG [§]	Shelter 2	F	4	Yes	23	11
10	MG [§]	Shelter 2	M	1	Yes	25	11
11*	MG [§]	Shelter 2	M	1	Yes	25	11
12	MG [§]	Shelter 7	F	1	Yes	9	11
13	MG [§]	Siblings 1	F	5	Yes	14	0

Note: *Cats that died. [†]If the contact kittens had outdoor access, the kitten was considered with outdoor access as well. Abbreviations: [‡]São Paulo; [§]Minas Gerais; [¶]Veterinary Hospital.

Of all 13 positive samples, coinfection with two different FBoVs was detected in two cats, and only seven sequences were obtained. Three (42.8%) were positive for FBoV-1, two (28.5%) for FBoV-2 and two (28.5%) for FBoV-1 and FBoV-3

simultaneously, showing the circulation of a high genetic diversity of FBoV in Brazil, with the occurrence of all three species. The NS1 partial gene sequences were submitted to GenBank (accession numbers: ON571563 to ON571571), and the phylogenetic tree confirmed the species (Figure 2).

Comparing the obtained nucleotide sequences with the FBoV sequences from GenBank, the Hong Kong (JQ692587), Thailand (MN127778), USA (KM017745) and China (MT577646) strains showed 95.13%–98.02%, 96.50%–97.61%, 96.02%–96.65% and 96.50%–97.95% identity with the FBoV-1 strains of this study, respectively.

The FBoV-2 of this study showed 96.87%–98.58%, 98.03%–98.34% and 96.03%–97.10% nucleotide identity with the Japan (LC148406 to LC148408), Portugal (KF792837) and China (MT633126) strains, respectively. The two FBoV-3 strains showed 96.03%–97.10% and 96.45%–97.58% nucleotide identity with the USA (KM017744) and China (MT633127 and MT633128) strains, respectively.

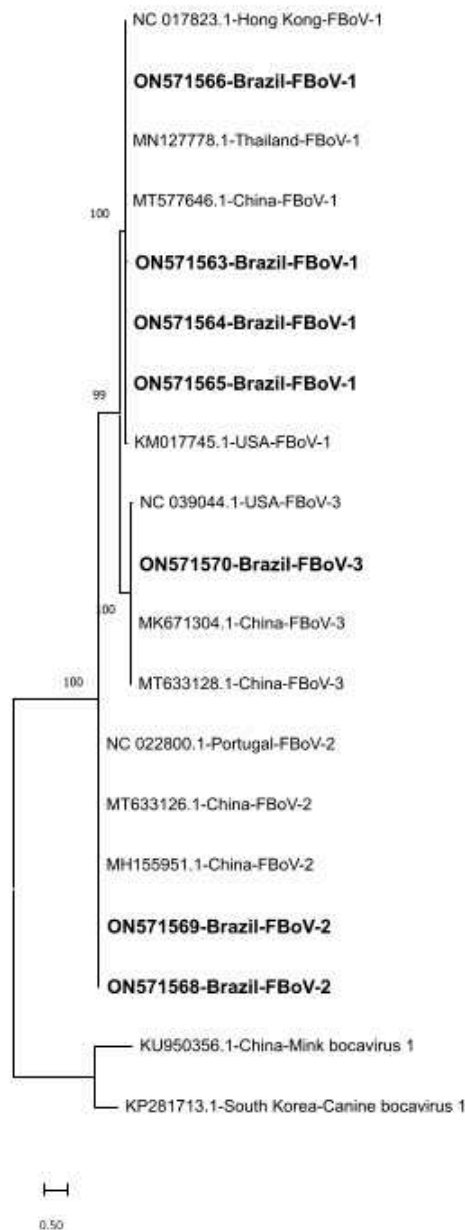


Figure 2. Phylogenetic tree based on the partial NS1 gene of feline bocavirus. The evolutionary history of the nucleotide sequences (615 nt) was inferred by using the maximum likelihood method and the Tamura-Nei model with 1,000 bootstrap replicates using MEGA 11 software. The percentage of >50% in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The scale represents the number of substitutions per site. The strains obtained in this study are highlighted in bold. FBoV-1, feline bocavirus 1; FBoV-2, feline bocavirus 2; FBoV-3, feline bocavirus 3

Discussion

Feline bocaviruses can be detected in feces of asymptomatic cats^{7,18} and are sometimes associated with enteric diseases,¹⁹ especially in kittens¹³ with diarrhea or hemorrhagic enteritis.¹⁰ This defined the inclusion criteria of this study to delineate the search for the circulation of the virus in Brazil.

Despite being repeatedly reported circulating in cats in China, there is still little information on the circulation of FBoVs in other countries.¹⁸ In this study, this virus was identified in 13 kittens with diarrhea, indicating the circulation of FBoV in the country. Even though only nine positive strains could be sequenced, the presence of the three different circulating species (1, 2 and 3) was determined, in addition to coinfection between two of these (FBoV-1 and FBoV-3).

Zhang et al.¹¹ analyzed cat feces samples in northeast China; 25.89% (51/197) were positive for FBoV, and this rate was higher in cats with diarrhea (33.33%, 17/51) than in healthy cats (17.6%, 9/51). Piewbang et al.¹⁰ also correlated infections with the incidence of diarrhea and showed an association of FBoV-1 with hemorrhagic enteritis in cats from three households. A recent study found 9% (5/55) of FBoV-positive samples in China, with 80% (4/5) from diarrheic cats.¹⁴ In this study, of the diarrheic cats analyzed, 12.8% (5/39) were positive in Group 1 and 23.5% (8/34) in Group 2. Additionally, regarding the shelters, this study found a wide range of results (Table 2), with Shelter 2 showing a higher prevalence with 50% (4/8) positive diarrheic kittens. In this shelter, we also evaluated cats with close contact that did not meet the inclusion criteria. They were above 1-year-old and did not have diarrhea, nor were they positive by PCR, suggesting that adults in an environment with positive kittens are apparently resistant to FBoV infection. There were also two dogs with close contact that were

evaluated in this shelter, which were both negative for infection. However, canine bocavirus 1 (CBoV-1) has already been diagnosed in a domestic cat in an animal shelter that housed both species,²⁰ justifying further investigations on the possible interspecies transmission of the virus.

Our study, investigating the number of cats and dogs with close contact and the sex and breed of the kittens, is not representative because of the limited sample number and because of the lack of homogeneity, possibly resulting in measurement bias. Moreover, irrespective of outdoor access, the frequency of infection may vary according to this variable. Nevertheless, there might be an association between a high population and the circulation of the virus, as observed in another study on the prevalence of feline bocavirus in Northeast China in cats that were symptomatic or not, in which 30.9% (39/126) shelter cats were FBoV-positive, in contrast to 16.9% (12/71) positive cats sampled at private veterinary clinics.¹³ An association with sex regarding the infection has not been found.^{13,22}

In Thailand, during an outbreak of FBoV-1 and hemorrhagic enteritis, 76.5% (13/17) of the cats died, all of which were household cats.¹⁰ In this study, 15.4% (2/13) of positive kittens died (Table 3), one of which had no access to the outdoors and belonged to Group 1, and the other had outdoor access and belonged to Shelter 2 (kitten D). However, it is not possible to implicate viral infection in the death of the kittens since these cases were not submitted to histopathological analysis.

Five FBoV-1 sequences of this study (ON571563 to ON571567) showed high similarity to the FBoV-1 strain reference described by Lau et al.⁷, two (ON571568 and ON571569) to the FBoV-2 strain reference described by Ng et al.⁸ and the last two (ON571570 and ON571571) to the FBoV-3 strain reference described by Zhang et

al.¹¹. This suggests that the strains belong to three different species and that Brazil has a significant species diversity of FBoVs. Recently, Wang et al.¹⁴ also sequenced three FBoV species in Anhui Province (China) in five positive samples (9%, 5/55), two FBoV-1, one FBoV-2 and two FBoV-3. Other studies did not find such diversity. For example, in Turkey, all FBoV-positive samples (8.6%, 6/70) were classified as Species 2,²¹ similar to Japan (9.9%, 10/101)²² and Portugal (5.4%, 3/55).⁸ In Canada, only Species 3 has been found,²³ and in the USA, only Species 1 and 3 (8%, 2/25) have been reported.⁹

Via phylogenetic analysis, the relationship between different carnivore BoVs was determined using NS1 partial sequences. The three different lineages formed in the FBoV branch and represented the three feline species (Figure 2). In this study, FBoV-1 and FBoV-3 were more closely related than FBoV-2 on NS1 partial sequence (615 nt) analysis, differing from the findings of other analyses with NS1 partial sequences (705 nt)¹³ or complete analyses of the NS1 gene, where FBoV-3 was closer to FBoV-2.¹⁴

Conclusion

Overall, our study not only provides further gene sequences for the investigation of FBoV worldwide but is also a pioneer study of the occurrence and species diversity of this virus in diarrheic kittens in Brazil. Considering previous studies and the presence of FBoV in diarrheic kittens observed herein, this pathogen must be considered in the differential diagnosis of enteropathies in cats.

Supplementary material

Table of relevant clinical-epidemiological information of the diarrheic kittens and data analyses from the different groups. The following file is available online.

Acknowledgments

We thank Mr. Marcelo M. Gomes for the assistance provided.

Conflict of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are openly available in the GenBank database at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideunder> accession numbers ON571563 to ON571571.

References

- 1 Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, et al. **ICTV Virus Taxonomy Profile: *Parvoviridae*. *J Gen Virol* 2019; 100: 367–368. DOI: 10.1099/jgv.0.001212.**
- 2 Chen KC, Shull BC, Moses EA, et al. **Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *J Virol* 1986; 60: 1085-1097. DOI: 10.1128/jvi.60.3.1085-1097.1986.**

3 Spahn GJ, Mohanty SB and Hetrick FM. **Characteristics of hemadsorbing enteric (HADEN) virus.** *Can J Microbiol* 1966; 12: 653-661. DOI: 10.1139/m66-091.

4 Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, et al. **Recovery and characterization of a minute virus of canines.** *Infect Immun* 1970, 1: 503-508. DOI:10.1128/iai.1.5.503-508.1970.

5 Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. **Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.** *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 12891-12896. DOI: 10.1073/pnas.0504666102.

6 Kapoor A, Mehta N, Dubovi EJ, et al. **Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease.** *J Gen Virol* 2012; 93: 341. DOI: 10.1099/vir.0.036624-0.

7 Lau SK, Woo PC, Yeung HC, et al. **Identification and characterization of bocaviruses in cats and dogs reveals a novel feline bocavirus and a novel genetic group of canine bocavirus.** *J Gen Virol* 2012; 93: 1573-1582. DOI: 10.1099/vir.0.042531-0.

8 Ng TFF, Mesquita JR, Nascimento MSJ, et al. **Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses.** *Vet microbiol* 2014; 171: 102-111. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.04.005.

9 Zhang W, Li L, Deng X, et al. **Faecal virome of cats in an animal shelter.** *J Gen Virol* 2014; 95: 2553. DOI: 10.1099/vir.0.069674-0.

10 Piewbang C, Kasantikul T, Pringproa K, et al. **Feline bocavirus-1 associated with outbreaks of hemorrhagic enteritis in household cats: potential first evidence of a pathological role, viral tropism and natural genetic recombination.** *Sci Rep* 2019; 9: 1-13. DOI: 10.1038/s41598-019-52902-2.

- 11 Zhang Q, Niu J, Yi S, et al. **Development and application of a multiplex PCR method for the simultaneous detection and differentiation of feline panleukopenia virus, feline bocavirus, and feline astrovirus.** *Arch Virol* 2019; 164: 2761-2768. DOI: 10.1007/s00705-019-04394-8.
- 12 Gookin JL, Stauffer SH, Coccaro MR, et al. **Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens.** *Am J Vet Res* 2007; 68: 783-787. DOI: 10.2460/ajvr.68.7.783.
- 13 Yi S, Niu J, Wang H, et al. **Detection and genetic characterization of feline bocavirus in Northeast China.** *Viol J* 2018; 15:1-12.2. DOI: 10.1186/s12985-018-1034-3.
- 14 Wang Y, Guo X, Li W, et al. **Phylogenetic analysis and evolution of feline bocavirus in Anhui Province, eastern China.** *Comp Immunol Microbiol Infec Dis* 2021; 77: 101676. DOI: 10.1016/j.cimid.2021.101676.
- 15 Hall TA. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41: 95–98.
- 16 Tamura K, and Nei M. **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** *Mol Biol Evol* 1993; 10: 512-526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- 17 Tamura K, Stecher G and Kumar S. **MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11.** *Mol Biol Evol* 2021; 38: 3022-3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

- 18 Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, et al. **Feline Virome—A Review of Novel Enteric Viruses Detected in Cats.** *Viruses* 2019; 11: 908. DOI: 10.3390/v11100908.
- 19 Liu C, Liu F, Li Z, et al. **First report of feline bocavirus associated with severe enteritis of cat in Northeast China, 2015.** *J Vet Med Sci* 2018; 17: 0444. DOI: 10.1292/jvms.17-0444.
- 20 Niu J, Yi S, Wang H, et al. **Complete genome sequence analysis of canine bocavirus 1 identified for the first time in domestic cats.** *Arch Virol* 2019; 164: 601-605. DOI: 10.1007/s00705-0118-4096-z.
- 21 Abayli H and Can-Sahna K. **First detection of feline bocaparvovirus 2 and feline chaphamaparvovirus in healthy cats in Turkey.** *Vet Res Commun* 2022; 46: 127-136. DOI: 10.1136/vr.130.7.133.
- 22 Takano T, Takadate Y, Doki, T, et al. **Genetic characterization of feline bocavirus detected in cats in Japan.** *Arch Virol* 2016; 161: 2825-2828. DOI: 10.1007/s00705-016-2972-y.
- 23 Fahsbender E, Altan E, Estrada M, et al. **Lyon-IARC polyomavirus DNA in feces of diarrheic cats.** *Microbiol Resour Announc* 2019; 8. DOI: 10.1128/MRA.00550-19.

Supplementary material

Table 4. Summary of relevant clinical-epidemiological information of the diarrheic kittens and data analyses from the different groups.

Group 1: diarrheic kittens from different origins						
Factor	Category	No. Tested (n=39)	FBoV Occurrence (Positive, n=5)	FBoV Species		
				1 (n=2)	2 (n=0)	1 and 3 (n=1)
Age (months)	Up to 4	17	4 (23.5%)	2	0	0
	5 to 8	12	0	0	0	0
	9 to 12	10	1 (10.0%)	0	0	1
Sex	Female	20	4 (20.0%)	1	0	1
	Male	19	1 (5.3%)	1	0	0
Behaviour	Outdoor access	19	4 (21.0%)	1	0	1
	Indoor	20	1 (5.0%)	1	0	0
Breed	Mixed-breed	37	5 (13.5%)	2	0	1
	Persian	2	0	0	0	0
No. of cats with contact	0	16	2 (12.5%)	0	0	1
	1-5	19	2 (10.5%)	1	0	0
	6-10	0	0	0	0	0
	11-25	0	0	0	0	0
	26-55	0	0	0	0	0
	No info	4	1 (25.0%)	1	0	0
No. of dogs with contact	0	29	4 (13.8%)	1	0	1
	1-5	5	0	1	0	0
	6-25	1	0	0	0	0
	No info	4	1 (25.0%)	0	0	0
Group 2: diarrheic kittens from shelters or siblings						
Factor	Category	No. Tested (n=34)	FBoV Occurrence (Positive, n=8)	FBoV Species		
				1 (n=1)	2 (n=2)	1 and 3 (n=1)

Age (months)	Up to 4	18	7 (38.9%)	1	2	1
	5 to 8	13	1 (7.7%)	0	0	0
	9 to 12	3	0	0	0	0
Sex	Female	9	3 (33.3%)	0	2	0
	Male	25	5 (20.0%)	1	0	1
Behaviour	Outdoor access	34	8 (23.5%)	1	2	1
	Indoor	0	0	0	0	0
Breed	Mixed-breed	34	8 (23.5%)	1	2	1
	Persian	0	0	0	0	0
Shelter (1-7)/ Siblings (1-3)	1	9	2 (22.2%)	0	1	0
	2	8	4 (50.0%)	1	0	1
	3	3	0	0	0	0
	4	2	0	0	0	0
	5	3	0	0	0	0
	6	1	0	0	0	0
	7	1	1 (100.0%)	0	1	1
	1	2	1 (50.0%)	0	0	0
	2	3	0	0	0	0
	3	2	0	0	0	0
Cats in contact	0	0	0	0	0	0
	1-5	2	0	0	0	0
	6-10	4	1 (25.0%)	0	1	0
	11-25	17	5 (29.4%)	1	0	1
	26-55	11	2 (18.2%)	0	1	0
Dogs in contact	0	8	1 (12.5%)	0	0	0
	1-5	17	2 (11.8%)	0	1	0
	6-25	9	5 (55.6%)	1	1	1

CAPÍTULO 3: Artigo II

Journal of Feline Medicine and Surgery

Detecção molecular de parvovírus felino e canino em gatos filhotes com diarreia

Resumo

Objetivos: Existem alertas de surtos de panleucopenia felina em diversos países, com alta mortalidade em gatos filhotes e não vacinados. Porém, pouco se conhece sobre a epidemiologia do vírus no país. Assim, objetivou-se investigar a ocorrência do *Carnivore protoparvovirus-1* (CPPV-1) em gatos filhotes com diarreia e determinar a variante genética através de sequenciamento de Sanger.

Métodos: Foram selecionados 85 gatos com menos de um ano de idade com manifestação clínica de diarreia. Esses animais foram divididos em dois grupos, o grupo 1 (G1; n=44) contendo gatos filhotes diarreicos de diferentes origens e o grupo 2 (G2; n=39) composto de gatos filhotes diarreicos da mesma ninhada ou provenientes de abrigos. As amostras foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (PCR) de controle interno e PCR em tempo real (qPCR) para detecção do CPPV-1. As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento completo do gene que codifica a proteína VP2.

Resultados: Duas amostras foram negativas no controle interno, cada uma de um grupo (G1 e G2) e as mesmas foram retiradas do estudo. O CPPV-1 foi detectado em 43,4% (36/83) amostras, com 40,9% (18/44) dos animais pertencentes ao G1 e 46,1% (18/39) ao G2 (Tabela 2). Quatro amostras e uma vacina foram sequenciadas, três das amostras foram classificadas como parvovírus felino, uma amostra como parvovírus canino.

Conclusão e relevância: Esse estudo relatou a ocorrência de CPPV-1 em gatos filhotes com diarreia no Brasil. Além de evidenciar a presença da variante felina, também apresenta o primeiro relato da ocorrência de CPV em gatos no país.

Palavras-chave: parvovírus reemergentes; *Parvoviridae*; diagnóstico molecular; vírus da panleucopenia felina, gene VP2.

Keywords: reemerging parvovirus; *Parvoviridae*; molecular diagnosis; feline panleukopenia virus; VP2 gene.

Introdução

Os membros da família *Parvoviridae* são vírus DNA de fita simples linear, não envelopados (COTMORE et al., 2019). O gênero *Protoparvovirus* possui espécies de vírus capazes de infectar gatos, dentre estas, o protoparvovírus carnívoro 1 (CPPV-1, *Carnivore protoparvovirus 1*) (COTMORE et al., 2019; DIAKOUDI et al., 2019) que abrange o parvovírus felino (FPV, *Feline parvovirus*) ou vírus da panleucopenia felina (FPLV, *Feline panleukopenia virus*) e o parvovírus canino (CPV, *Canine parvovirus*) (COTMORE et al., 2013; 2019).

O vírus é transmitido via fecal-oral e a alta resistência dos parvovírus ao ambiente favorece a transmissão do agente através do contato do animal com fezes de animais infectados ou ambientes contaminados (BARRS, 2019).

A panleucopenia felina é uma síndrome clínica causada pela infecção pelo CPPV-1, ou seja, o parvovírus felino e/ou canino. A doença ocorre com maior frequência em gatos filhotes não vacinados e a infecção em gatos pelo CPV é incomum (<10%) (BARRS, 2019). O FPLV possui tropismo para células de alta atividade mitótica, como tecidos linfoides, medula óssea, células das criptas intestinais e cerebelo (em neonatos) (BARRS, 2019; CAPOZZA et al., 2021). Os sinais clínicos mais frequentes incluem diarreia, letargia, vômito, anorexia, perda de peso e morte súbita. O desfecho final está relacionado à ocorrência de enterites graves, desidratação e depleção linfóide (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019).

O diagnóstico de panleucopenia felina se tornou infrequente em gatos em diversos países como Reino Unido, Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia, devido à vacinação (BARRS, 2019). Porém, foi considerada uma doença reemergente em virtude de surtos que ocorreram na Austrália em 2014 (VAN BRUSSEL et al.,

2019), onde a mortalidade ultrapassou 95% dos 610 casos reportados, considerando que os animais de abrigos eram eutanasiados para contenção da infecção. Mais recentemente foram reportados novos surtos e/ou alertas na Índia em 2020, Austrália em 2021, África do Sul e mais quatro surtos distintos nos Estados Unidos em 2022 por meio da Sociedade Internacional para Doenças Infeciosas (*International Society for Infectious Diseases*, PROMED, 2022).

Evidencia-se a ocorrência da doença em gatos jovens (até um ano de idade), não vacinados e provenientes de abrigos (VAN BRUSSEL et al., 2019; BARRS, 2019; CAPOZZA et al., 2021). Os vírions de CPPV-1 são altamente resistentes no ambiente, assim, favorecendo a manutenção viral e transmissão indireta através de fômites e ambientes contaminados. Abrigos e ambientes com aglomeração de animais facilita a transmissão direta do agente através do contato do gato com fezes de animais infectados (PESAVENTO & MURPHY et al., 2014; BARRS, 2019).

Atualmente, a melhor forma de prevenção de surtos e de conter a propagação da doença é a vacinação. A vacina contra FPV é considerada essencial e o protocolo de imunização deve ser realizado para cada animal individualmente, mas respeitando as diretrizes estabelecidas, considerando a possível interferência da imunidade materna. Os filhotes são mais suscetíveis a manifestação clínica da doença quando comparados aos gatos adultos, sendo prioridade para vacinação quando se trata de ambientes superpopulosos (STONE et al., 2020; DAY et al., 2020). Além disso, em casos de abrigos, caso algum animal seja positivo para a doença, o mesmo deve ser isolado por no mínimo 14 dias (JANKE et al., 2022).

A evidência de parvovírus emergentes e reemergentes causando doença em gatos, demonstra a importância dos estudos epidemiológicos (CAPOZZA et al., 2021).

Apesar dos alertas de surtos de panleucopenia felina no mundo (VAN BRUSSEL et al., 2019; PIEWBANG et al., 2019; LI et al., 2020) e de um artigo da ocorrência do vírus no Brasil (MÓSENA et al., 2019), pouco se conhece sobre a epidemiologia do vírus no país. Dessa forma, o estudo é de grande relevância, tanto epidemiológica, quanto clínica; portanto objetivou-se investigar a ocorrência do CPPV-1 em amostras de fezes de filhotes com diarreia, provenientes de abrigos ou não; além da ocorrência de coinfeções entre CPPV-1 e FBoV no Brasil.

Materiais e métodos

Foram selecionados gatos (n=85) com até um ano de idade com manifestação clínica de diarreia atendidos em domicílios, abrigos, hospitais veterinários e clínicas veterinárias entre maio de 2021 e setembro de 2022 nos estados de Minas Gerais (n=82) e São Paulo (n=3), Brasil. Desses, foram coletadas amostras de fezes usando swabs retais ou sondas uretrais flexíveis. As amostras foram armazenadas a -20 °C em microtubos estéreis livres de nucleases até o processamento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil (CEUA-UFU Protocolo 006/21).

Os gatos foram divididos em dois grupos, o primeiro grupo (G1) foi composto de gatos filhotes diarreicos de diferentes origens, sem contactantes diarreicos, coletados em domicílios, hospitais veterinários ou clínicas; enquanto o segundo grupo (G2) era composto de gatos filhotes diarreicos da mesma ninhada ou provenientes de abrigos. Além disso, destaca-se que o G1 foi composto de animais de Minas Gerais e São Paulo, enquanto o G2 foi composto por filhotes de sete diferentes abrigos e quatro grupos de gatos da mesma ninhada, todos de Minas Gerais. Todos os abrigos

tinham alta circulação de animais, sem a realização de quarentena para novos animais resgatados e sem a adesão a protocolos vacinais.

Informações dos animais sobre idade, número de gatos e cães contactantes, sexo, acesso à rua e vacinação foram obtidas no momento da amostragem.

As amostras de fezes foram ressuspensas em 30% de água livre de nucleases (v/v) e incubadas por três ciclos de 4°C e 25°C por cinco minutos cada, intercalados com vórtex. Em seguida foi finalizada a clarificação da amostra por centrifugação a $12,000 \times g$ por 16 minutos à 15°C e o DNA contido no sobrenadante foi extraído usando o Purelink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) de acordo com o manual do fabricante.

Para detecção do CPPV-1 foi realizada a reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) utilizando primers previamente descritos por Kumar & Nandi (2010) que amplificam a proteína estrutural do capsídeo (VP2). A qPCR incluiu 1× GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 400nM de cada primer (Tabela 1), 10µL de DNA extraído e água livre de nucleases q.s.p. 25µL. Foi realizada em termociclador em tempo real (Rotor Gene®, QIAGEN), com as condições de ciclagem de: 2 minutos a 92°C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 55°C por 1 minuto seguido por uma curva de melting. O controle positivo da reação foi constituído de DNA extraído da vacina Feline®-4 (Boehringer Ingelheim). Para controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de nucleases no lugar da amostra. As amostras foram consideradas positivas quando geraram curva de amplificação e temperatura de *melting* de 80,5.

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados para detecção e sequenciamento do *Carnivore protoparvovirus-1* (CPPV-1) e para controle interno.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	TA*	Aplicação	Referência
VP2	qCPV-2RT-F	CATTGGGCTTACCACCATT	160	Detecção (CPPV-1)	Kumar & Nandi, 2010
	qCPV-2RT-R	CCAACCTCAGCTGGTCTCAT			
VP2	CPV2679-F	CCAGATCATCCATCAACATCA	853	Sequenciamento CPPV-1 (2679-3511)	Decaro et al., 2008
	CPV3511-R	TGAACATCATCTGGATCTGTACC			
VP2	CPV3381-F	CCATGGAAACCAACCATACC	736	Sequenciamento CPPV-1 (3381-4116)	
	CPV4116-R	AGTTAATTCTGTGTTTACCTCCAA			
VP2	555-F	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	583	Sequenciamento CPPV-1 (3556-4585)	Buonavoglia et al., 2001
	555-R	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA			
16S sRNA	515F	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	876	Controle interno	Gookin et al. 2007
	1391R	GACGGGCGGTGAGTGCA			

*TA: Tamanho do produto amplificado (pb: pares de base).

As amostras negativas para detecção do CPPV-1 foram submetidas à PCR de controle interno que tinha como alvo o gene 16S rRNA bacteriano, assim avaliou-se a eficiência da extração, devido a possível presença de inibidores de PCR após a extração de DNA de amostras de fezes. A reação foi realizada com 1× GoTaq® Green PCR Master Mix (Promega), 400 nM de cada primer (Tabela 1), 1,5 µL de DNA e água livre de nuclease q.s.p. 25µL. A PCR ocorreu em termociclador (Veriti®, Applied Biosystems) com condições descritas por Gookin e colaboradores (2007). O controle positivo da reação foi o DNA extraído da vacina Feline®-4 (Boehringer Ingelheim) e o controle negativo foi água livre de nucleases no lugar da amostra.

O produto da amplificação foi analisado em gel de eletroforese 1,5% corado com SYBR® (Safe DNA Gel Stain, Promega) diluído à 1:10.000, observado sob luz UV e considerado positivo quando apresentou fragmento de 876 pares de base, comparado com o marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, ThermoFisher Scientific). As amostras negativas para o controle interno foram excluídas do estudo, excluindo assim, a possibilidade de falsos negativos.

A detecção do bocavírus felino (FBoV) foi realizada de acordo com a metodologia descrita no “Capítulo 2: Artigo I”. Realizada para avaliação da coinfeção entre os vírus.

Para determinar a variante do CPPV-1, as amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento de Sanger utilizando-se um conjunto de primers para amplificação do gene que codifica a proteína VP2 completa (VAN BRUSSEL et al., 2019). O gene foi dividido em três regiões, com primers e reações descritas em estudos prévios (Tabela 1), com algumas modificações. As reações foram realizadas com 1× GoTaq® Green PCR Master Mix (Promega), 400 nM de cada primer (Tabela 1), 7 µL de DNA e água livre de nuclease q.s.p. 50uL. As PCRs ocorreram em termociclador (Veriti®, Applied Biosystems), para as duas primeiras regiões do sequenciamento (CPVF-2679, CPVR-3511, CPV-3381 e CPV-4116) foi realizada com uma denaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de denaturação à 95°C por 15 segundos, anelamento a 48°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Enquanto para a última reação (555-F e 555-R), o anelamento foi de 44°C por 1 minuto.

Assim como para os produtos amplificados de controle interno, os produtos do sequenciamento foram dispostos em gel de agarose e as bandas observadas sob luz

UV. Foram consideradas positivas quando apresentavam tamanho específico (Tabela 1).

Os fragmentos de DNA foram excisados do gel de agarose e purificados com Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento de DNA foi realizada bidirecionalmente no sequenciador capilar ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) com o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

O *Phred* online (Electropherogram quality analysis, Embrapa) foi utilizado para avaliar a qualidade dos cromatogramas gerados no sequenciamento e apenas regiões com escore acima de 20 foram utilizados. As sequências finais foram obtidas após edição manual com a ferramenta CAP-contig assembly do *software* BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999).

A busca por homologias entre as sequências deste estudo com outras sequências depositadas no GenBank foi realizada por meio do programa BLAST+ 2.13.0, ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local de nucleotídeos (BLASTn). Além disso, também foram coletadas informações do sequenciamento de vacinas que estão disponíveis no mercado brasileiro, como a Felocell CVR® (Pfizer) e a Purevax RCP® (Merial). A vacina Nobivac® Feline (MSD) não tinha sequenciamento disponível no banco de dados e, portanto, foi sequenciada no presente estudo.

Para criação do *dataset* e posterior alinhamento, foram selecionadas sequências de referência e de surtos recentes para FPV e posteriormente sequências

para representar diferentes clados de CPV de acordo com a última proposta de classificação (DE OLIVEIRA SANTANA et al., 2022) e das vacinas anteriormente citadas. O alinhamento das sequências homólogas retiradas do GenBank foi realizado utilizando a ferramenta CLUSTAL W do *software* BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999). O produto do alinhamento foi submetido ao *Find Best DNA Model* no MEGA11 (NEI & KUMAR 2000; TAMURA et al., 2021).

Dados como idade, sexo, número de contactantes (cães e gatos), acesso à rua e raça foram correlacionados com os resultados da detecção do CPPV-1.

Resultados

Do número total de amostras (n=85), duas foram negativas no controle interno e, portanto, foram excluídas do estudo. Considerando-se o número amostral total, a ocorrência de CPPV-1 foi de 43,4% (36/83) gatos positivos, com 40,9% (18/44) dos animais pertencentes ao G1 e 46,1% (18/39) ao G2 (Tabela 2).

Setenta e três do total de animais foram testados bocavírus felino (FBoV), 7,7% (3/39) gatos do G1 e 11,8% (4/34) do G2 (Tabela 2) apresentaram coinfeção entre os vírus.

Três gatos com diarreia vieram a óbito (Tabela 2), um do G1 e dois do G2, esses animais não foram disponibilizados para necrópsia de acordo com a vontade dos seus responsáveis. Dois desses filhotes estavam coinfectados por CPPV-1 e FBoV, o primeiro pertence ao G1 ter três meses de idade (SP1-G1, Tabela 3), o segundo pertence ao G2 e tinha um mês (MG2-G2, Tabela 3). O outro filhote que veio a óbito foi negativo para ambos os vírus, pertencia ao G2 e apresentava também apenas um mês.

Tabela 2. Ocorrência de *Carnivore protoparvovirus-1* em gatos filhotes com diarreia pertencentes ao G1 (filhotes com diarreia com diferentes origens) e ao G2 (filhotes da mesma ninhada com diarreia ou provenientes de abrigos) e dados de coinfeção com bocavírus felino, deste estudo.

Categoria	N. Testados (n=83)	Ocorrência de CPPV-1 (n=36)	Identificação da Variante (n=4)	Coinfeção por FBoV	
				N. testados (n=73)	Com coinfeção (n=7)
G1	44 [†]	18 (40,9%)	2 FPV e 1 CPV2b	39	3
G2	39 ^{††}	18 (46,1%)	1 FPV	34	4
G2	N. Testados (n=39)	Ocorrência de CPPV-1 (n=18)	Identificação da Variante (n=1)	Coinfeção por FBoV	
				N. testados (n=34)	Com coinfeção (n=4)
Abrigo 1	9	5 (55,5%)	-	5	0
Abrigo 2	9 ^{††}	7 (77,7%)	1 FPV	5	4
Abrigo 3	3	0	-	0	-
Abrigo 4	2	0	-	0	-
Abrigo 5	3	1 (33,3%)	-	1	-
Abrigo 6	1	0	-	1	0
Abrigo 7	1	0	-	1	0
Ninhada 1	2	1 (50,0%)	-	1	0
Ninhada 2	3	0	-	0	-
Ninhada 3	2	0	-	0	-
Ninhada 4	4	4 (100%)	-	0	-

Nota: [†]Animais que vieram a óbito (a quantidade de símbolos corresponde ao número de gatos). Abreviação: FBoV (bocavírus felino).

A ocorrência de CPPV-1 foi maior em animais com até quatro meses de idade no G1, enquanto no G2, todos animais infectados tinham até oito meses. Quase metade dos animais dos animais positivos de ambos os grupos, tinham acesso à rua (Tabela 3).

Os dois animais positivos e vacinados, tinham recebido apenas a primeira dose ainda, pois tinham entre dois e três meses de idade. Os dois animais negativos que haviam sido vacinados, um tinha 11 meses de idade e possuía a vacinação completa com reforço aos seis meses, enquanto o outro tinha 12 meses de idade e recebeu apenas a primeira dose da vacina. Nove animais do G1 não tinham histórico de vacinação e foram classificados como “não vacinados”. Nenhum animal do G2 foi vacinado (Tabela 3).

Tabela 3. Ocorrência de *Carnivore protoparvovirus-1* de acordo com as diferentes variáveis (idade, sexo, acesso à rua e vacinação) e apresentação do número médio de contactantes caninos e felinos de cada grupo.

CAT	Idade (meses)			Sexo		Acesso à rua		Vacina		Contactantes Média [§] (mín-máx) ; N [¶]	
	1-4	5-8	9-12	M	F	Com	Sem	Com	Sem	Caninos	Felinos
G1 n=44	67% 14/21	17% 2/12	18% 2/11	40% 10/25	42% 8/19	46% 11/24	35% 7/20	50% 2/4	40% 16/40	0,5 (0-6); 36	1,2 (0-5); 37
G2 n=39	52% 12/23	46% 6/13	0/3	39% 11/28	66% 7/11	46% 18/39	0	0	46% 18/39	3,6 (0-11); 39	25,7 (1-55); 39
G2	Idade (meses)			Sexo		Acesso à rua		Vacina		Contactantes	
	1-4	5-8	9-12	M	F	Com	Sem	Com	Sem	Caninos	Felinos
A 1 n=9	1/4	4/5	0/0	1/4	4/5	5/9	0/0	0/0	5/9	2	55
A 2 n=9	7/8	0/1	0/0	5/7	2/2	7/9	0/0	0/0	7/9	11	25
A 3 n=3	0/2	0/1	0/0	0/3	0/0	0/3	0/0	0/0	0/3	1	25
A 4 n=2	0/1	0/1	0/0	0/2	0/0	0/2	0/0	0/0	0/2	2	40
A 5 n=3	0/0	1/3	0/0	1/3	0/0	1/3	0/0	0/0	1/3	2	9
A 6 n=1	0/1	0/0	0/0	0/1	0/0	0/1	0/0	0/0	0/1	0	20
A7 n=1	0/1	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0	0/0	0/1	9	11
Ni 1 n=2	0/0	1/2	0/0	1/1	0/1	1/2	0/0	0/0	1/2	0	14
Ni 2 n=3	0/0	0/0	0/3	0/3	0/0	0/3	0/0	0/0	0/3	0	11
Ni 3 n=2	0/2	0/0	0/0	0/1	0/1	0/2	0/0	0/0	0/2	0	1
Ni 4 n=4	4/4	0/0	0/0	3/3	1/1	4/4	0/0	0/0	4/4	0	4

Nota: [§]Média aritmética do número de contactantes; [¶]Número de animais totais em que se obteve os dados de número de contactantes. Abreviações: CAT (categoria); A (abrigo); Ni (ninhada); M (macho), F (fêmea), mín (número mínimo) e máx (número máximo).

De todas as amostras positivas para CPPV-1, apenas quatro sequências do gene VP2 completo foram obtidas e submetidas ao GenBank (números de acesso: OQ618260 a OQ615264). Três pertenciam ao G1 e uma ao G2. Três amostras foram identificadas como FPV e uma como CPV-2b (Figura 1), não considerando apenas o resíduo de aminoácido 426, que classificaria a amostra como CPV-2c (Tabela 5, Material Suplementar). Os dois animais positivos para CPPV-1 que vieram a óbito foram classificados como FPV, sendo que os dois também apresentaram coinfeção com FBoV e cada um deles pertencia a um grupo diferente (G1 e 2). Outras informações relevantes sobre gatos filhotes em que foi possível realizar o sequenciamento determinando a variante genética do CPPV-1 podem ser encontradas na Tabela 4.

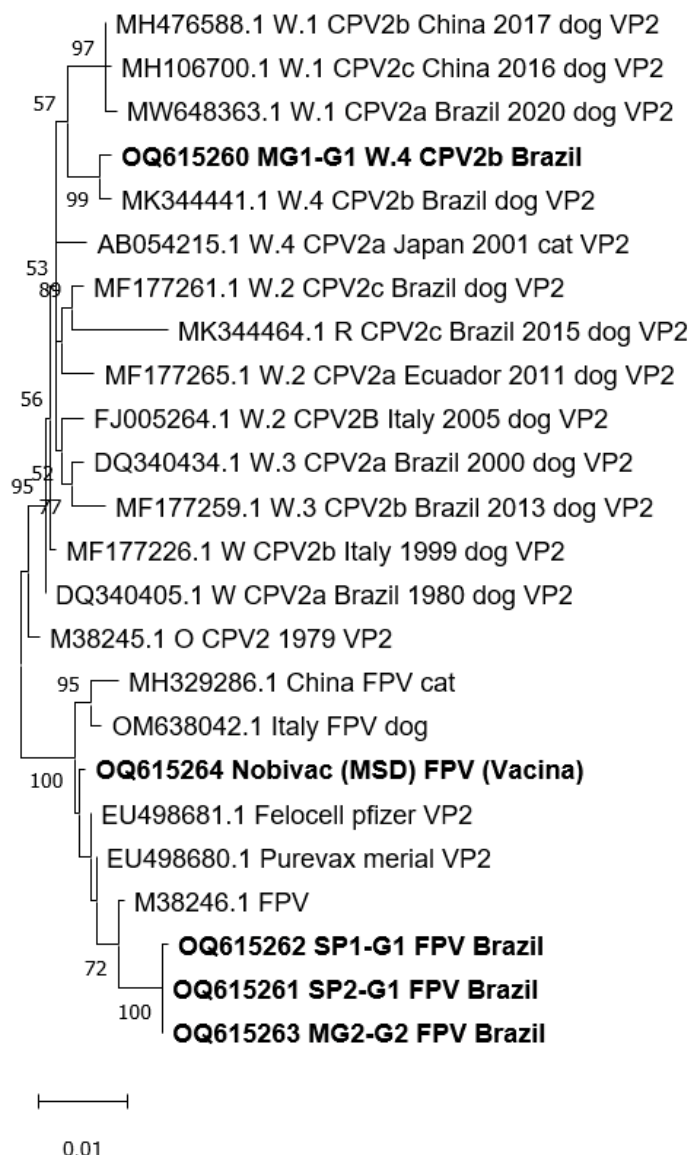


Figura 1. Árvore filogenética baseada no gene VP2 completo de *Carnivore protoparvovirus-1* (CPPV-1). Árvore filogenética de nucleotídeos (1.755 nt) inferida utilizando o método *Maximum Likelihood* e o modelo Tamura 3-parâmetros com 1.000 réplicas de *bootstrap* usando o *software* MEGA11. A porcentagem superior a 50% em que os táxons se agrupam é mostrada ao lado dos nós. A escala representa o número de substituições por região. Sequências de referências e de surtos recentes para FPV, sequências de diferentes clados de CPV e de vacinas já sequenciadas e disponíveis no GenBank foram utilizadas para construção da árvore. Bem como a vacina sequenciada e as variantes obtidas neste estudo, que estão destacadas em negrito. Abreviações: FPV (parvovírus felino); CPV (parvovírus canino).

Tabela 4. Resumo de informações clínico-epidemiológicas relevantes sobre os animais positivos para o sequenciamento genético de *Carnivore protoparvovirus-1*.

Gato	Sexo	Idade (meses)	Acesso à rua	Variante	Coinfecção com FBoV	Número de acesso (GenBank)
SP1-G1	Fêmea	8	Não	FPV	Sim	OQ615262
SP2-G1 [†]	Macho	3	Não	FPV	Sim	OQ615261
MG1-G1	Fêmea	11	Sim	CPV-2b	Sim	OQ615260
MG2-G2 [†]	Macho	1	Sim	FPV	Sim	OQ615263

Nota: [†]Gatos que vieram a óbito. Abreviações: SP (São Paulo); MG (Minas Gerais); G (Grupo).

Discussão

A emergência do vírus da panleucopenia felina é notável nos últimos anos e em diferentes países (VAN BRUSSEL et al., 2019; TANG et al., 2022; KARANAM et al., 2022; REHME et al., 2022). Filhotes não vacinados podem desenvolver doença grave e fatal quando infectados pelo CPPV-1 (BARRS, 2019; VAN BRUSSEL et al., 2019). No presente estudo, foi encontrada uma alta ocorrência (43,4%) da infecção na população de gatos filhotes com diarreia.

Há um artigo que relata a ocorrência do vírus da panleucopenia felina no Brasil, com uma ocorrência de 7,7 % (3/39), em gatos com diarreia crônica intermitente (MÓSENA et al., 2019). No entanto, os resultados deste estudo são os primeiros a demonstrar a presença do material genético do FPV e CPV, além da coinfecção por FBoV em gatos filhotes com diarreia em São Paulo e Minas Gerais, Brasil. Ademais, este estudo também destaca uma maior ocorrência (43,4%; 36/83) do CPPV-1 tanto em filhotes domiciliados atendidos em hospitais veterinários, quanto em animais de abrigos. A discrepância se deve ao fato dos animais do grupo de inclusão deste estudo ser direcionado aos gatos mais suscetíveis à doença (jovens) e também que apresentam a principal manifestação clínica (diarreia).

Na Austrália, foram relatados 610 casos de gatos com panleucopenia felina entre 2014 e 2018. De 399 casos em que dados sobre a idade foram obtidos, 84% eram filhotes, sendo 79% até seis meses de idade. Na Nova Zelândia, 365 casos foram relatados de dois surtos, o primeiro em 2016 (n=167) e o segundo em 2018 (n=198), 8% desses animais eram positivos. Nos Emirados Árabes Unidos, 14 gatos foram diagnosticados com panleucopenia felina (VAN BRUSSEL et al., 2019). Corrobora-se com dados desses estudos, em que 77,8% (14/18) e 66,7% (12/18) dos gatos positivos do G1 e G2, respectivamente, tinham até quatro meses de idade. O que foi mais próximo do encontrado na Índia em que foram avaliados gatos saudáveis (n=67) e de gatos com suspeita de FPV/CPV (n=10) e 42,86% (33/77) dos gatos foram positivos para FPV por PCR de amostras de fezes entre 2019 e 2020 (KARANAM et al., 2022).

Além disso, a cobertura vacinal inadequada foi bastante evidenciada por Van Brussel e colaboradores (2019). Na Austrália, 87% (531/610) não havia sido vacinada ou tinha histórico vacinal desconhecido. Na Nova Zelândia, a maioria (90%; 26/29) dentre os animais positivos, não havia sido vacinada ou recebeu apenas uma dose e nos Emirados Árabes Unidos, 92,8% (13/14) não eram vacinados (VAN BRUSSEL et al., 2019). O que também foi observado neste estudo, onde nenhum abrigo realizava a vacinação dos animais e apenas dois animais positivos do G1 eram vacinados e em ambos, não foi finalizado o protocolo vacinal. Evidenciando a baixa adesão da vacinação dos gatos, mesmo de animais domiciliados, possivelmente devido à falta de informação dos responsáveis quanto às vacinas essenciais.

Na Austrália, dos 610 casos, 87% dos gatos pertenciam a abrigos (VAN BRUSSEL et al., 2019). Porém, no presente estudo não foi observada diferença entre a ocorrência entre animais de abrigo ou da mesma ninhada (G2) em comparação ao

outro grupo (G1), provavelmente devido ao critério de inclusão do estudo (gatos filhotes com diarreia) somado à quatro dos sete abrigos não terem sido detectados com a circulação do vírus (Tabela 2). Além disso, quase metade dos animais positivos do G1 tinham acesso à rua. Jenkins e colaboradores (2020) relatam uma maior prevalência de anticorpos contra FPV em gatos com acesso à rua (94,5%; 239/253) quando comparado aos sem acesso (91,9%, 91/99), apesar de não haver diferença estatística.

Não obstante, recentemente, Bergmann e colaboradores (2019) relataram a excreção de parvovírus em 30% (12/40) gatos saudáveis após a vacinação com vírus atenuado, por meio de sequenciamento genético, observou-se o DNA do vírus vacinal de FPV em três gatos, o DNA do vírus FPV de campo em quatro gatos e o DNA de CPV de campo em um gato. No presente caso, apenas dois gatos positivos tinham histórico de ter recebido a primeira dose da vacina, e em ambos os casos não foi possível realizar o sequenciamento para distinção do vírus vacinal do de campo. Foi realizado o sequenciamento de apenas quatro amostras, provavelmente devido à baixa quantidade de material genético presente nas amostras, somada à possível presença de inibidores, que pode comprometer a amplificação de material genético, principalmente nos casos de maiores regiões, como no caso de sequenciamentos (SIDSTEDT et al., 2020).

Piewbang e colaboradores (2019) comunicaram a ocorrência de um surto associado à presença de FBoV em três diferentes abrigos de gatos na Tailândia, em 17 animais positivos para FPV. A causa estava inicialmente atribuída apenas ao FPV, porém posteriormente foi detectado FBoV. Do total de gatos, 13 vieram a óbito e três deles foram necropsiados. Em análises imunohistoquímicas foi observada a presença de antígenos de ambos os vírus nas criptas intestinais, porém os antígenos de FPV

foram detectados em menores níveis quando comparados aos de FBoV. Demonstrou-se o possível sinergismo entre os vírus. No presente estudo, sete animais positivos para FPV também foram positivos para FBoV, três do G1 e quatro do G2. Dos três gatos que morreram nesse estudo, dois deles tinham coinfecção por FBoV, cada um deles de um grupo, corroborando com a possibilidade de sinergismo entre os vírus.

Porporato e colaboradores (2018) sugeriram que a infecção por FPV em abrigos de gatos possui prognóstico desfavorável. Esse estudo avaliou a ocorrência de um surto de FPV em abrigo de gatos na Itália em 2010 que persistiu por três anos. Foram revisados os dados de 177 gatos que foram atendidos em hospitais veterinários, incluídos no estudo por apresentarem-se positivos para antígeno fecal de FPV e que fossem provenientes de abrigo. A taxa de mortalidade desses animais foi de 79,7% (141/177). O que não foi observado no presente estudo, onde 8,3% (3/36) dos animais positivos para FPV morreram, uma taxa bastante inferior. Altas taxas de anticorpos são encontrados em animais adultos, sugerindo que a infecção subclínica é comum nesses (BARRS, 2019), mas também, que a maioria dos gatos eventualmente entram em contato com o agente e que a presença da manifestação clínica da doença é mais evidente em animais mais jovens (VAN BRUSSEL et al., 2019), como no presente estudo. Ainda, levanta-se a hipótese da passagem de anticorpos maternos para os filhotes, devido à alta ocorrência do vírus nos locais avaliados, conferindo certa proteção no momento de maior susceptibilidade, o que justificaria a baixa taxa de mortalidade.

Existem evidências da co-circulação de diferentes variantes e subtipos de CPV em cães no Brasil nas últimas décadas (STRECK et al., 2009; MONTEIRO et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019) e relatos da infecção do mesmo em gatos em países como Alemanha (TRUYEN et al., 1996), Japão (MOCHIZUKI et al., 1996), Vietnã

(IKEDA et al., 2000), Índia (MUKHOPADHYAY et al., 2017), Itália (BALBONI et al., 2018; CARRAI et al., 2021), Tailândia (CHAROENKUL et al., 2019) e Espanha (CALATAYUD et al., 2020). Neste estudo, não foi possível realizar o sequenciamento genético em mais do que quatro amostras positivas. Porém, com o sequenciamento disponível, observou-se a presença de FPV e CPV, notabilizando a circulação de CPPV-1 no país, além de ser a primeira evidência de variantes caninas infectando gatos no Brasil.

As sequências de FPV deste estudo agruparam-se em um mesmo clado, distinto de outros como o encontrado em gato na China (LI et al., 2018) ou a ocorrência de FPV em cão na Itália (DIAKOUDI et al., 2022). No entanto, apesar de se apresentarem em um mesmo grupo de clados das vacinas disponíveis comercialmente no mercado brasileiro, a porcentagem entre os agrupamentos dos em que os táxons se agrupavam foi inferior a 50%. Portanto, levanta-se a hipótese das vacinas disponíveis protegerem, efetivamente ou não, os gatos das variantes virais que ocorrem no Brasil.

A sequência de CPV obtida no presente estudo compartilhou alto grau de identidade de aminoácidos com variantes de referência (Tabela 5; Material Suplementar). O resíduo do aminoácido 426 foi definido como principal local para mutação para evolução do CPV-2 e suas variantes, sendo deveras importante para sua classificação (MIRANDA & THOMPSON, 2016). De acordo com a análise do resíduo do aminoácido 426, o CPV desse estudo seria classificado como CPV-2c. Porém, para compreensão da disseminação de variantes virais de CPV-2, foi proposta uma nova classificação de acordo com a análise filogenética do gene VP2, separada por diferentes clados (R, W, W.1-4) (DE OLIVEIRA SANTANA et al., 2022). De acordo com a análise filogenética, a amostra CPV-positiva desse estudo pertence ao clado

W.4 CPV-2b. As sequências relatadas de CPV-2 do clado W.4 pertencem a quatro diferentes continentes: Europa (n=32), América do Sul (n=12), América do Norte (n=2) e Ásia (n=3) com amostras coletadas desde 1990, mas a maioria (n=39) na primeira década do século XXI (DE OLIVEIRA SANTANA et al., 2022).

Conclusão

Esse estudo relatou a ocorrência do *Carnivore protoparvovirus-1* em gatos filhotes com diarreia, provenientes de abrigos ou não, no Brasil. Além de evidenciar presença das variantes felina (parvovírus felino) e canina (parvovírus canino). Demonstrando a importância de a infecção por esses vírus ser considerada no diagnóstico diferencial no Brasil.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados de sequenciamento do presente estudo estão disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideunder>) através dos números de acesso: OQ615260 a OQ615264.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Marcelo M. Gomes e Isabelle E. Pedrosa por todo o auxílio laboratorial prestado.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse com relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Financiamento

Parte desse estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código 001.

Declaração de consentimento

A declaração de consentimento informado (verbal ou escrito) foi obtido do tutor ou responsável legal de todos os animais descritos neste trabalho (animais experimentais ou não experimentais) para o(s) procedimento(s) realizado(s) (estudos prospectivos ou retrospectivos). Nenhum animal ou ser humano é identificável nesta publicação e, portanto, consentimento informado adicional para publicação não foi necessário.

Referências

BALBONI, A. et al. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1356-9>.

BARRS, V. R. Feline panleukopenia: a re-emergent disease. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p. 651-670, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.006>.

BERGMANN, M. et al. Faecal shedding of parvovirus deoxyribonucleic acid following modified live feline panleukopenia virus vaccination in healthy cats. **Veterinary Record**, v. 185, n. 3, p. 83-83, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.104661>.

BUONAVOGLIA, C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 12, p. 3021-3025, 2001.

CAPOZZA, P. et al. Emerging Parvoviruses in Domestic Cats. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1077, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13061077>.

CARRAI, M. et al. Canine parvovirus is shed infrequently by cats without diarrhoea in multi-cat environments. **Veterinary Microbiology**, v. 261, p. 109204, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109204>.

CALATAYUD, O. et al. Genetic characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish wildlife reveals domestic dog and cat-related sequences. **Transboundary and emerging diseases**, v. 67, n. 2, p. 626-634, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13378>.

CHAROENKUL, K. et al. Emergence of canine parvovirus type 2c in domestic dogs and cats from Thailand. **Transboundary and emerging diseases**, v. 66, n. 4, p. 1518-1528, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13177>.

COTMORE, S. F. et al. ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Parvoviridae*. **Journal of General Virology**, v. 100, p. 367-368, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001212>.

COTMORE, S. F. et al. The family *Parvoviridae*. **Archives of Virology**, v. 159, p.1239–1247, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>.

DAY, M. J. et al. Recomendações sobre a vacinação para médicos veterinários de pequenos animais da América Latina: um relatório do Grupo de Diretrizes de Vacinação da WSAVA. **Journal of Small Animal Practice**, p. 1-39, 2020.

DECARO, N. et al. Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 9, p. 2290-2298, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001503-0>.

DE OLIVEIRA, P. S. B. et al. New variants of canine parvovirus in dogs in southern Brazil. **Archives of virology**, v. 164, n. 5, p. 1361-1369, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04198-w>.

DE OLIVEIRA SANTANA, W. et al. Molecular phylogenetic assessment of the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 98, p. 105225, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105225>.

DIAKOUDI, G. et al. Feline Panleukopenia Virus in Dogs from Italy and Egypt. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 9, p. 1933-1935, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2809.220388>.

DIAKOUDI, G. et al. Identification of a novel parvovirus in domestic cats. **Veterinary microbiology**, v. 228, p. 246-251, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.006>.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Brazilian Agricultural Research Corporation, EMBRAPA). **Genetic resources and biotechnology: Electropherogram**. EMBRAPA, 2022. Disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.

GOOKIN, J. L. et al. Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 783-787, 2007. DOI: [10.2460/ajvr.68.7.783](https://doi.org/10.2460/ajvr.68.7.783).

GRECCO, S. et al. Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South

America. **Virus evolution**, v. 4, n. 1, p. vey011, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vey011>.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

IKEDA, Y. et al. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. **Virology**, v. 278, p. 13–19, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0653>.

International Society of Infectious Diseases. **Feline panleukopenia**. ProMED-mail Web site, 2022. Disponível em: <https://promedmail.org/promed-posts/>.

JANKE, K. J. et al. Fecal viral DNA shedding following clinical panleukopenia virus infection in shelter kittens: a prospective, observational study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 24, n. 4, p. 337-343, 2022. DOI: [10.1177/1098612X211023056](https://doi.org/10.1177/1098612X211023056).

JENKINS, E. et al. Feline parvovirus seroprevalence is high in domestic cats from disease outbreak and non-outbreak regions in Australia. **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 320, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12030320>.

KARANAM, B. et al. Phylodynamic and genetic diversity of parvoviruses of cats in southern India. **Virus Disease**, v. 33, n. 1, p. 108-113, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00760-4>.

KUMAR, M. & NANDI, S. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *Journal of Virological Methods*, v. 169, p. 198–201, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.05.011>.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.06.007>.

LI, X. et al. Genetic characterization of parvoviruses in domestic cats in Henan province, China. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 6, p. 1429-1435, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13014>.

LI, Y. et al. Virome of a feline outbreak of diarrhea and vomiting includes bocaviruses and a novel chapparvovirus. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 506, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12050506>.

LIU, C. et al. Molecular and serological investigation of cat viral infectious diseases in China from 2016 to 2019. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 6, p. 2329-2335, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13667>.

MIRANDA, C. & THOMPSON, G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 9, p. 2043-2057, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>.

MOCHIZUKI, M. et al. Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2101-2105, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2101-2105.1996>.

MONTEIRO, K. et al. Viral type characterization and clinical aspects of canine parvovirus in naturally infected dogs in São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 1181-1185, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001200007>.

MÓSENA, A. C. S. et al. Detection of enteric agents into a cats' shelter with cases of chronic diarrhea in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 630-634, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5987>.

MUKHOPADHYAY, H. K. et al. Molecular characterisation of parvoviruses from domestic cats reveals emergence of newer variants in India. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 19, n. 8, p. 846-852, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X16661375>.

NIU, J. T. et al. Prevalence and molecular characterization of parvovirus in domestic kittens from Northeast China during 2016-2017. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 3, p. 145-155, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14943/jjvr.66.3.14>.

PESAVENTO, P. A. & MURPHY, B. G. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 478-491, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985813511129>.

PIEWBANG, C. et al. Feline bocavirus-1 associated with outbreaks of hemorrhagic enteritis in household cats: potential first evidence of a pathological role, viral tropism and natural genetic recombination. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52902-2>.

PORPORATO, F. et al. Survival estimates and outcome predictors for shelter cats with feline panleukopenia virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 2, p. 188-195, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.253.2.188>.

REHME, T. et al. Feline Panleukopenia Outbreaks and Risk Factors in Cats in Animal Shelters. **Viruses**, v. 14, n. 6, p. 1248, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14061248>.

SCHIRÒ, G. et al. Antimicrobial Resistance (AMR) of Bacteria Isolated from Dogs with Canine Parvovirus (CPV) Infection: The Need for a Rational Use of Antibiotics in

Companion Animal Health. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 142, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020142>.

SIDSTEDT, M.; RÅDSTRÖM, P.; HEDMAN, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 412, n. 9, p. 2009-2023, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>.

STRECK, A. F. et al. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 465-469, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300008>.

STONE, A. E. S. et al. 2020 AAHA/AAFP feline vaccination guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 56, n. 5, p. 249-265, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7123>.

TANG, Y. et al. Molecular characteristics and genetic evolutionary analyses of circulating parvoviruses derived from cats in Beijing. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03281-w>.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 678–687, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>.

TAMURA, K. et al. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, p. 3022–3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TRUYEN, U.; PLATZER, G.; PARRISH, C. R. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. **The Veterinary Record**, v. 138, n. 15, p. 365, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.138.15.365>.

VAN BRUSSEL, K. et al. Distinct lineages of feline parvovirus associated with epizootic outbreaks in Australia, New Zealand and the United Arab Emirates. **Viruses**, v. 11, p. 1155, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11121155>.

Material Suplementar

Tabela 5. Diferenças nos resíduos de aminoácidos da proteína do capsídeo VP2 do protoparvovírus dos carnívoros (CPPV-1) e de vacinas disponíveis no mercado brasileiro em comparação às sequências encontradas no presente estudo

Variante/hospedeiro	Resíduos de Aminoácidos															Referência
	80	87	93	101	103	232	297	300	305	323	375	426	562	564	568	
FPV (M38246.1) - <i>Felis catus</i>	K	M	K	I	V	V	S	A	D	D	D	N	V	N	A	Parrish et al., 1991
CPV-2 (M38245.1) - <i>Canis lupus familiaris</i>	R	M	N	I	A	I	S	A	D	N	N	N	V	S	G	Parrish et al., 1991
CPV-2a (MT981029.1) - <i>Canis lupus familiaris</i>	R	L	N	T	A	I	A	G	Y	N	D	N	V	S	G	Schirò et al., 2022
CPV-2b (MT981028.1) - <i>Canis lupus familiaris</i>	R	L	N	T	A	I	A	G	Y	N	D	D	V	S	G	Schirò et al., 2022
CPV-2c (MF177250.1) - <i>Canis lupus familiaris</i>	R	L	N	T	A	I	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	Grecco et al., 2018
Purevax (EU498680.1) - Vacina: Merial	K	M	K	I	V	I	S	A	D	D	D	N	L	N	A	Decaro et al., 2008
Felocell (EU498681.1) - Vacina: Pfizer	K	M	K	T	V	I	S	A	D	D	D	N	L	N	A	Decaro et al., 2008
Nobivac (OQ615264) - Vacina: MSD	K	M	K	T	V	I	S	A	D	D	D	N	L	N	A	Esse estudo
FPV (OQ615262) - <i>Felis catus</i>	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	D	N	V	N	A	Esse estudo
FPV (OQ615261) - <i>Felis catus</i>	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	D	N	V	N	A	Esse estudo
CPV2a (OQ615260) - <i>Felis catus</i>	R	L	N	T	A	I	N	G	Y	N	D	E	V	S	G	Esse estudo
FPV (OQ615263) - <i>Felis catus</i>	K	M	K	T	V	V	S	A	D	D	D	N	V	N	A	Esse estudo

Nota: As regiões destacadas em cinza representam os locais onde ocorreram mutações.

ANEXOS

ANEXO 1 - Normas Journal of Feline Medicine and Surgery



Impact Factor: **1.971**

5-Year Impact Factor: **2.162**

Submission guidelines



Submit paper

Please read the guidelines below before visiting the submission site!

[Submission site](#) 

Manuscript Submission Guidelines:

Manuscript Submission Guidelines:

Please read the guidelines below and then visit the Journal's submission site <https://mc.manuscriptcentral.com/jfms> to upload your manuscript. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned.

Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scope of the *Journal of Feline Medicine and Surgery* will be reviewed.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you.

1. [Article types](#)
2. [Editorial policies](#)
 - 2.1 [Peer review policy](#)
 - 2.2 [Authorship](#)

[Privacy](#)

- 2.3 [Acknowledgments](#)
- 2.4 [Declaration of conflicting interests](#)
- 2.5 [Funding](#)
- 2.6 [Clinical and research ethics, and informed consent](#)
- 2.7 [Reporting guidelines](#)
- 2.8 [Data](#)
- 3. [Publishing policies](#)
 - 3.1 [Publication ethics](#)
 - 3.2 [Contributor's publishing agreement](#)
 - 3.3 [Open Access and](#)
 - [3.4 Author archiving](#)
 - 3.5 [Permissions](#)
- 4. [Preparing your manuscript for submission](#)
 - 4.1 [Formatting](#)
 - 4.2 [Artwork, figures, other graphics and tables](#)
 - 4.3 [Style guide](#)
 - 4.4 [Abbreviations, symbols, and drug names](#)
 - 4.5 [Supplementary material](#)
 - 4.6 [Reference style](#)
 - 4.7 [Reference interval guidelines](#)
 - 4.8 [English language editing services](#)
 - 4.9 [Disclaimer](#)
- 5. [Submitting your manuscript](#)
 - 5.1 [ORCID](#)
 - 5.2 [Information required for completing your submission](#)
- 6. [On acceptance and publication](#)
 - 6.1 [SAGE production](#)
 - 6.2 [Access to your published article](#)
 - 6.3 [OnlineFirst publication](#)
- 7. [Further information](#)

This Journal is a member of the [Committee on Publication Ethics](#)

This Journal recommends that authors follow the [Recommendations for the Conduct,](#)

[Reporting, Editing, and Publication of Scholarly work in Medical Journals](#) formulated by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)

JFMS will be a Gold Open Access journal from the beginning of 2023. To facilitate the transition, an article processing charge (APC) is now in place. See section 3.3 for more details.

[Back to top](#)

1. Article types

Journal of Feline Medicine and Surgery (JFMS) considers manuscripts submitted in the following formats.

Original Articles

Papers should be as concise as possible, and generally not exceed 3,000 words (excluding references). Each paper should have a self-contained Abstract (up to 300 words, structured with subheadings as detailed in [Preparing your manuscript](#)), followed by Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, Conflict of Interest, Funding, Ethical Approval and Informed Consent statements, and References. Note that Original Articles on well-recognised diseases that report valuable national or regional data on disease prevalence, or other relevant data, should be submitted to the sister journal, the *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports* (jfmsopenreports.com) as a Short Communication. The manuscript submission guidelines for *JFMS Open Reports* can be found [here](#).

Review Articles

Offers of reviews and topics for consideration should be directed to the Editors, via the editorial office (jfms@icatcare.org), for initial editorial approval. Reviews should provide an update on recent advances in a particular field and the length should not generally exceed 4,000 words. They should include an abstract (up to 300 words), followed by subheadings directed by the content, as well as Conclusions, Acknowledgements, Conflict of Interest, Funding, Ethical Approval and Informed Consent statements, and References.

Short Communications

Short communications reporting relevant research or sufficiently substantial pilot studies are considered for *JFMS*. They should generally not exceed 1,500 words. They should include a self-contained Abstract (up to 300 words, structured with subheadings as detailed in [Preparing your manuscript](#)), followed by Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, Conflict of Interest, Funding, Ethical Approval and Informed Consent statements, and References.

Short Communications of national or regional significance (eg, reporting regional data relating to well-recognised diseases) should be submitted to the sister journal, the *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports* (jfmsopenreports.com) – the manuscript submission guidelines for which can be found [here](#).

Case Series

Large (minimum of four cases) prospective and retrospective case series are considered for *JFMS*. Depending on the information contained, a Case Series may be up to 2,500 words in length. It should include a brief Abstract (up to 300 words structured with subheadings detailed in [Preparing your manuscript](#)) followed by Introduction (optional), Case series description, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, Conflict of Interest, Funding, Ethical Approval and Informed Consent statements, and References. Small case series (up to three cases) and individual case reports that provide novel information should be submitted to the *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports* – the manuscript submission guidelines for which can be found [here](#).

Letters to the Editor

Letters commenting on papers recently published in *JFMS* will be considered for publication in the journal. Letters should not exceed 1,000 words (including references and one table or figure). The Editors may send the letter to the authors of the original paper for comment so that both letter and reply may be published together.

Manuscripts should be clearly labelled 'Original Article', 'Review Article', 'Short Communication', 'Case Series' or 'Letter to the Editor'.

Table 1. Overview of the requirements for manuscript submission to *JFMS*

Article type	Abstract	Main text word limit	References	Figures/Tables
Original Articles	300 words	3,000 words*	As necessary	As necessary
Review Articles	300 words	4,000 words*	As necessary	As necessary
Short Communications	300 words	1,500 words*	As necessary	As necessary

Case Series	300 words	2,500 words*	As necessary	As necessary
Letters to the Editor	None	1,000 words**	As necessary	Either one table or figure

*Excludes abstract, references, tables and legends

**Includes references, tables and legends

Journal of Feline Medicine and Surgery Resident Best Paper Award

The award recognises quality and excellence for early career authors who publish in *JFMS*. Authors who are in a recognised veterinary residency programme (eg, ABVS, EBVS and ANZCVS residency) *at the time of submission of their paper* will automatically be eligible for consideration for the award, subject to its acceptance for publication. Accepted papers will be considered for the award in the year in which they are published. Details about this award for interested residents and resident supervisors can be found [here](#).

[Back to top](#)

2. Editorial policies

2.1 Peer review policy

JFMS operates a single-blinded peer review process in which the reviewer's name is withheld from the author. The reviewer may at their own discretion opt to reveal their name to the author in their review but our standard policy is for the reviewer's identity to remain concealed. Each manuscript is reviewed by at least two referees. All manuscripts are reviewed as rapidly as possible, and an editorial decision is generally reached within 6–8 weeks of submission. Generally, *JFMS* does not accept more than two revisions to a paper.

2.2 Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors. Corresponding authors should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors. The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

Privacy

1. Made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data,
2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content,
3. Approved the version to be published.
4. Have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Authors should meet the conditions of all of the points above. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship. All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgements section (see 2.3 below). Please refer to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) authorship guidelines](#) for more information on authorship.

2.3 Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help (see also section 2.2).

2.3.1 Third party submissions

Where an individual who is not listed as an author submits a manuscript on behalf of the author(s), a statement must be included in the Acknowledgements section of the manuscript and in the accompanying cover letter. The statements must:

- Disclose this type of editorial assistance – including the individual's name, company and level of input
- Identify any entities that paid for this assistance
- Confirm that the listed authors have authorized the submission of their manuscript via third party and approved any statements or declarations, e.g. conflicting interests, funding, etc.

Where appropriate, SAGE reserves the right to deny consideration to manuscripts submitted by a third party rather than by the authors themselves.

2.3.2 Writing assistance

Individuals who provided writing assistance (eg, from a specialist communications company) do not qualify as authors and so should be included in the Acknowledgements section. Authors must disclose any writing assistance – including the individual's name, company and level of input – and identify the entity that paid for this assistance.

It is not necessary to disclose the use of language polishing services.

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Conflict of Interest statement.

2.3.2 Prior presentation at conferences

Details of any prior presentation of study findings/results at conferences or meetings should be included in an 'Author note' section after the 'Acknowledgements' and before the 'Conflict of Interest' statement.

2.4 Declaration of conflicting interests

It is the policy of *JFMS* to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles. Please ensure that a 'Conflict of Interest' statement is included at the end of your manuscript, after any acknowledgements and before the 'Funding' statement. If no conflict exists, please state that 'The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article'.

For guidance on conflict of interest statements, please see the ICMJE recommendations [here](#).

2.5 Funding

JFMS requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate 'Funding' heading. Please visit the [Funding Acknowledgements](#) page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding, or state that: 'The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.'

2.6 Clinical and Research Ethics, and Informed Consent

Prior to undertaking studies and prior to submitting a manuscript to *JFMS*, authors should read these guidelines to ensure requirements have been adequately met.

Circumstances relating to the use of animals in clinical and experimental studies must meet international standards as set out in:

[Privacy](#)

- The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985) from the Council for International Organizations of Medical Sciences, available at <https://cioms.ch/shop/product/international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals-2/> (or from the Executive Secretary CIOMS, % WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland)
- The ARRIVE Guidelines, available at <https://arriveguidelines.org/>

In addition to the above, for manuscripts submitted to JFMS, the Editors would not normally support publication of:

- Any experimental studies directly resulting in euthanasia of the cats.
- Studies using non-experimental (eg, client-owned) cats that may cause the cat a level of pain, suffering, distress or harm higher than that induced by inserting a hypodermic needle, and/or where the procedure is not part of 'Recognised Veterinary Practice'. Recognised Veterinary Practice would include investigations, procedures and therapies that are part of normal clinical practice and that would be of direct benefit for the individual cat (or potentially to the group to which it immediately belongs). Where investigations, procedures or therapies are unproven, or where there is deliberate exposure of cats to procedures or interventions that might be deleterious to their health without direct clinical benefit to them, it is highly likely that experimental cats should be used with appropriate attention to their health and welfare, with the requisite ethical approval (see below). If authors are in any doubt, they are encouraged to contact the Editors prior to manuscript submission.

The Editors would also expect that for all manuscripts submitted:

- Where appropriate, analgesia, sedation and/or anaesthesia must have been used and the authors should have adequately discussed the use of analgesia for the welfare of the cats involved.
- Any drugs or therapeutic agents used must have been obtained legally and ethically, following all relevant locally applicable regulations.
- Research involving experimental animals must always have received prior approval from an appropriate ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted, and this may also apply to some studies involving client-owned animals (see 2.6.1 Ethical approval).

The Editors reserve the right to reject manuscripts on ethical or welfare grounds when, in their opinion, studies involve unnecessary pain, distress, suffering, harm, or potential harm to animals; and where the above guidelines have not been followed.

2.6.1 Ethical Approval

All material published in JFMS must adhere to high ethical standards concerning animal welfare and meet with the above guidelines. Irrespective of the nature of the work (eg, prospective, retrospective or experimental studies, case series or review), JFMS requires all authors to make one of the following four ethical approval declarations (using the exact wording) in an 'Ethical approval' section at the end of their manuscript, stating:

a) The work described in this manuscript involved the use of non-experimental (owned or unowned) animals. Established internationally recognised high standards ('best practice') of veterinary clinical care for the individual patient were always followed and/or this work involved the use of cadavers. Ethical approval from a committee was therefore not specifically required for publication in JFMS. Although not required, where ethical approval was still obtained, it is stated in the manuscript

b) The work described in this manuscript involved the use of non-experimental (owned or unowned) animals and procedures that differed from established internationally recognised high standards ('best practice') of veterinary clinical care for the individual patient. The study therefore had prior ethical approval from an established (or ad hoc) committee as stated in the manuscript.

- *This statement might, for example, apply to randomised and/or controlled trials (including where established interventions are being compared with each other), as well as studies where novel medications, techniques, devices or interventions established as safe but not currently part of 'Recognised Veterinary Practice' (see 2.6 Clinical and research ethics, and informed consent) are used.*
- *Authors must state in the Materials and methods the nature of the institutional, national or international ethical review body used, and, if available, the ethical approval number.*
- *If an existing ethical review body was not available, authors should state why in the Materials and methods, and should describe the nature of an ad hoc committee that was used (which must have included at least some individuals independent of the institute[s]/clinic[s] involved in the work).*

c) The work described in this manuscript involved the use of experimental animals and the study therefore had prior ethical approval from an established (or ad hoc) committee as stated in the manuscript.

- *Authors must state in the Materials and methods the nature of the institutional, national or international ethical review body used, and, if available, the ethical approval number.*

- *If an existing ethical review body was not available, authors should state why in the Materials and methods, and should describe the nature of an ad hoc committee that was used (which must have included at least some individuals independent of the institute[s]/clinic[s] involved in the work).*

d) This work did not involve the use of animals and therefore ethical approval was not specifically required for publication in JFMS.

- *Authors may select this option if, for example, the manuscript is solely a clinical review or clinical guidelines using previously published data, or reports on questionnaire or in vitro findings. This statement is not suitable for manuscripts containing novel animal-specific data (including retrospective studies).*

For any queries regarding the best-fit statement, please contact jfms@icatcare.org.

2.6.2 Informed consent and informed consent for publication

JFMS requires all authors to make one of the following two informed consent declarations (using the exact wording below) in an 'Informed consent' section at the end of their manuscript, stating:

a) Informed consent (verbal or written) was obtained from the owner or legal custodian of all animal(s) described in this work (experimental or non-experimental animals, including cadavers) for all procedure(s) undertaken (prospective or retrospective studies).

b) This work did not involve the use of animals (including cadavers) and therefore informed consent was not required.

- *Authors may select this option if, for example, the manuscript is solely a clinical review or clinical guidelines using previously published data, or reports on questionnaire or in vitro findings, and does not involve the publication of any novel animal-specific data.*

In addition to informed consent for use of animals within a study, informed consent for publication is required where any animal or person may be identifiable as a result of the publication (eg, a recognisable photograph, description or unique identifiable features, etc). Authors are therefore required to also state within the 'Informed consent' section either:

a) For any animals or people individually identifiable within this publication, informed consent (verbal or written) for their use in the publication was obtained from the people involved.

b) No animals or people are identifiable within this publication, and therefore additional informed consent for publication was not required.

2.7 Reporting guidelines

Authors and researchers are encouraged to consult the relevant [EQUATOR Network](#) reporting guidelines for different studies, including, for example, the [Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\)](#) for randomized controlled trials. Other resources can be found at [NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives](#)

2.8 Data

JFMS requests that any primary data used by authors in their research article is published as Supplementary material, or that detailed information is provided in the article on how the data can be obtained. This information should include links to third-party data repositories or detailed contact information for third-party data sources. Data available only on an author-maintained website will need to be loaded onto either the journal's platform or a third-party platform to ensure continuing accessibility. Examples of data types include (but are not limited to) statistical data files, replication code, text files, audio files, images, videos, appendices, and additional charts and graphs necessary to understand the original research. The Editors may consider limited embargoes on proprietary data. The Editors can also grant exceptions for data that cannot legally or ethically be released. All data submitted should comply with Institutional or Ethical Review Board requirements and applicable government regulations. For further information, please contact Lucinda Periac-Arnold (lucinda.periacarnold@sagepub.co.uk), Publishing Editor at SAGE Publications.

[Back to top](#)

3. Publishing policies

3.1 Publication ethics

SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [SAGE Author Gateway](#).

3.1.1 Plagiarism

JFMS and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of published articles. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted a [Privacy](#)

may be checked with duplication-checking software. Where an article, for example, is found to have plagiarised other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article; taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; or taking appropriate legal action.

3.2 Contributor's publishing agreement

Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement, which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the societies. For more information, please visit our [Frequently Asked Questions](#).

3.3 Open Access

JFMS will be published in Gold Open Access from the beginning of 2023 and an article processing charge (APC) is now in place. This APC, which is payable after acceptance and before publication, covers the cost of publication and ensures that the article will be freely available online in perpetuity under a Creative Commons license. The full APC will be 1800 USD. Until 4 July 2023, a 50% discount will apply to all papers. After 4 July 2023, a 22% discount will be in place for authors who are a member of ISFM or AAFP. The APC may be subject to VAT/TAX.

For more information relating to *JFMS* becoming open access, visit the [FAQs page](#). For more information on Open Access publishing options at SAGE please visit [SAGE Open Access](#).

3.4 Author archiving

For information on funding body compliance, and depositing your article in repositories, please visit [SAGE's Author Archiving and Re-Use Guidelines](#) and [Publishing Policies](#).

3.5 Permissions

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For

further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#).

[Back to top](#)

4. Preparing your manuscript for submission

This section explains how to format, style and reference your paper for JFMS. The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your Abstract and select your keywords by visiting the [SAGE Journal Author Gateway](#) for guidelines on [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

4.1 Formatting

The preferred format for your manuscript is Word. LaTeX files are also accepted. Word and LaTeX templates are available on the [Manuscript Submission Guidelines](#) page of our Author Gateway.

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3 cm for left and right hand margins and 5 cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point. All lines should be numbered on manuscripts using continuous line numbering. Figures, tables and Supplementary material should all be cited in the text in numerical order.

Title page

The first page of the manuscript should list the title (which should be concise [20 words maximum] and contain no abbreviations), the authors' institutional addresses, the corresponding author's email address and postnominals, and the article's keywords (a minimum of four, not including 'cat' or 'feline').

Abstract

The second page of the manuscript must contain the abstract, which should be of no more than 300 words and must be clearly written and comprehensible to readers before they come to read the paper.

For Original Articles and Short Communications, the Abstract should be structured with the following four subheadings: 'Objectives', 'Methods', 'Results', and 'Conclusions and relevance'. For Case Series, the abstract should be structured with the following two subheadings: 'Case series summary', and 'Relevance and novel information'. For Reviews, the abstract can either have no subheadings or subheadings of the author's choice.

Reference citations are not permitted.

[Privacy](#)

Any manuscripts submitted without a structured abstract will be returned to the author prior to peer review, thus delaying the evaluation process of the manuscript.

4.2 Artwork, figures, other graphics and tables

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#). Figures supplied in colour will appear in colour online and in print. Tables should be provided in an editable format (eg, drawn in Microsoft Word or Microsoft Excel). The minimum image quality required is 300dpi at 1000 x 1000 pixels.

4.3 Style Guide

JFMS has its own style guide: [JFMS Style Guide 2020](#)

4.4 Abbreviations, symbols and drug names

Each scientific abbreviation must be explained at its first occurrence in the paper; for example:

- complement fixation test (CFT).

Do not use propriety symbols (eg, ® or ™) or ltd, etc, in medications or company names.

Medications should be referred to by their recommended International Nonproprietary Name (rINN). A list of these generic names is coordinated by the World Health Organization at <http://www.who.int/medicines/services/inn>. Where appropriate, the proprietary name and the manufacturer should be given in parentheses when first mentioned; for example:

- carprofen (Rimadyl; Zoetis).

4.5 Supplementary material

This journal is able to host additional materials online (eg, datasets, podcasts, videos, images, etc) alongside the full-text of the article. These will still be subjected to peer review. For more information please refer to our [guidelines on submitting supplementary files](#).

4.6 Reference style

JFMS adheres to the SAGE Vancouver reference style. View the [SAGE Vancouver](#) guidelines to ensure your manuscript conforms to this reference style.

If you use [EndNote](#) to manage references, you can download the [SAGE Vancouver EndNote output file](#).

In general only primary sources of information should be cited – citing reviews or book chapters where primary sources are referred to is generally not acceptable. Where relevant, authors should make note of [Abstract] and [Letter] in their references.

4.7 Reference interval guidelines

Guidelines for papers determining reference intervals in veterinary species can be found at: https://www.asvcp.org/page/QALS_Guidelines.

4.8 English language editing services

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications may consider using SAGE Language Services. Visit [SAGE Language Services](#) for further information.

4.9 Disclaimer

The *Journal of Feline Medicine and Surgery* (JFMS) is published for veterinary and allied professionals and is not intended for use by cat owners or carers as a substitute for professional veterinary care. The journal's content represents views and opinions of the authors (and advertisers), and not necessarily the views or opinions of the editors, societies, or publisher, who make no representation or give any warranty as to the accuracy, applicability, fitness or completeness of the content.

Ultimate responsibility for the interpretation of published materials lies with the veterinary practitioner. Authors (and advertisers) may describe the use of products, formulations, methods, or techniques that are not necessarily available or licensed for use in cats in a reader's own country. Publication of this content does not amount to an endorsement of efficacy, value or quality, or the claims made by authors or advertisers, and the reader is responsible for ensuring they comply with the legal and ethical treatment of animals. The authors, editors, societies, and publisher accept no responsibility for any loss or damage arising from actions or decisions based on information contained in this journal

[Back to top](#)

5. Submitting your manuscript

JFMS is hosted on SAGE Track, a web-based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Visit <https://mc.manuscriptcentral.com/jfms> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal since

[Privacy](#)

is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne Online Help.

5.1 ORCID

ORCID applies only to papers published in the Classic editions of *JFMS*, due to the required verification expected by ORCID.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of [ORCID](#), the Open Researcher and Contributor ID. ORCID provides a unique and persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher, even those who share the same name, and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between researchers and their professional activities, ensuring that their work is recognized.

The collection of ORCID iDs from corresponding authors is now part of the submission process of this journal. If you already have an ORCID iD you will be asked to associate that to your submission during the online submission process. We also strongly encourage all co-authors to link their ORCID ID to their accounts in our online peer review platforms. It takes seconds to do: click the link when prompted, sign into your ORCID account and our systems are automatically updated. Your ORCID iD will become part of your accepted publication's metadata, making your work attributable to you and only you. Your ORCID iD is published with your article so that fellow researchers reading your work can link to your ORCID profile and from there link to your other publications.

If you do not already have an ORCID iD please follow this [link](#) to create one or visit our [ORCID homepage](#) to learn more.

Please note that only ORCID iDs validated prior to article acceptance will be authorised for publication, and we are unable to add or amend ORCID iDs at later stages (eg, at proof stage).

Once an ORCID account is set up you are able to add papers manually to your account to ensure all your work is accounted for. We would recommend this for all papers published in the Clinical Practice editions of *JFMS*.

5.2 Information required for completing your submission

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding author. These details must match what appears on your manuscript. Please note that a user account, containing name, email address and institution, will be created for all authors listed on a

[Privacy](#)

paper. At this stage please ensure you have included all the required statements and declarations and uploaded any additional supplementary files (including reporting guidelines where relevant). Manuscripts must be submitted with declaration statements in the following order: Acknowledgements (where relevant), Conflict of Interest, Funding, Ethical Approval and Informed Consent.

5.2.1 Social Media - Twitter @CatVets and @ISFMCats

JFMS uses Twitter (through both the ISFM channel @ISFMCats and the AAFP channel @CatVets) to engage with debate on Social Media. Authors and readers are encouraged to join the ongoing discussion around the twitter account on issues related to the Journal. JFMS authors are offered the option of providing their Twitter handle to be published alongside their name and email address within their article. Providing a Twitter handle for publication is entirely optional, if you are not comfortable with JFMS promoting your article along with your personal Twitter handle then please do not supply it.

By providing your personal Twitter handle you agree to let JFMS and SAGE Publications to use it in any posts related to your Journal article. To include your Twitter handle within your article please provide this within the ScholarOne submission form when prompted and on the separate title page in the format outline below (please refrain from adding it to the manuscript itself to facilitate anonymous peer review).

As an example of how to supply this information please see the example below:

Joe Bloggs, Department of Veterinary Science, University Hospital, Town, Zip code, USA

Email: JoeBloggs@email.com

Twitter: @drjoebloggs

[Back to top](#)

6. On acceptance and publication

6.1 SAGE Production

Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be sent by PDF to the corresponding author and should be returned promptly.

6.2 Access to your published article

SAGE provides authors with online access to their final article.

6.3 OnlineFirst publication

[Privacy](#)

OnlineFirst allows final revision articles (completed articles in queue for assignment to an upcoming issue) to be published online prior to their inclusion in a final journal issue which significantly reduces the lead time between submission and publication. For more information please visit our [OnlineFirst Fact Sheet](#)

[Back to top](#)

7. Further Information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the manuscript submission process should be sent to the JFMS editorial office: jfms@icatcare.org

[Back to top](#)

Browse journal

Current issue

OnlineFirst

All issues

All PDF issues

Free sample

Journal information

Journal description

Aims and scope

Editorial board

Submission guidelines

Journal indexing and metrics

Reprints

Journal permissions

[Privacy](#)

ANEXO 2 - Comitê de Ética



Universidade Federal de Uberlândia
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Frequência e análise gênica do Vírus da panleucopenia felina (FLPV) em gatos filhotes com diarreia”**, protocolo nº **006/21**, sob a responsabilidade de **Aline Santana da Hora** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **09 de Julho de 2021**.

(We certify that the project entitled **“Frequência e análise gênica do Vírus da panleucopenia felina (FLPV) em gatos filhotes com diarreia”**, protocol **006/21**, under the responsibility of **Aline Santana da Hora** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of July 09th, 2021).

Vigência do Projeto	Início: 16/07/2021 Término: 01/03/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Gato
Número de animais	150 animais
Peso / Idade	-
Sexo	Fêmea e Macho
Origem / Local	Hospital Veterinário – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	-

Uberlândia, 15 de Julho de 2021.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R.Nº 1114/2020



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Frequência e análise gênica do vírus da panleucopenia felina (FLPV) e do bocavírus felino (FBoV) em gatos filhotes com diarreia”**, protocolo nº 006/21, sob a responsabilidade de **Aline Santana da Hora** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **29 de outubro de 2021**.

(We certify that the project entitled **“Frequência e análise gênica do vírus da panleucopenia felina (FLPV) e do bocavírus felino (FBoV) em gatos filhotes com diarreia”**, protocol 006/21, under the responsibility of **Aline Santana da Hora** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of October 29th, 2021).

Vigência do Projeto	Início: 16/07/2021 Término: 01/03/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Gato
Número de animais	150 animais
Peso / Idade	-
Sexo	Fêmea e Macho
Origem / Local	Hospital Veterinário – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	-

Alterações Realizadas: Alteração do título do projeto de “Frequência e análise gênica do Vírus da panleucopenia felina (FLPV) em gatos filhotes com diarreia” para “Frequência e análise gênica do vírus da panleucopenia felina (FLPV) e do bocavírus felino (FBoV) em gatos filhotes com diarreia” / Inserção de novas metodologias/ Inserção de novos colaboradores, Lana Isabella Gila e Geovana Gonçalves Barbosa.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R Nº 1114/2020

Uberlândia, 01 de novembro de 2021.