



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Caracterização Molecular do Parvovírus Canino tipo 2 e do
vírus da Panleucopenia Felina em cães e gatos da Área
Metropolitana de Lisboa**

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientado por Professor Doutor David Ramilo, Professora Doutora Margarida Alves e Professor Doutor André Pereira.

Sara Nobre Carvalho Ferreira Alves, nº 21801750

2025

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Caracterização Molecular do Parvovírus Canino tipo 2 e do
vírus da Panleucopenia Felina em cães e gatos da Área
Metropolitana de Lisboa**

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 14/05/2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 325 / 2025, de 28 de Abril, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Pedro Faísca

Arguente: Professora Doutora Cátia Marques
(Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa)

Orientador: Professor Doutor David Ramilo

Este trabalho também foi orientado por Professora Doutora Margarida Alves e Professor Doutor André Pereira

Sara Nobre Carvalho Ferreira Alves, nº 21801750

2025

Dedicatória

Para a Kuka, a minha fiel amiga

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, a todos os docentes e colaboradores, pelos seis anos de ensinamentos, pela exigência, dedicação e profissionalismo. Agradeço também o financiamento deste projeto e pelo incentivo à investigação científica.

Agradeço ao Professor Doutor David Ramilo pela sua orientação, pela sua presença constante, pela sua disponibilidade e por todo o apoio. Agradeço-lhe o rigor e a exigência, a amizade, a simpatia e a paciência. Agradeço-lhe todos os conselhos, ensinamentos e a orientação durante o tempo que estive no laboratório.

Agradeço à Professora Doutora Margarida Alves por me orientar desde o início deste percurso académico, pelos sábios ensinamentos sobre como devemos estar no laboratório e a sua importância, foi sem dúvidas um exemplo muito importante.

Agradeço ao Professor Doutor André Pereira por me orientar da melhor forma, nos resultados deste projeto. Agradeço-lhe o seu tempo e dedicação e por conseguir “descomplicar” muitos conceitos de genética.

Agradeço a todos os colaboradores do projeto Parvoviridae, em especial à Professora Doutora Andreia Valença e à Professora Doutora Cátia Marques pelos seus conselhos e apoio. Ao Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e a toda a sua equipa.

Agradeço ao AniCura Hospital Veterinário do Restelo por me terem recebido de braços abertos, pela partilha de conhecimentos, pela oportunidade de poder aprender com os melhores e ter sido “casa” durante seis meses.

A todos os Centros Médico Veterinários pelos quais estagiei ao longo destes seis anos. Em especial ao Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Lusófona pelos seis meses de bolsa, agradeço a oportunidade e o desafio, sem dúvida que contribuiu para a médica veterinária que serei.

Aos meus pais, Elisabete e Pedro, expresso a minha mais profunda gratidão. Agradeço-vos por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que duvidei das minhas capacidades, por me apoiarem incondicionalmente e por me encorajarem a seguir os meus sonhos. O amor,

o carinho e os valores que sempre me transmitiram foram essenciais para que eu pudesse trilhar este caminho com determinação, coragem e resiliência.

Aos meus queridos avôs, que são o pilar da minha vida, obrigada pelo amor incondicional, pela dedicação diária e pelo apoio nas situações mais difíceis. Obrigada pelo orgulho que demonstram pelas minhas conquistas.

À minha irmã, Madalena, o meu mais sincero agradecimento pelo companheirismo e amizade, por alinhar em tudo e ter sempre a verdade nua e crua para dizer. A tua presença foi essencial nos momentos mais desafiantes, e o teu carinho e incentivo foram fundamentais para a realização desta etapa tão importante da minha vida.

Agradeço ao Gustavo, pelo amor, dedicação, companheirismo e por tudo. Foste, és e serás sempre um grande pilar na minha vida e no meu crescimento. Agradeço-te a paciência e o apoio nas fases mais complicadas desta jornada de seis anos. Obrigado por estares sempre ao meu lado. *The best team in league!*

Agradeço às minhas “Doutoras”, à Isabella Sposito, Margarida Gomes, Margarida Nogueira, Carlota Ramos, Raquel Moura, Liliana Correia, Carolina Cristo e à Filipa Lobbert pela amizade bonita que construímos e pelos desafios que ultrapassamos juntas.

Em especial quero agradecer à Carlota Ramos que alinha em tudo comigo e em todos os projetos incríveis. Obrigado por acreditares em mim e por acompanhares-me em todos os projetos. És das pessoas mais especiais que conheço e sei que vais ser uma excelente Médica Veterinária.

Ao meu trio maravilhoso, Isabella e Margarida Gomes, vocês foram as duas muito especiais ao longo destes anos. Agradeço-vos o companheirismo, a paciência e a amizade sem vocês este curso teria sido uma seca. Obrigada por sempre me apoiarem e também pelos bons conselhos.

Quero agradecer aos meus amigos dos escuteiros que me acompanharam durante muitos anos e que foram muito importantes para a pessoa que sou hoje.

Quero agradecer à Associação de Estudantes da FMV-ULusófona pelos anos de trabalho e de aprendizagens que levo para a vida. Ao meu querido Núcleo de Medicina de Animais de Companhia foi o meu primeiro grande projeto pessoal e profissional, um desafio incrível com

altos e baixos. Sou grata por todo o tempo que dediquei ao associativismo e às iniciativas pós faculdade.

Agradeço à Bé, pela amizade e pela equipa maravilhosa que fazemos, obrigada por acreditares em mim e veres em mim um pouco de ti.

Por fim, um agradecimento especial ao meu Leo, Jolie, Kuka, Lee, Mel, Suri e à Zoey pelo companheirismo, pelas sessões de terapia e pelas lambidelas nos piores momentos, pelo vosso amor incondicional e por serem a razão pela qual escolhi dedicar a minha vida a seres tão especiais como vocês.

Resumo

O género *Protoparvovirus* engloba várias espécies, incluindo o parvovírus canino do tipo 2 (CPV-2) e o vírus da panleucopenia felina (FPV). Adicionalmente, o CPV-2 apresenta uma taxa de mutação nucleotídica frequente, levando a alterações aminoacídicas na proteína viral 2 (VP2), responsáveis pela transmissão, infeção e propriedades antigénicas deste vírus, traduzindo-se na existência de subtipos (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c).

Neste contexto, pretendeu-se com o presente trabalho, fazer a caracterização molecular do CPV-2 e o FPV de cães e gatos infetados na área metropolitana de Lisboa e determinar a frequência de cada subtipo do CPV-2. Para tal, foram estudadas amostras fecais/sangue de 27 animais com sinais clínicos compatíveis com infeção causada por CPV-2 e FPV e com teste de antígeno (SNAP) positivo (Idexx Laboratories ®, Portugal). Procedeu-se à extração de DNA presente em amostras de fezes e sangue, posteriormente, procedeu-se à amplificação por PCR do gene *vp2* e sequenciação dos produtos de amplificação. As sequências obtidas foram alinhadas com o programa MAFFT e a subtipificação viral com o programa Aliview. Posteriormente, realizou-se uma árvore filogenética e análise de haplótipos do CPV-2, do FPV e de comparação do vírus presente nas fezes e no sangue de seis amostras aleatórias.

No total, o vírus mais prevalente na amostra foi FPV (48,0%). Nos gatos detetou-se FPV (93,0%) e CPV-2c (7,0%). Nos cães, o subtipo predominante foi o CPV-2c (77,0%), seguido do subtipo CPV-2b (23,0%). Foram identificadas algumas mutações nas amostras em estudo. No estudo da árvore filogenética, o CPV e o FPV demonstraram ser monofiléticos. Relativamente ao CPV-2 este demonstrou a presença de segregação de intragrupos, porém, nenhum destes refletiu monofilia para os subtipos.

Estes resultados reforçam a questão da importância da identificação e monitorização dos subtipos do CPV-2 em circulação nas populações caninas e felinas para a compreensão da evolução do vírus, a sua epidemiologia e o seu impacto na saúde dos hospedeiros. Estes apoiam a necessidade de análises moleculares regulares e de uma revisão da classificação com base na sequência do genoma completo do subtipo viral.

Palavras-chave: Parvovirus canino, vírus da panleucopenia felina, gene *vp2*, filogenia

Abstract

The genus *Protoparvovirus* comprises several species, including canine parvovirus type 2 (CPV-2) and feline panleukopenia virus (FPV). Additionally, CPV-2 exhibits a high nucleotide mutation rate, leading to amino acid changes in the Viral Protein 2 (VP2), which are responsible for the virus's transmission, infection, and antigenic properties, resulting in the existence of subtypes (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c).

In this context, the present study aimed to characterise CPV-2 and FPV from infected dogs and cats in the Lisbon Metropolitan Area (LMA), to determine the prevalence of CPV-2 subtype through nucleotide sequencing. A total of 27 animals presenting clinical signs compatible with CPV-2 and FPV infections were tested, all of which had a positive result in an antigen (SNAP) test (Idexx Laboratories®, Portugal). DNA was extracted from faecal and blood samples, followed by PCR amplification of the *vp2* gene and sequencing of the amplification products. The obtained sequences were aligned using the MAFFT programme, and viral subtyping was performed using the Aliview programme. Subsequently, a phylogenetic tree and haplotype analysis were constructed to compare CPV-2 and FPV isolates as well as the virus present in faeces and blood from six samples.

Overall, the most prevalent virus was FPV (48,0%). In cats, FPV was detected in 93,0% of cases, and CPV-2c in 7,0%. In dogs, the predominant subtype was CPV-2c (77,0%), followed by CPV-2b (23,0%). Several mutations were identified in the analysed samples. Phylogenetic tree analysis demonstrated that CPV and FPV were monophyletic. Regarding CPV-2, intragroup segregation was observed; however, none of the clusters exhibited monophyly for subtypes

These findings emphasise the importance of identifying and monitoring circulating CPV-2 subtypes in canine and feline populations to better understand the virus's evolution, epidemiology, and its impact on host health. This study supports the need for regular molecular analyses and a revision of the classification based on the full genome sequence of the viral subtype.

Key-words: canine parvovirus, feline panleukopenia, gene *vp2*; *phylogeny*

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AAFP - *American Association of Feline Practitioners*

Ac - Anticorpos

Ag – Antigénios

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

CAMV - Centro de Atendimento Médico Veterinário

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

CPV – Parvovírus Canino, do inglês *Canine Parvovirus*

CPV-1 - Parvovírus Canino do tipo 1, do inglês *Canine Parvovirus type 1*

ml – Mililitro

MEV - Vírus da Enterite dos Vison, do inglês *Mink Enteritis Virus*

MIMV - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

NS1 - Proteínas não estruturais 1, do inglês *nonstructural protein 1*

NS2 - Proteínas não estruturais 2, do inglês *nonstructural protein 2*

nm - nanómetro

ORF – Sequências genéticas em fase de leitura aberta, do inglês *Open Reading Frame*

PI - Período de incubação

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction*

® - Marca registrada

% - Percentagem

3` - Extremidade da molécula de DNA portadora do grupo hidroxilo, do inglês *Hydroxyl terminus of DNA molecule*

5` - Extremidade da molécula de DNA portadora do grupo fosfato, do inglês *Phosphate terminus of DNA molecule*

Índice

Índice de Gráficos	15
Índice de Tabelas.....	16
Índice de Figuras	17
Descrição da casuística do estágio curricular.....	18
Caracterização molecular da infeção por Parvovírus Canino e pelo Vírus da Panleucopenia Felina em cães e gatos da Área Metropolitana de Lisboa.	22
1. Introdução	22
1.1 Etiologia do Parvovírus Canino do tipo 2	22
1.1.1 Taxonomia.....	22
1.1.2 Estrutura e ciclo viral do Protoparvovirus carnivoran 1	22
1.1.3 Origem do CPV-2.....	24
1.2 A evolução genética do CPV-2	25
1.2.1 A evolução dos subtipos do CPV-2.....	25
1.2.2 Epidemiologia da infeção por CPV-2 nos cães	27

3. Imunoprofilaxia.....	43
3.1 Vacinação contra o CPV-2.....	43
3.1.1 Protocolo vacinal CPV - Cão	44
3.2 Vacinação contra o FPV.....	44
3.2.1 Protocolo vacinal FPV- Gato	45
3.3 Falhas na vacinação.....	46
4. Objetivos do estudo.....	46
II. Material e Métodos.....	47
1. Descrição da população em estudo e parecer da CEBEA	47
1.1 Recolha de amostras.....	47
2. Extração de DNA genómico	48
2.1 Extração de DNA genómico nas fezes	48
2.2 Extração de DNA genómico do sangue	

Apêndice C.....	98
Anexos	99

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Frequência relativa da casuística por tipo de animal observada pela autora durante o estágio curricular no Hospital AniCura Restelo.	19
Gráfico 2 - Frequência relativa da casuística observada nas diferentes especialidades.....	19
Gráfico 3 - Frequência absoluta do número de procedimentos observados na área de Imagiologia.	21
Gráfico 4 - Frequência relativa da tipologia de cirurgia observada pela autora durante o estágio.	21
Gráfico 5 - Distribuição da amostra de cães por sexo e estado fértil.....	55
Gráfico 6 - Distribuição da amostra de gatos por sexo e estado fértil.	56
Gráfico 7 - Distribuição da amostra de cães por estado vacinal.	57
Gráfico 8 - Distribuição da amostra de gatos por estado vacinal.	57
Gráfico 9 - Resultados da subtipificação com base no perfil aminoacídico obtidos na amostra total.	59
Gráfico	

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resumo das diferenças nas posições aminoacídicas da proteína VP2 entre o vírus FPV e os subtipos virais do CVP-2.	34
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>vp2</i>	50
Tabela 2 - Condições da PCR para amplificação do genoma viral.	50
Tabela 4 – Distribuição da amostra total pela respectiva área geográfica.	55
Tabela 5 - Mutações verificadas nos resíduos aminoácidos nas amostras das amostras em estudo.	60

Índice de Figuras

capacidade de se ligar ao recetor de transferrina canino tipo 1 (TfR, do inglês *Transferrin receptor*) (Truyen *et al.*, 1996, Schackelton *et al.*, 2005, Allison *et al.*, 2012).

A adaptação ao novo hospedeiro, o cão, foi resultado de seis alterações aminoacídicas (Truyen *et al.*, 1995). As mutações nos resíduos aminoacídico 93, 103 e 323 conferiram a capacidade de infetar o cão (Chang *et al.*, 1992, Truyen *et al.*, 1995) e por outro lado as mutações nos resíduos 80, 564 e 568 foram associados à perda da capacidade de replicação em gatos (Truyen *et al.*, 1994). Contudo foram identificadas duas mutações extra, no resíduo 232 e 375 que diferem o CPV-2 do FPV (Parrish *et al.*, 1991a).

Estas alterações aumentaram a eficiência da infeção em cães e foram determinantes para a emergência e disseminação global do CPV-2 a partir do final da década de 1970 (Truyen *et al.*, 1996). Além disso, a mutação no resíduo 375 pode estar associada a mudanças na antigenicidade do vírus, com possíveis implicações na resposta imunológica e eficácia vacinal (Miranda & Thompson, 2016b).

1.2 A evolução genética do CPV-2

1.2.1 A evolução dos subtipos do CPV-2

O CPV-2 apresenta uma taxa de substituição nucleotídica elevada, o que se traduz numa substituição aminoacídica de 10^{-4} resíduos por ano, uma característica que o torna muito semelhante aos vírus com genoma de RNA. A alta taxa de mutação e a variabilidade do CPV-2 permitiu um rápido aumento e disseminação do vírus nos cães domésticos (Schackelton *et al.*, 2005).

As substituições de nucleótidos foram relatadas como sendo mais frequentes no gene *vp2*, por este proporcionar uma vantagem seletiva para os novos subtipos virais (Shackelton *et al.*, 2005). Estas mutações podem afetar a resposta imunitária do hospedeiro, reduzindo o reconhecimento viral dos anticorpos neutralizantes e potenciar a entrada do vírus nas células (Lee *et al.*, 2019).

Com a globalização, o vírus modificou-se e surgiram três novos subtipos (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) (Santana *et al.*, 2022). Na década de 80 do século XX, foi identificado o subtipo CPV-2a. Este subtipo apresenta alterações genéticas que permitem a ligação das partículas virais aos recetores TfR caninos e felinos. As alterações que diferenciam a variante CPV-2 do subtipo CPV-2a ocorrem em cinco resíduos aminoacídicos na proteína VP2: M87L, I101T, A300G, D305Y e V555I (Parrish *et al.*, 1991; Santana *et al.*, 2022) (Figura 2).

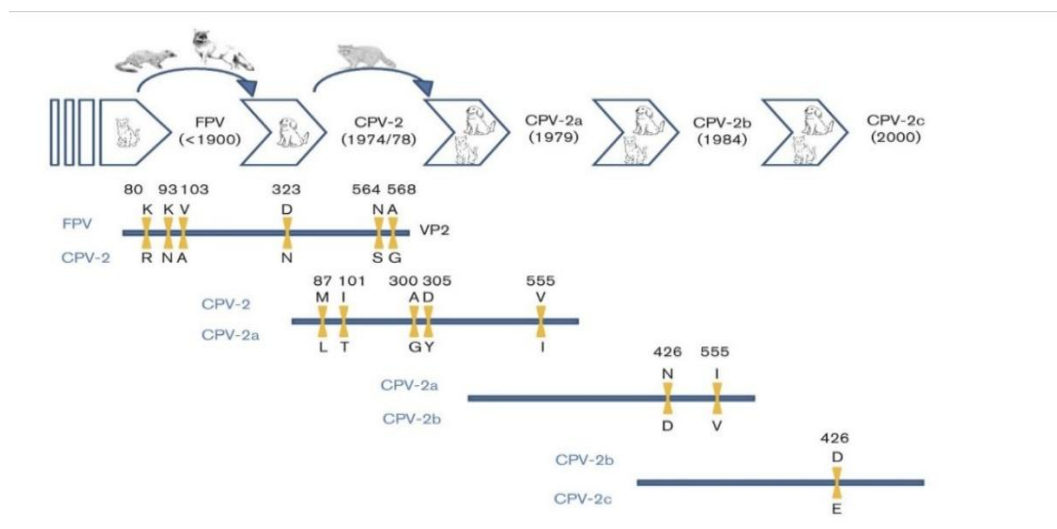


Figura 2 - Processo evolutivo do CPV-2 (Adaptado de Miranda *et al.*, 2016a).

A variante CPV-2a, durante os primeiros 2 a 3 anos após a sua descoberta, foi a mais predominante, tornando-se, assim, uma forte ameaça para os cães afetados (Parrish *et al.*, 1988). Este vírus recuperou a capacidade de infectar gatos, através das primeiras três mutações nos resíduos aminoácidos 87, 300, 305 (Miranda *et al.*, 2016a).

O CPV-2b foi identificado pela primeira vez no ano 1984 nos Estados Unidos da América (EUA) e o CPV-2c foi identificado em Itália no ano 2000 (Buonavoglia *et al.*, 2001) (Figura 2). Em contraste com o subtipo CPV-2a, o subtipo CPV-2b tem alterações em dois resíduos aminoácidos: N426D e I555V (Parrish *et al.*, 1991; Buonavoglia *et al.*, 2001). A mutação no resíduo 555 é uma mutação que é considerada uma reversão ou retenção da sequência original (Miranda *et al.*, 2016a) o que sugere não ter um impacto significativo no vírus. O subtipo CPV-2c, por sua vez, apenas difere num resíduo aminoácido, na posição 426, na proteína VP2 (D426E) em relação ao CPV-2b (Organtini *et al.*, 2015) (Figura 2).

Como os subtipos virais CPV-2b e CPV-2c diferem do CPV-2a em apenas num resíduo aminoácido, o 426, alguns autores consideram os subtipos CPV-2b e CPV-2c como subtipos do CPV-2a (Organtini *et al.*, 2015).

Outras mutações não sinónimas têm sido descritas na literatura referentes aos subtipos virais (Miranda *et al.*, 2016a). Mais recentemente, uma nova mutação (S297A) foi detetada nos vírus CPV-2a e CPV-2b (Ohshima *et al.*, 2008). No entanto, esses subtipos do CPV-2 não receberam nenhuma designação taxonómica ou comum clara, apesar de sua presença em diferentes áreas geográficas (Mira *et al.*, 2018).

Os três subtipos do CPV-2, estão atualmente disseminados pelo mundo com focos epidemiológicos que variam geograficamente (Miranda *et al.*, 2016a). Foram descritas infecções em cães em África, América, Ásia, Austrália e Europa (Decaro *et al.*, 2007; Markovich *et al.*, 2012). Por outro lado, o CPV-2 original não se encontra em circulação, estando apenas presente em algumas formulações vacinais (Decaro & Buonavoglia, 2017).

Num estudo recente, que envolveu cerca de 50 países e analisou 6 211 sequências de CPV-2 em cães, verificou-se que o subtipo CPV-2c é dominante na Ásia, África e América. Por outro lado, na Europa e Oceânia, diferentes subtipos coexistem de forma coepidémica (Hao *et al.*, 2022).

Num estudo que decorreu em Portugal continental com 104 amostras, os subtipos CPV-2b e CPV-2c foram os dominantes, com uma distribuição muito semelhante nas três zonas do país de onde provieram as amostras (Norte, Centro e Sul). A variante CPV-2a foi detetada uma única vez (Vieira *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos no estudo de Miranda *et al.* (2016b), sugerem que a variante CPV-2c é a mais prevalente em Portugal, nas populações canina e felina. Existem também relatos de infeção em carnívoros selvagens e em gatos com a variante CPV-2c (Miranda *et al.*, 2014).

Inicialmente, caracterizou-se a doença vírica pelo aparecimento de quadros graves de enterite hemorrágica, insuficiência cardíaca e miosite de carácter não supurativa em cães (Hall & German, 2005). Com base nos sinais clínicos, não é possível distinguir o subtipo viral do CPV-2 (Markovich *et al.*, 2012). Contudo, alguns estudos reportam que o subtipo CPV-2c poderá ser mais virulento (Decaro *et al.*, 2008), porém outros estudos relatam menor mortalidade e doença mais leve (Decaro *et al.*, 2005).

As coinfeções por múltiplos subtipos do CPV-2 em cães são raras, contudo já existem casos documentados (Miranda *et al.*, 2016b). Estas coinfeções contribuem para a diversidade viral e para o surgimento de novos subtipos (Miranda *et al.*, 2016b).

1.2.2 Epidemiologia da infeção por CPV-2 nos cães

O CPV-2 é considerado um vírus ubiquitário devido à sua resistência no ambiente (por mais de um ano) e pela sua capacidade de infetar diversos hospedeiros (Decaro *et al.*, 2012).

A doença é caracterizada por um desenvolvimento rápido, com maior mortalidade nos primeiros dois a três dias após o início dos sinais clínicos. Afeta animais jovens, com maior

predominância entre as seis semanas e os seis meses (Houston *et al.*, 1996), especialmente em cachorros não vacinados ou que têm baixos títulos de anticorpos maternos (Decaro *et al.*, 2012).

Inicialmente, acreditava-se que o período de incubação (PI) do vírus era de 7 a 14 dias, mas, atualmente, outros estudos mostram que poderá ser de 4 a 6 dias (Goddard & Leisewitz, 2010).

Existem algumas raças de cães com maior predisposição a uma enterite grave por infecção pelo vírus como, por exemplo, Labrador *Retriever*, Pastor Alemão, *English Springer Spaniel*, *Pinscher*, *Doberman*, *Rottweiler*, *American Staffordshire* e *Malamute* (Greene & Decaro, 2012).

Os principais fatores para o desenvolvimento de doença clínica são: a idade do animal, a carga viral, o estado imunitário e a presença de doenças concomitantes. Em alguns animais, a doença apresenta uma fase hiperaguda, a qual está associada uma maior mortalidade (Goddard & Leisewitz, 2010).

1.2.3 Epidemiologia da infecção do CPV-2 nos gatos

Os três subtipos virais do CPV-2 são capazes de infetar os gatos, ao contrário do vírus CPV-2 original (Mochizuki *et al.*, 1993; Battilani *et al.*, 2006). Nos gatos, a infecção pelos subtipos do CPV-2, leva frequentemente a doença clínica ligeira comparativamente com o FPV e comparativamente ao CPV-2 nos cães (Markovich *et al.*, 1993).

Todos os subtipos de CPV-2 tem sido isolado nas fezes de gatos domésticos e selvagens doentes, sugerindo que o vírus possa causar doença ligeira ou subclínica (Hoelzer & Parrish, 2010).

A coinfeção por vários subtipos de CPV-2 também está descrita em gatos (Battilani *et al.*, 2006, 2007): o CPV-2a com o CPV-2c e o CPV-2a com o vírus FPV. Este tipo de infecções potencia a recombinação e a diversidade genética do vírus (Battilani *et al.*, 2006). O vírus é excretado por períodos de 4 a 6 semanas no decurso de uma infecção subclínica (Clegg *et al.*, 2012). Os gatos podem atuar como um potencial reservatório do vírus, contribuindo para a sua transmissão a outros gatos e cães (Clegg *et al.*, 2012). As coinfeções aumentam o papel epidemiológico do gato como potencial reservatório (Battilani *et al.*, 2013).

1.3 Patogénese

A transmissão do CPV-2 ocorre por via fecal-oral (Greene & Decaro, 2012) ou pelo contacto com superfícies contaminadas (Santana *et al.*, 2022). A replicação do vírus ocorre em órgãos com rápida divisão celular, como os precursores hematopoiéticos, linfócitos, epitélio gastrointestinal, medula óssea, mucosa oral e esofágica (Greene & Decaro, 2012), podendo ocorrer também no cérebro (Decaro *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2009).

Depois da ingestão, inicia-se a replicação viral no tecido linfóide da orofaringe (incluindo tonsilas, linfonodos locais e retrofaringe), nos linfonodos tímicos e mesentéricos (Crawford & Sellon, 2010). O vírus é transportado pelos leucócitos, através da corrente sanguínea até às criptas de Lieberkühn no intestino. A virémia ocorre entre o 1.º e o 5.º dia pós-infecção. Após a virémia, o CPV-2 localiza-se predominantemente no epitélio que reveste a cavidade oral, língua, esófago, intestino delgado, medula óssea e o tecido linfóide (timo e linfonodos) (Goddard & Leisewitz, 2010).

O tropismo para as células das criptas de Lieberkühn na fase de desmame dos cachorros aumenta a predisposição para o desenvolvimento de doença clínica. Durante o desmame, as células das criptas de Lieberkühn têm um elevado índice mitótico devido à alteração na alimentação e consequente alteração da flora microbiana entérica (Sykes *et al.*, 2023). Por este motivo, os animais nesta fase estão mais suscetíveis à infecção viral devido a este acelerado mecanismo mitótico (Goddard & Leisewitz, 2010). O CPV-2 infeta o epitélio germinal da cripta intestinal do íleo e do jejuno entre 4 e 5 dias após a infecção, causando necrose do epitélio intestinal e atrofia das vilosidades. Consequentemente, aparecem sinais clínicos entéricos, como vômito e diarreia, que pode ser hemorrágica (Sykes *et al.*, 2023).

A infecção dos leucócitos, principalmente associada aos linfócitos circulantes, induz neutropenia e linfopenia (Greene & Decaro, 2012; Pollock, 1982), o que leva a uma imunossupressão, deixando o animal suscetível a infecções secundárias. A linfopenia geralmente é observada entre os 3 e os 7 dias depois da infecção (Pollock, 1982).

A excreção do vírus ocorre a partir do 3.º ou 4.º dia após a infecção (Prittie, 2004). Esta excreção é variável, pode ocorrer até várias semanas após a infecção e está dependente da resposta imunitária que o animal tem para inibir a excreção viral (Greene & Decaro, 2012). Alguns cães, podem excretar o vírus até 12 a 14 dias após o início da infecção (Hoelzer *et al.*,

2008). Os anticorpos são detetáveis no soro a partir do 3.º dia após a infecção (Sykes *et al.*, 2023).

O DNA do *Protoparvovirus Carnivoran 1* persiste nos tecidos dos animais que foram previamente infectados por um longo período (mais de seis meses) (Pinto *et al.*, 2012; Decaro & Buonavoglia, 2012). O vírus pode permanecer latente em células mononucleares do sangue periférico (Hoelzer *et al.*, 2008). No entanto, são necessários mais estudos para investigar que fatores poderiam induzir novamente a doença nestes animais (Barss, 2019).

Em animais *post mortem*, o vírus foi isolado em necropsias a partir de pulmões, rins, baço, fígado e miocárdio, comprovando que é uma doença sistêmica (Marenzoni *et al.*, 2020).

1.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos manifestados são muito semelhantes entre animais domésticos e animais selvagens (Parrish, 1995). É mais comum a doença afetar cachorros entre as 6 semanas e os 6 meses de idade, muitas vezes com doenças concomitantes (Crawford & Sellon, 2010). O CPV-2 pode afetar cães adultos e vacinados; porém, as infecções nestes animais são geralmente subclínicas ou com sinais ligeiros (Greene & Decaro, 2023).

Os sinais clínicos gastrointestinais são os mais comuns, e geralmente aparecem 3 a 7 dias após a infecção (Parrish, 1995) sendo a letargia e a anorexia os primeiros sinais exibidos (Prittie, 2004). A forma entérica compreende a fase de êmese, enteropatia do intestino delgado, depressão do estado mental, anorexia, febre e desidratação em animais jovens (Hoelzer *et al.*, 2008). Com a evolução da doença, as fezes poderão passar a ser hemorrágicas, o que é indicativo de destruição da camada mucosa do intestino, com perda de sangue, de proteínas plasmáticas (hipoalbuminemia) e de eletrólitos (Greene & Decaro, 2023). As fezes dos animais doentes têm um odor característico por ser fétido devido à necrose do tecido epitelial intestinal e ao sangue presente nas fezes (Goddard & Leisewitz, 2010).

Alguns cães apresentam sialorreia, indicativa de náusea. A diarreia associada com o vômito pode levar os animais a uma desidratação grave e a choque hipovolêmico (Greene & Decaro, 2023). Este choque caracteriza-se pelas mucosas pálidas e secas, tempo de repleção capilar (TRC) inferior a dois segundos, pulso femoral fraco, taquicardia compensatória, hipotensão e extremidades frias (Prittie, 2004).

A nível analítico está descrita uma leucopenia grave abaixo de 2000 a 3000 células/ml de sangue (Greene & Decaro, 2023). Esta leucopenia ocorre devido à destruição dos precursores

dos leucócitos ao nível da medula óssea; porém, estes animais podem apresentar valores de leucócitos dentro dos valores de referência no sangue, com neutrofilia e linfocitopenia associadas (Greene & Decaro, 2023). A anemia também pode estar presente devido à perda de sangue pelas fezes, e a trombocitopenia está associada à perda de plaquetas no sistema gastrointestinal (Rewerts, 2000).

O vírus pode causar miocardite fatal nos animais seronegativos que são infectados *in utero* ou nas primeiras oito semanas de vida, devido à rápida divisão celular dos miócitos (Prittie, 2004). A infecção leva à inflamação e necrose do miocárdio, que pode consequentemente levar a edema pulmonar e/ou congestão hepática, devido a insuficiência cardíaca congestiva (Greene & Decaro, 2023). Os cachorros que sobrevivem à miocardite, tendem a desenvolver cardiomiopatia dilatada devido à fibrose associada (Sykes *et al.*, 2023) ou cardiomiopatia dilatada juvenil (Sime *et al.*, 2015). Nestes casos, não há diarreia porque o vírus está a replicar-se em células musculares do coração (Kumar & Nandi, 2010).

A parvovirose canina também está associada a lesões neurológicas, embora sejam raras e geralmente secundárias a complicações sistêmicas como coagulação intravascular disseminada (Sykes *et al.*, 2023).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico deve ser rápido, especialmente em locais com muitos animais, como criadores e canis, de forma a poder isolar os animais doentes (Desario *et al.*, 2005). O diagnóstico com base nos sinais clínicos é pouco preciso, uma vez que existem outros vírus que causam sinais clínicos muito semelhantes (como, por exemplo, o Coronavírus, o Adenovírus e o Rotavírus caninos) (Decaro *et al.*, 2012).

A enterite viral é um dos primeiros diagnósticos diferenciais em cães com menos de seis meses que apresentam diarreia, vômitos e anorexia. Por este motivo, o diagnóstico clínico deve ser confirmado com testes laboratoriais (Desario *et al.*, 2005).

1.5.1 Métodos de diagnóstico laboratorial

Foram desenvolvidos ao longo dos anos novas abordagens de diagnóstico para detetar e caracterizar o vírus, baseadas em técnicas imunológicas, moleculares e genéticas (Decaro & Buonavoglia, 2012).

Geralmente são usadas fezes dos animais infetados para confirmação da doença. Contudo, também se pode usar sangue em fases mais tardias, devido ao longo período de virémia (Decaro *et al.*, 2005).

1.5.1.1 Métodos de deteção do vírus

1.5.1.1.2 Métodos sorológicos

Os métodos Serológicos mais comuns na prática clínica são os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) que permitem detetar a presença de antígenos virais. E o teste de imunocromatografia que é o mais comum na prática clínica para o diagnóstico etiológico de parvovirose em cachorros (Decaro & Buonavoglia, 2012).

As partículas virais são excretadas nas fezes a partir do terceiro dia do PI, sendo mais facilmente detetadas no pico de excreção viral, que ocorre entre o 4.º e o 7.º dia. Assim, o momento ideal para a utilização deste método de diagnóstico é entre o 4.º e o 8.º dia de PI, correspondendo aos primeiros 2 a 4 dias após o início dos sinais clínicos (Decaro & Buonavoglia, 2012).

Outros métodos de deteção, como microscopia eletrónica, isolamento viral e hemaglutinação poderão ser usados, contudo, não são tão frequentes na prática clínica (Miranda *et al.*, 2016b).

1.5.1.1.2.1 Teste de Imunocromatografia

Os testes de imunocromatografia podem ser de fluxo bilateral ou de fluxo lateral é amplamente utilizada na prática clínica devido à sua acessibilidade, custo reduzido e rapidez quando em comparação com outros métodos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*) (Esfandiari & Klingeborn, 2000). Além disso, essa técnica pode ser realizada diretamente no Centro de Atendimento Médico Veterinário (CAMV), sem a necessidade de um laboratório externo (Esfandiari & Klingeborn, 2000).

O teste SNAP (Idexx Laboratories ®, Portugal), um dos mais utilizados, deteta a presença de antígenos virais nas fezes. Para um resultado positivo, é necessário que haja uma quantidade suficiente de antígeno na amostra fecal, permitindo a formação de um complexo antígeno-anticorpo que desencadeia uma reação enzimática visível (Idexx Laboratories®, n.d.).

Embora estes testes sejam amplamente utilizados, a sua sensibilidade é variável entre laboratórios e pode ser inferior a 50,0% (Decaro & Buonavoglia, 2012). Isso significa que um resultado positivo confirma o diagnóstico, mas a baixa sensibilidade pode gerar uma maior frequência de resultados falsos negativos. O resultado negativo, não elimina a possibilidade de infecção por CPV-2. Os falsos negativos podem ocorrer devido a diversos fatores, como excreção fecal transitória do vírus, diminuição da excreção viral, ligação dos anticorpos ao vírus ou diluição nas fezes (Sykes, 2013; Mylonakis *et al.*, 2016).

Resultados falsos positivos podem ocorrer em animais recentemente vacinados (entre 4 e 15 dias antes do teste) (Prittie, 2004) com vacinas modificadas (Sykes *et al.*, 2023). No entanto, a especificidade do teste SNAP é alta, variando entre 90,0% e 100,0% (Mylonakis *et al.*, 2016).

Os testes SNAP (Idexx Laboratories ®, Portugal) para a detecção do antígeno do CPV-2 também podem ser utilizados em gatos, pois detetam tanto a variante CPV-2a como o FPV em fezes felinas (Barrs, 2019). Entretanto, a especificidade desses testes em gatinhos recentemente vacinados varia entre 79,8% e 98,4% (Meason-Smith *et al.*, 2016).

1.5.1.1.3 Métodos moleculares

A PCR é uma técnica molecular que tem sido utilizada para a detecção do DNA do CPV-2. Esta técnica pode ser usada para confirmação do diagnóstico nos animais que testem negativo nos testes de imunocromatografia, mas cuja apresentação clínica é sugestiva da doença (Kanterea *et al.*, 2015).

Recentemente, foram desenvolvidos métodos baseado na PCR para o CPV-2 incluindo a PCR convencional (Mochizuki *et al.*, 1993), PCR em tempo real (Decaro *et al.*, 2005) e a *nested* PCR (Hirasawa *et al.*, 1994). Estas técnicas requerem 2 a 4 horas, equipamentos específicos e técnicos com formação (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). Este método tem uma sensibilidade superior a 90,0% (Crawford & Sellon, 2010), sendo relativamente rápido e específico.

Segundo Decaro e colaboradores (2005), a PCR em tempo real é a forma mais rápida, específica e sensível para detetar e quantificar o DNA do CPV-2 nas fezes de cães com diarreia. A PCR em tempo real com a tecnologia TaqMan é uma alternativa à PCR convencional e tem sido estabelecida como a técnica *gold standard* para o diagnóstico de infecção por CPV-2 (Desario *et al.*, 2005).

A PCR em tempo real, é uma ferramenta de diagnóstico que permite detectar e quantificar o DNA viral (Decaro *et al.*, 2005).

1.5.1.2 Métodos para caracterizar o vírus

Os métodos utilizados para caracterizar o vírus, são menos utilizados na prática clínica por terem interesse limitado aos profissionais (Miranda *et al.*, 2016a). No entanto, a caracterização do vírus tem importância epidemiológica (Miranda *et al.*, 2016a). Esta pode ser ambígua e demorada para a obtenção do subtipo viral (Decaro *et al.*, 2005b).

A identificação dos subtipos do CPV-2 pode ser realizado através das técnicas de hemaglutinação com inibição de anticorpos monoclonais, mas é uma técnica com várias limitações, incluindo a titulação de hemaglutinação. A titulação de hemaglutinação mede a capacidade do CPV-2 de aglutinar hemácias, sendo um método tradicional para a identificação de subtipos (Decaro & Buonavoglia, 2012). No entanto, apresenta várias limitações, incluindo baixa sensibilidade, variabilidade entre subtipos e interferência de anticorpos, o que pode comprometer a precisão da identificação viral.

A análise das sequências fornece uma ampla informação para a caracterização do subtipo viral no gene *vp2* (Miranda *et al.*, 2016a) (Tabela 1).

Os dados provenientes da sequenciação poderão ser usados para conhecer a percentagem de similaridade e realizar análises filogenéticas de isolados de CPV-2.

Tabela 1 – Resumo das diferenças nas posições aminoacídicas da proteína VP2 entre o vírus FPV e os subtipos virais do CVP-2 (baseado no Steinel *et al.*, 2000; Parrish *et al.*, 1991). As alterações específicas a nível de resíduos aminoácidos que permitem a diferenciação dos diferentes vírus e subtipos encontra-se sublinhada a amarelo.

		Resíduos aminoacídicos												
		80	87	93	103	232	292	300	323	375	426	555	564	568
Vírus	FPV	K	M	K	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
	CPV-2A	R	L	N	A	I	S	G	N	D	N	I	S	G
	CPV-2B	R	L	N	A	I	A	G	N	D	D	V	S	G
	CPV-2C	R	L	N	A	I	A	G	N	D	E	V	S	G

NOTA: As letras correspondem ao aminoácido (A- Alanina; K-Lisina; R-Arginina; M- metionina; L-Leucina; N-Asparagina; V-Valina; I-Isoleucina; S-Serina; G-Glicina; D-Aspartato; E-Glutamato).

O CPV-2 começou a ser classificado em diferentes tipos antigénicos desde que atingiu proporções pandémicas em 1980 (Parrish, 1990). Esta classificação é feita com base nas mutações nucleotídicas no gene *vp2* das estirpes emergentes. Este método continua a ser a ferramenta mais comum para a tipificação genética deste vírus (Santana *et al.*, 2022).

Mais recentemente, foram obtidos genomas completos (WGSs) de estirpes de CPV-2 e sequências completas do gene *vp2*, permitindo a proposta de novas classificações filogenéticas (Grecco *et al.*, 2018; Moon *et al.*, 2020; Nguyen Manh *et al.*, 2021).

1.5.1.2.1 Árvore filogenética

Uma árvore filogenética é uma representação gráfica que visa ilustrar as relações evolutivas entre diferentes espécies, com base em características compartilhadas ou dados genéticos. São muito utilizadas em áreas de investigação como biologia, taxonomia, virologia e genética, ajudando a entender a evolução ao longo do tempo e como os organismos se correlacionam (Felsenstein, 2004).

A partir da década de 1980, o uso das árvores filogenéticas começou a ser acompanhada com métodos avançados e ferramentas estatísticas de suporte, como o método de *bootstrap* (Felsenstein, 2004; Nei & Kumar, 2000).

O método *bootstrap* em árvores filogenéticas é uma técnica estatística utilizada para avaliar a consistência topológica. Este método baseia-se na reamostragem aleatória, com reposição, dos dados originais de alinhamento de sequências genéticas, gerando muitas réplicas (Felsenstein, 1985). Para cada réplica, é construída uma nova árvore filogenética, e calcula-se a frequência, em percentagem, com que uma determinada ramificação aparece em todas as árvores geradas. Esta frequência é conhecida como o valor de suporte *bootstrap* e é geralmente representada em cada nó da árvore filogenética. A escala de *bootstrap* permite avaliar a robustez dos resultados filogenéticos (Felsenstein, 1985).

No entanto, a sua interpretação deve ser cautelosa: valores elevados (acima de 75,0%) indicam geralmente um suporte robusto, enquanto valores baixos podem sugerir incerteza ou a necessidade de análises mais aprofundadas (Felsenstein, 1985).

1.5.1.2.2 Análise de haplótipos

A análise de haplótipos é uma abordagem essencial na genética de populações e na investigação molecular, permitindo estudar conjuntos de variantes genéticas que tendem a ser herdadas em conjunto devido à proximidade física no genoma (García *et al.*, 2021).

Um haplótipo pode ser definido como uma combinação específica de alelos ou sequências nucleotídicas em *loci* adjacentes de um cromossoma, formando um bloco genético que geralmente se mantém intacto ao longo de gerações (García *et al.*, 2021).

Na análise de haplótipos, é comum identificar o haplótipo dominante, que corresponde ao mais frequente numa determinada população ou conjunto de amostras, servindo muitas vezes como referência para compreender padrões de variabilidade (Schönherr *et al.*, 2023).

A relação entre os diferentes haplótipos pode ser visualizada através de redes de haplótipos, onde cada haplótipo é representado como um círculo, e as ligações entre eles refletem as diferenças genéticas ou mutações (García *et al.*, 2021). Os traços que unem os haplótipos indicam as mutações específicas que ocorreram ao longo da evolução, permitindo reconstruir o percurso evolutivo de uma população ou de um agente patogénico (Schönherr *et al.*, 2023). Estas redes são ferramentas poderosas para identificar eventos como mutações únicas, recombinações ou variações geográficas (García *et al.*, 2021).

No contexto da virologia e da saúde animal, a análise de haplótipos e das suas redes ajuda a rastrear a dispersão de vírus, a identificar variantes de preocupação e a compreender o impacto das mutações na patogenicidade e na transmissão, contribuindo assim para estratégias de controlo mais eficazes (Kim *et al.*, 2020).

1.6 Tratamento

Atualmente não existe um tratamento etiológico efetivo. Contudo, ao longo dos anos, foram desenvolvidas recomendações médicas específicas para diminuir a taxa de mortalidade associada à doença clínica (Goddard & Leisewitz, 2010).

As recomendações atuais sugerem aos clínicos a hospitalização dos animais infectados com aplicação agressiva de cuidados de suporte, isolamento destes animais em áreas de Unidade Infecto-Contagiosa e implementação de todas as medidas de higienização e biossegurança. A taxa de letalidade reduz-se com os cuidados de suporte adequados (Acciacca *et al.*, 2020).

A fluidoterapia está recomendada para pacientes desidratados e com alterações eletrolíticas, sendo a via endovenosa a preferencial para administração de fármacos (Mazzaferro, 2020). É necessária a monitorização do cateter, pois as flebites conferem um perigo importante para estes animais que se encontram imunodeprimidos (Mazzaferro, 2020). Os cateteres devem ser trocados a cada 72 horas. Os eletrólitos devem ser regularmente monitorizados, uma vez que estes cães têm predisposição para hipocalémias e hipoglicémias, especialmente cães de pequeno porte, devido à anorexia, vômito e diarreia (Goddard & Leisewitz, 2010).

Em casos de hipoproteinemia grave associada à diarreia está recomendada a transfusão de plasma, enquanto em situações de anemia severa, é necessária uma transfusão de concentrado de eritrócitos (Goddard & Leisewitz, 2010).

A implementação de terapia com antieméticos para controlo da náusea e vômito é muito importante, pois estes sinais clínicos podem piorar muito o estado do animal se não estiverem controlados. O antiemético mais recomendado é a metoclopramida e, em casos mais graves, associa-se o ondansetron (Mazzaferro, 2020).

É muito importante que os cães com parvovirose tenham um suporte nutricional adequado, recomendando-se a colocação de uma sonda nasogástrica e administração de pequenas porções de alimento várias vezes ao dia, evitando a atrofia dos enterócitos e fornecendo nutrientes necessários para a cicatrização das criptas de Lieberkühn (Mazzaferro, 2020).

A coinfeção com parasitas gastrointestinais pode exacerbar os sinais clínicos do doente; segundo a literatura mais recente, apenas se deve desparasitar no caso de identificação de parasitas em testes de flutuação (Sullivan *et al.*, 2018),

O tratamento com antibióticos endovenosos também está recomendado, idealmente antibióticos de largo espectro de ação para bactérias oportunistas (Goddard & Leisewitz, 2010).

Mais recentemente, está a ser avaliado um método que utiliza transfusões de plasma hiperimune como medida para melhorar o estado vital do animal nas primeiras horas do internamento, sendo estas as mais críticas (Acciacca *et al.*, 2020).

1.7 Prognóstico

O prognóstico da parvovirose canina é reservado nos casos em que o cão ou o cachorro desenvolve enterite grave, principalmente quando a doença clínica está associada a alguns fatores de mortalidade (Greene & Decaro, 2023). Quanto mais cedo o animal começar o tratamento intensivo, melhor o prognóstico (Goddard & Leisewitz, 2010).

Os fatores que estão relacionados com a mortalidade, incluem a presença inicial de leucopenia ou linfopenia, monocitopenia ou a evidência de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) (Greene & Decaro, 2023).

Segundo Bird & Tappin (2023), os casos mais graves, com maior mortalidade e morbilidade, ocorrem em cachorros até às 12 semanas de vida. A mortalidade é de cerca de 70,0% em cachorros e é inferior a 1,0% em cães adultos com tratamento médico (Decaro & Buonavoglia, 2012).

Os animais que recuperam a contagem dos leucócitos nas primeiras 24 horas de internamento hospitalar estão associados a uma boa sobrevivência (Goddard *et al.*, 2008). No geral, cachorros que sobrevivem aos primeiros 3 a 4 dias de tratamento tendem a recuperar na totalidade (Greene & Decaro, 2023).

Estão reportados casos de animais com sequelas de doenças gastrointestinais crônicas devido às lesões causadas pelo vírus como alterações na microbiota intestinal causada pelos antibióticos (Kilian *et al.*, 2018).

A complicação mais frequente é o choque séptico, devido à translocação da população bacteriana do intestino para a corrente sanguínea (Goddard & Leisewitz, 2010). Outras

complicações são bacteriemia, intuspeção intestinal, pneumonia por aspiração e estenose esofágica (Greene & Decaro, 2023).

2. Vírus da panleucopenia felina (FPV)

A Panleucopenia Felina é a doença viral mais antiga conhecida na população felina (Liu *et al.*, 2011). Há relatos históricos do século XIX de vários episódios epizooticos que dizimaram populações de gatos domésticos (Barrs, 2019). O FPV foi identificado pela primeira vez na França em 1928 (Barrs, 2019).

Segundo Barrs (2019), a Panleucopenia Felina é uma síndrome clínica que afeta o gato, causada pela infecção por *Protoparvovirus carnivore 1*, que inclui o Parvovírus Felino (FPV), responsável por 95,0% dos casos, e o parvovírus canino (CPV-2), responsável por 5%.

Ao contrário dos subtipos do CPV-2, o FPV mostra padrões evolutivos diferentes em relação ao hospedeiro. O FPV está evolutivamente estacionário (Schackelton *et al.*, 2005). Esta característica deve-se ao facto de a sua evolução ocorrer predominantemente por deriva genética aleatória, ou seja, pequenas mudanças no genoma surgem de forma não direccionada e sem necessariamente conferirem vantagens adaptativas ao vírus (Schackelton *et al.*, 2005).

A Panleucopenia felina ocorre com mais frequência em gatinhos não vacinados ou com o protocolo vacinal incompleto. Existe maior predisposição em animais muito jovens devido à suscetibilidade relacionada com a idade e a imunidade. É uma doença com uma taxa de mortalidade elevada, atingindo aproximadamente 90,0% em gatinhos (Truyen *et al.*, 2009).

O FPV infeta todos os membros da família *Felidae* (domésticos e selvagens) e alguns canídeos selvagens (subordem *Caniformia*) como guaxinins e raposas. A panleucopenia é uma doença altamente contagiosa que causa leucopenias graves, vômitos, diarreias, dor abdominal e febre (Sykes *et al.*, 2023).

O vírus pode ser transmitido pelo contacto direto com animais infetados, através de fômites ou mecanicamente através de vetores, como moscas, roedores e seres humanos (Greene & Decaro, 2023). A infecção pode ser transmitida verticalmente, por via transplacentária, originando abortos, fetos mumificados, nascimentos prematuros e alterações do sistema nervoso central em gatinhos (Greene & Decaro, 2023). A infecção é, geralmente, gastrointestinal mas, mais raramente, pode ocorrer através do trato respiratório por inalação do vírus (Barrs, 2019).

É necessária uma baixa quantidade de vírus para que ocorra a infecção, o que geralmente ocorre devido ao contacto com fezes contaminadas no meio ambiente (Barrs, 2019). A infecção não significa necessariamente doença clínica, visto que em alguns casos não existem sinais clínicos (Barrs, 2019).

O FPV é excretado predominantemente nas fezes, mas também está presente na urina, vômito e saliva dos animais, sendo muito estável no meio ambiente. A excreção do vírus pode ocorrer em infecções subclínicas ou antes da manifestação clínica (Greene & Decaro, 2023). O PI é de, aproximadamente, 5 dias. A excreção do vírus geralmente dura 2 dias; porém os animais podem excretar partículas virais pelas fezes e urina durante um período máximo de 6 semanas após a recuperação. A doença clínica ocorre 2 a 10 dias após a incubação (Truyen *et al.*, 2009).

Os fatores determinantes da doença clínica são: a idade do animal, o estado imunitário e a possível coinfeção com outros vírus, parasitas intestinais e bactérias oportunistas (Moschidou *et al.*, 2011).

2.1 Patologia

O vírus tem tropismo para o tecido linfóide, medula óssea, epitélio das criptas intestinais e células de Purkinje no cerebelo, no período perinatal (Sykes *et al.*, 2023).

Após a infecção com o vírus FPV, este replica-se inicialmente no tecido linfóide orofaríngeo, o que ocorre nas primeiras 18 a 24 horas após a infecção. Posteriormente, o vírus dissemina-se por via hematógena, sendo detetado 2 a 7 dias após a infecção (Barss, 2019)

As criptas intestinais possuem células epiteliais que têm alta proliferação mitótica e são altamente suscetíveis à infecção viral. Esta infecção causa má absorção dos nutrientes e má digestão e, consequentemente, diarreia (Goddard, A & Leisewitz, A, 2010).

O vírus pode infectar fetos durante as últimas duas semanas de gestação, altura em que os animais se encontram em organogénese. Estes gatinhos estão mais propensos a alterações no sistema nervoso central, devido à seletividade do vírus para as células de Purkinje (Miller *et al.*, 2021).

2.2 Sinais clínicos

A doença viral pode ter um curso subclínico ou clínico. As infecções subclínicas são mais frequentes em gatos jovens adultos (Barrs, 2019). A doença clínica pode ser hiperaguda, originando morte súbita por choque séptico, sem manifestação clínica prévia. Estes casos ocorrem com mais frequência em gatinhos com menos de dois meses de idade (Miller *et al.*, 2021).

Nos casos de doença aguda, os sinais clínicos mais comuns incluem febre persistente, superior a 40 °C durante mais de 24h, letargia, anorexia, vômitos, diarreia e desidratação grave (Barrs, 2019). Apenas alguns destes sinais clínicos podem estar presentes; geralmente, o vômito surge antes do início da diarreia (Greene & Decaro, 2023). Nos casos de infecção por FPV, a diarreia hemorrágica é significativamente menos comum em comparação com o CPV-2 (Kruse *et al.*, 2010). A sialorreia associada à náusea também é um sinal frequente em gatinhos (Litster *et al.*, 2014).

Geralmente ao 3.º ou 4.º dia de sinais clínicos, os animais apresentam-se com febre alta e diarreia profusa e persistente. A desidratação associada a estas diarreias graves são fatores que contribuem para a mortalidade dos gatinhos (Barrs, 2019). A palpação abdominal pode ser dolorosa em alguns casos devido à inflamação associada ao espessamento das ansas intestinais e linfadenopatia dos linfonodos mesentéricos (Sykes *et al.*, 2023).

Os animais com sinais gastrointestinais desenvolvem tipicamente leucopenias, que podem ser graves (50 a 3000 células/ml). A leucopenia está presente em 65,0 a 75,0% dos casos e é caracterizada por neutropenia e linfopenia (Kruse *et al.*, 2010). A trombocitopenia ocorre em 55,0% dos casos devido à destruição dos megacariócitos e da coagulação intravascular disseminada (CID). A anemia ocorre em 50,0% dos casos e geralmente é leve, exceto quando o animal tem diarreia hemorrágica (Greene & Decaro, 2023). As alterações mais frequentes nas análises bioquímicas são hipoproteinemia, hypoalbuminemia, hiponatremia, hipocloremia e aumento da enzima aspartato aminotransferase (ALT) (Kruse *et al.*, 2010).

Dependendo da fase da gestação, a infecção poderá ter comportamentos diferentes tanto na progenitora como no feto. No início da gestação, as gatas infetadas, geralmente, abortam (Greene & Decaro, 2023). Se ocorrer numa fase mais tardia, a infecção intrauterina pode causar alterações anormais no desenvolvimento do cerebelo, que se podem manifestar como síndrome de hipoplasia ou de atrofia cerebelar, hidrocefalia, displasia da retina, hipoplasia do nervo ótico

e hidranencefalia (Url *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 1999). Os gatinhos afetados durante a gestação desenvolvem ataxia e dismetria por volta das três semanas (Miller *et al.*, 2021).

As complicações médicas mais comuns após a infecção, como choque circulatório, septicemia e CID, culminam na morte súbita do animal (Greene & Decaro, 2023). Estes animais também estão suscetíveis a coinfeções por bactérias, parasitas, vírus e fungos devido à imunossupressão grave (Miller *et al.*, 2021).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico clínico é feito com uma boa anamnese, um exame físico completo, análises sanguíneas e com alguns métodos de diagnóstico mais completos, tal como foi abordado no Capítulo 1.5.1 desta dissertação de mestrado.

2.4 Tratamento

A Panleucopenia Felina não tem um tratamento específico, passando este por uma terapia de suporte multimodal, que tem de ser reajustada ao paciente conforme os seus sinais clínicos (Greene & Decaro, 2023).

Sendo uma doença contagiosa, os animais diagnosticados com FPV devem ficar em isolamento. Este isolamento requer todas as medidas de higiene e biossegurança para evitar a contaminação e a transmissão da doença (Truyen *et al.*, 2009).

A desidratação nestes animais é, por vezes, muito grave e requer uma reposição rápida de fluidos e de eletrólitos (Greene & Decaro, 2023). Noutras ocasiões é necessária suplementação com glicose parenteral e colocação de um tubo de alimentação nasogástrico para administração de dietas com elevado teor proteico (Barrs, 2019). Em casos de animais com hipoalbuminemia grave é necessário recorrer a transfusões de plasma. E em casos de anemia grave é necessária uma transfusão com concentrado de eritrócitos (Barss, 2019).

É igualmente necessária a administração por via endovenosa de antibióticos, sendo estes de amplo espectro, abrangendo bactérias *gram* positivas e negativas e anaeróbias (Truyen *et al.*, 2009). Em situações de êmese, está recomendado o uso de antieméticos (Barrs, 2019). Em gatinhos com hematemese, êmese muito frequente ou refluxo secundário a esofagite, está recomendado o uso de protetores gastrointestinais (Barrs, 2019).

2.5 Prognóstico

A Panleucopenia Felina tem uma alta taxa de mortalidade; as taxas de sobrevivência rondam os 20,0 e os 50,0% animais com tratamento (Kruse *et al.*, 2010). Os fatores de prognóstico baseiam-se nos seguintes pontos: o estado geral do animal, o nível de desidratação, os sinais clínicos que o animal manifesta e se a sua recuperação médica está a ser positiva ou negativa (Greene & Decaro, 2023). Todavia, é difícil estabelecer um prognóstico favorável, uma vez que os animais são geralmente muito jovens, sem vacinas.

O prognóstico piora conforme o aparecimento clínico de leucopenia baixa ou trombocitopenia severa nos primeiros 7 dias, hipoalbuminemia ou hipocalemia (Kruse *et al.*, 2010).

Em suma, nos casos em que a intervenção médica é rápida, no sentido de intervenção e hospitalização o prognóstico melhora; porém, é sempre uma situação que necessita de reavaliação conforme a resposta do animal (Greene & Decaro, 2023).

3. Imunoprofilaxia

A vacinação é o método mais eficaz para o controlo da disseminação do vírus e para a prevenção do desenvolvimento clínico da infeção (Day *et al.*, 2016). Deste modo, a vacina contra o CPV-2 e contra o FPV são consideradas vacinas *core* (Day *et al.*, 2016).

As vacinas *core* são as que todos os cães e gatos devem receber, independentemente de fatores como localização geográfica ou estilo de vida. Estas vacinas protegem contra doenças graves e potencialmente fatais (Day *et al.*, 2016). As vacinas não só protegem os animais individualmente, mas também contribui para a imunidade de grupo, reduzindo o risco de surtos de doenças contagiosas e promovendo o controlo eficaz de patologias infecciosas (Day *et al.*, 2016; (World Small Animal Veterinary Association, WSAVA, 2023).

3.1 Vacinação contra o CPV-2

A primeira vacina viva modificada para o CPV foi desenvolvida em 1979. Esta vacina é capaz de estimular a resposta imune mediada por anticorpos, induzindo uma proteção duradoura e forte contra o vírus (Day *et al.*, 2016; Ford *et al.*, 2017). Estas vacinas são caracterizadas por um início rápido e temporalmente longo da imunidade (Decaro *et al.*, 2020).

Por outro lado, as vacinas inativadas estão disponíveis e são as indicadas em animais gestantes (Squires *et al.*, 2024). As vacinas inativadas não possuem o vírus ativo, ao contrário

das vacinas atenuadas (vírus modificados). Isso reduz o risco de reações adversas, como infecção fetal, aborto ou malformações (Day *et al.*, 2016). Desta forma, as vacinas inativadas são uma opção mais segura, pois não representam um risco de replicação viral no organismo da fêmea gestante ou nos fetos (Squires *et al.*, 2024).

3.1.1 Protocolo vacinal CPV - Cão

As diretrizes da *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) recomendam que a primovacinação contra CPV-2 tenha início nas primeiras 6 a 8 semanas de idade; o primeiro reforço deve ser 2 a 4 semanas após a primeira vacina (Squires *et al.*, 2024) e o segundo reforço deve ser administrado após as 16 semanas de idade. As raças de maior risco (como *Rottweiler*, *Doberman*, *American Pit Bull*), recomenda-se administração de uma dose final extra às 18 a 20 semanas de idade para garantir proteção adequada (Squires *et al.*, 2024). É de extrema importância a vacinação dos cachorros antes do seu contacto com a via pública e com outros animais.

Segundo Squires *et al.*, (2024) é recomendado vacinar novamente o animal entre os 6 e os 12 meses de idade ao invés do primeiro ano de idade, de modo a construir uma boa resposta imunitária. Depois disso, recomenda-se revacinar a cada 3 anos.

Vários estudos vieram comprovar que a vacina viva modificada desencadeia uma imunidade humoral de aproximadamente 7 anos (Schultz, 2006; Welborn *et al.*, 2010); contudo, as *guidelines* recomendam a contínua revacinação trianual.

Contudo as *guidelines*, apresentam alguns casos excepcionais no início da primovacinação, como cachorros com baixo risco, que nasceram num ambiente seguro, controlado e com baixa exposição a agentes infecciosos; nestes casos, a vacinação poderá ser mais tarde, por volta das 8 a 10 semanas de idade (Squires *et al.*, 2024). Por outro lado, em casos de situações de risco e cachorros que não ingeriram o colostro, estes deverão iniciar o protocolo mais cedo, nas 4 a 6 semanas de idade (Squires *et al.*, 2024). Os animais que estejam doentes à data da vacinação, deverá ser adiada a vacinação até o quadro clínico normalizar.

3.2 Vacinação contra o FPV

Em 1964, desenvolveu-se a primeira vacina modificada contra o vírus FPV (Barrs, 2019). A vacinação contra FPV é recomendada para todos os gatos, incluindo os gatos exclusivamente *indoor*, uma vez que o vírus é bastante estável no meio ambiente e pode ser transmitido por fómites (Truyen *et al.*, 2009). As vacinas desenvolvidas atualmente possuem o

vírus modificado, enquanto as vacinas inativadas são usadas unicamente para felinos selvagens na Alemanha (Truyen *et al.*, 2009).

3.2.1 Protocolo vacinal FPV- Gato

As diretrizes da WSAVA e o relatório da *American Association of Feline Practitioners* (AAFP) recomendam um plano vacinal que inclua a vacina contra o FPV (Squires *et al.*, 2024).

Este plano inicia-se nas primeiras 6 a 8 semanas de idade quando o animal está saudável, seguida de um reforço a cada 2 a 4 semanas (até às 16 semanas), com uma dose subsequente às 26 semanas de idade (Squires *et al.*, 2024). Em gatos adultos, está recomendada uma série de duas doses de vacinas inativadas ou vacinas do vírus atenuado (MLV) administradas num intervalo de 2 a 4 semanas (Squires *et al.*, 2024). Contudo, sabe-se que apenas uma dose é necessária para estabelecer uma resposta humoral ao vírus FPV (Squires *et al.*, 2024).

Em alguns casos, as diretrizes da WSAVA preveem exceções para o início da primovacinação (Squires *et al.*, 2024). Em casos que os gatos nascem e vivem em ambientes limpos, controlados e com baixo risco de exposição, a vacinação poderá ser adiada para começar entre as 8 e as 10 semanas de idade (Squires *et al.*, 2024). Em situações que os gatinhos não ingerem o colostro e que vivem em ambientes com elevada exposição à circulação viral recomenda-se antecipar para as 4 a 6 semanas (Squires *et al.*, 2024). Por último, em casos que o gatinho esteja imunocomprometido ou doente, recomenda-se adiar a vacinação até à estabilidade clínica (Squires *et al.*, 2024).

Deve-se evitar a administração da vacina viva modificada em gatas gestacionais, pois esta pode induzir sequelas neurológicas nos fetos em desenvolvimento (Squires *et al.*, 2024). Para além disso, não se deve administrar em gatinhos com menos de 4 semanas nem em fêmeas em lactação (Squires *et al.*, 2024).

A vacinação contra o FPV induz uma imunidade humoral duradoura, de, aproximadamente, sete anos. Contudo, é recomendada a revacinação a cada três anos (Squires *et al.*, 2024).

3.3 Falhas na vacinação

As falhas vacinais podem estar relacionadas com a vacina em si ou com o hospedeiro. As causas relacionadas com as vacinas estão relacionadas com o armazenamento errado da vacina, a incorreta administração e a não conformidade com os programas vacinais (Decaro *et al.*, 2020). Os fatores relacionados com os hospedeiros estão diretamente associados à idade do animal, fatores genéticos ou de saúde, nutrição do animal e o seu estado imunológico (Decaro *et al.*, 2020).

A principal causa de falha na vacinação contra o CPV-2 é a interferência que ocorre com a imunidade materna no momento da vacinação ou o facto da vacina não corresponder à variante do vírus que se encontra em circulação (Decaro *et al.*, 2020).

Um estudo desenvolvido por Altman *et al.* (2017) demonstrou que as vacinas inativadas estão frequentemente associadas a falhas vacinais em cachorros comparativamente com as vacinas modificadas.

Por outro lado, existem os animais que não respondem à vacinação, ou seja, não desenvolvem imunidade ao vírus mesmo após as várias doses da vacina; contudo, é uma condição rara (Decaro *et al.*, 2020). Relativamente à parvovirose canina, estudos indicam que cerca de 1 em 1000 cães pode ser geneticamente não responsivo à vacina (Miranda *et al.*, 2016a). Não existe tratamento para reverter esta condição, pelo que a abordagem recomendada consiste em minimizar ao máximo a exposição viral e garantir a biossegurança (Day *et al.*, 2016).

4. Objetivos do estudo

Os principais objetivos deste estudo foram a deteção e identificação molecular de CPV-2 e de FPV em cães e gatos da área Metropolitana da Lisboa, pelo método da sequenciação e de análise filogenética. Adicionalmente, pretendeu-se caracterizar a diversidade genética do gene *vp2*, de modo a identificar mutações e avaliar o seu potencial impacto na antigenicidade e no tropismo viral.

Por fim, o estudo visa comparar a estabilidade genética de CPV-2 nos vários tecidos, tais como fezes e sangue, para determinar as suas implicações no diagnóstico.

II. Material e Métodos

1. Descrição da população em estudo e parecer da CEBEA

No presente estudo foi realizada a pesquisa de CPV-2 e FPV em cães e gatos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a infeção viral na Área Metropolitana de Lisboa (AML), incluindo os concelhos de Lisboa, Amadora, Oeiras, Odivelas, Loures, Alenquer e Setúbal.

O trabalho prático foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa (LACH-FMV-ULusófona).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona (Parecer 23-2022).

Para a realização do estudo foram selecionados 27 animais, 14 gatos e 13 cães, de acordo com os critérios de inclusão seguidamente apresentados. Foram colhidas amostras de sangue para um tubo com Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*) e zaragatoas retais de todos os animais em estudo.

Como critérios de inclusão no estudo, foram aceites animais de ambos os sexos, com sinais clínicos compatíveis com infeção por CPV-2 ou FPV e com um resultado positivo a um teste rápido de antigénio do CPV-2, nomeadamente um SNAP test (Idexx Laboratories®, Portugal). Foi igualmente realizado um questionário aos tutores por forma a obter informações relevantes sobre o animal para o estudo epidemiológico (Apêndice A e C).

1.1 Recolha de amostras

As amostras incluídas neste estudo foram recolhidas em ato de consulta entre novembro de 2022 e dezembro de 2023, no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona. A recolha foi realizada por diferentes médicos veterinários.

As amostras de sangue foram colhidas com máxima assepsia para tubos com EDTA e as amostras de fezes foram obtidas com zaragatoas retais. Posteriormente, as amostras de sangue foram devidamente identificadas e congeladas a -20 graus celsius (°C) e as amostras de fezes refrigeradas a 4 °C.

2. Extração de DNA genómico

2.1 Extração de DNA genómico nas fezes

Foi realizada a extração de DNA das amostras de fezes através do *kit* comercial “Qiamp® DNA Blood Mini Kit” (Qiagen)”, de acordo com as instruções do fabricante:

1. Homogeneizaram-se as amostras com um tampão de lise (500 microlitros (µl) de Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*)) na presença de proteinase K (20µL de solução).
2. Centrifugaram-se as amostras a 13000 ×g durante 10 min e utilizou-se o sobrenadante para o próximo passo.
3. Pipetaram-se 200µl do sobrenadante. Procedeu-se à incubação a 56 °C durante 15min, para a desnaturação e lise das proteínas virais.
4. Colocou-se o lisado numa coluna de sílica gel para fixação seletiva do DNA.
5. Após duas etapas de lavagens com o tampão *Buffer AW1* e *AW2* (volume de 500µl cada) intervaladas por uma centrifugação a 16000 ×g durante 1 minuto.
6. Adicionaram 60µl de tampão de eluição (*Buffer AE* [contém Tris-HCl (ou Tris-hidrocloreto)]) diretamente na coluna de extração.
7. Após a extração do DNA, as amostras foram congeladas a -20 °C.

2.2 Extração de DNA genómico do sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada de acordo com as instruções do *kit* comercial “*High Pure PCR template Preparation Kit*”, (Roche®). O procedimento foi o seguinte:

1. Colocaram-se 200µl de sangue num microtubo de 1,5ml e adicionou-se 200µl de tampão de ligação (6 M guanidina - HCl, 20% *Triton X-100* (v/v), pH 4,4) e 40µl de proteinase K. Homogeneizou-se a mistura e incubou-se durante 10 min à temperatura de 70 °C.
2. Adicionaram-se 100µl de isopropanol e agitou-se. Pipetou-se o volume total da amostra para a coluna de extração. Centrifugou-se a 8000 ×g durante um minuto.
3. Descartou-se o líquido do tubo de recolha. Adicionaram-se 500µl do tampão de remoção de inibidores (5M guanidina - HCl, 20mM Tris - HCl, pH 6,6) e procedeu-se à centrifugação a 8000 ×g durante um minuto.

4. Descartou-se o líquido do tubo. Adicionaram-se 500µl de tampão de lavagem (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5). Centrifugou-se novamente a 8000 ×g durante um minuto.
5. Repetiu-se o passo 4.
6. Descartou-se o tubo de recolha com o líquido e substituiu-se por um microtubo de 1,5ml, onde a coluna de extração foi colocada.
7. Adicionaram-se 100µl de tampão de eluição (10mM Tris, pH 8,5) que já estava previamente aquecido a 70 °C. Centrifugou-se a 8000 ×g durante 1 minuto.
8. O microtubo, com o DNA extraído, foi armazenado a -20°C.

3. Amplificação do gene *vp2*

Foram selecionadas seis amostras de sangue de três cães e três gatos. Foi realizada a amplificação do gene *vp2* utilizando a técnica PCR convencional em todas as amostras fecais e nas seis amostras de sangue. O gene *vp2* codifica a principal proteína da cápside viral, a VP2. A amplificação deste gene foi realizada utilizando dois pares de *primers* diferentes (1F/2R e 3F/4R), de modo a obtermos a amplificação total do gene (Figura 3).



Figura 3 - Estratégia de amplificação do gene *vp2*. Esquema original da autora.

Os *primers* 1F e 2R amplificam uma região do gene *vp2* com 1002 pares de bases (pb) a que se designou o nome de *alfa*. Os *primers* 3F e 4R amplificam uma região do gene *vp2* com 1125 pb a que se designou o nome de *beta*. Por cada amostra, realizaram-se duas reações de PCR convencional, com cada um dos dois pares de *primers*, de modo a amplificar o gene *vp2* na totalidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene *vp2*

<i>Primer</i>	<i>Sequence 5' - 3'</i>	<i>PCR size (Kb)</i>
<i>Alpha_rev</i>	AAATGGTGGTAAGCCCAATG	1002
<i>Alpha_fwd</i>	ACAGGTGATGAATTTGCTACAG	1002
<i>Beta_rev</i>	TCTTCTATTTCTTACGTTATTG	1125
<i>Beta_fwd</i>	ACCAGATCATCCATCAACATC	1125

Os procedimentos para da reação de PCR foram os seguintes:

1. A preparação da mistura reacional foi realizada dentro de uma câmara de uso exclusivo para PCR. Realizou-se a higienização das superfícies de trabalho e materiais com lixívia a 10,0%.
2. Por cada amostra, foi preparada uma mistura composta por 12,5µl de MasterMix (NZYTaQ II 2x Green Master Mix Lda. que contém DNA polimerase NZYTaQ II, um tampão otimizado, dNTPs e MgCl₂), 1µl de cada *primer* na concentração 10pmol/µl e 8,5µl de água desionizada e estéril.
3. Por cada reacção de PCR, prepararam-se dois controlos negativos com adição de água desionizada estéril ao invés da amostra de DNA
4. Adicionaram-se a cada tubo 2µl de DNA da amostra respetiva.
5. Foi também preparado um controlo positivo com adição de DNA de uma amostra positiva previamente conhecida.

As condições da reação PCR encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 3 - Condições da reação de PCR para amplificação do genoma viral.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	10 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	40
*Hibridização dos <i>primers</i> (<i>annealing</i>)	50°C	45 segundos	
Extensão	68°C	2 minutos	
Extensão final	68°C	10 minutos	1

*Em algumas amostras, foi necessário otimizar as condições de reação, nomeadamente na temperatura de *annealing*, variando entre 50 e 54°C.

A reação da PCR foi realizada num termociclador T100™ Thermal Cycler (BioRad) com gradiente de temperaturas, num intervalo compreendido entre os 50 °C e os 54 °C na fase de *annealing*.

4. Eletroforese em gel de agarose

Para a observação dos produtos da PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), segundo o seguinte procedimento:

1. Preparou-se o gel de agarose para o volume pretendido, medindo numa balança técnica (EK-600H, AND®, Tóquio, Japão), a massa de agarose necessária (SeaKem® LE Agarose, Lonza®, Basileia, Suíça).
2. Num *erlenmeyer*, adicionou-se a agarose e o volume necessário de tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) a 1×. Posteriormente, homogeneizou-se a mistura.
3. A suspensão foi colocada no microondas a 700 Watts (W) durante o tempo necessário para obter uma solução homogénea e translúcida, sem qualquer precipitado.
4. Arrefeceu-se um pouco o *erlenmeyer* em água corrente.
5. Foi adicionado *GelRed Nucleic Acid Stain* (Biotium, Landing Park, Fremont, CA, EUA) ao *erlenmeyer*, numa proporção de 0,42 µl por cada 100 ml de gel.
6. Preparou-se o suporte do gel, tapando as extremidades para impedir a saída da solução, e colocaram-se os pentes, para criar os poços onde iriam ser colocadas as amostras.
7. Transferiu-se a solução de agarose para o suporte e aguardou-se a sua polimerização.
8. Colocou-se o gel na tina de eletroforese.
9. Aplicaram-se 5µl do marcador de peso molecular (HyperLadder VII, NZYTech) no primeiro poço. Posteriormente, aplicaram-se 5µl do produto da reação de PCR nos poços seguintes.
10. Colocou-se a tampa na tina de eletroforese, ligou-se a fonte de alimentação (Biometra PS 300TP, Göttingen, Alemanha) e realizou-se a eletroforese a 80 volts (V), durante 60 min.
11. Observaram-se os resultados, colocando o gel sobre um transiluminador Ultravioleta (UV) (AlfaGene®, Carcavelos, Portugal) e registou-se o resultado em fotografia.

5. Purificação dos produtos de PCR

De modo a proceder ao envio das amostras para sequenciação, foi necessário purificar as mesmas para remover os componentes residuais da reação de PCR.

Dependendo das amostras e das bandas observadas no transiluminador UV, foram aplicados dois métodos diferentes de purificação: purificação da reação de PCR ou purificação a partir da banda do gel de agarose.

5.1 Purificação a partir do gel de agarose

A purificação dos produtos da PCR foi efetuada com o *kit* NZYGelpure, de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento foi efetuado da seguinte forma:

1. Fez-se a excisão da banda de DNA a partir do gel de agarose, com uma lâmina de bisturi estéril e colocou-se num microtubo, devidamente identificado.
2. Adicionaram-se 300µl de tampão de ligação por cada 100 mg de gel.
3. Incubou-se a 55-60°C por 10 min e homogeneizou-se duas vezes durante a incubação.
4. Adicionou-se a mistura uma coluna e colocou-se a mesma num tubo coletor de 2ml.
5. Centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima e posteriormente descartou-se o filtrado.
6. Repetiu-se o passo 4 e 5.
7. Pipetaram-se 600µl de tampão de lavagem e centrifugou-se por 1 minuto à velocidade máxima. Posteriormente, descartou-se o filtrado.
8. Centrifugou-se novamente por um minuto, à velocidade máxima, para remover os resíduos de etanol.
9. Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5ml, devidamente identificado. Adicionaram-se 50µl de tampão de eluição no centro da coluna, sem tocar na membrana. Incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente e posteriormente centrifugou-se à velocidade máxima por um minuto.
10. Armazenou-se o DNA purificado a -20 °C.

5.2 Purificação a partir dos produtos da PCR

Nesta técnica transferiu-se o volume total da reação para um microtubo de 1,5ml e adicionaram-se 75µl do tampão de ligação. Homogeneizou-se e realizou-se uma breve centrifugação, à velocidade máxima. Seguidamente, colocou-se o produto final do passo anterior numa coluna com um tubo coletor e aplicou-se o protocolo descrito no ponto 5.1 a partir do ponto 5.

6. Sequenciação e análise bioinformática

A sequenciação dos produtos de amplificação purificados foi realizada pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), pela empresa StabVida em Portugal. A sequenciação foi feita em ambos os sentidos, utilizando os mesmos *primers* usados na reação de PCR (Tabela 2).

Os cromatogramas gerados foram analisados e editados no programa BioEdit Sequence Alignment Editor ® v7.2.5. Foram geradas sequências consenso contruídos *contigs* por meio da ferramenta CAP (*Contig Assembly Program*). A pesquisa de sequências homólogas foi feita através da ferramenta BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado no programa MAFFT v7, pelo método Q-INS-i, seguido de um refinamento com o algoritmo Gblocks para a remoção de regiões ambíguas. A inspeção final do alinhamento foi conduzida no programa AliView, assegurando a conformidade com a grelha de leitura.

As relações filogenéticas entre as sequências foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo GTR+G+I. A construção da árvore filogenética foi realizada no programa IQ-TREE v.1.6.12, com suporte estatístico obtido por meio de 10000 réplicas de *bootstrap*. Valores de suporte de *bootstrap* iguais ou superiores a 75% foram considerados indicativos de robustez topológica das árvores geradas.

A diversidade genética entre as sequências obtidas foi explorada por meio de uma análise de haplótipos no programa PopArt.

De modo, a perceber as divergências nas sequências nucleotídicas entre as diferentes amostras de CPV-2, realizou-se uma análise de haplótipos com todos os animais infetados com o CPV-2, para comparar os animais infetados com FPV e para perceber se o vírus detetado no

sangue é ou não idêntico ao identificado nas fezes do mesmo animal. Para a análise comparativa de sangue com fezes, selecionou-se aleatoriamente 6 animais infectados com CPV-2.

7. Análise estatística

A análise estatística descritiva e os gráficos do presente estudo foram obtidos através do software Microsoft® Excel® (Microsoft® 365).

III. Resultados

1. Caracterização da população estudada

Foram incluídos no presente estudo 27 animais, 13 cães (48,2%) e 14 gatos (51,8%), provenientes da AML, com a distribuição constante na Figura 2. Relativamente à área geográfica nos concelhos na AML, dois animais da amostra pertenciam ao conselho de Setúbal (Tabela 4). Não foi possível determinar a origem geográfica de seis dos animais.

Tabela 4 - Distribuição da amostra total pela respetiva área geográfica.

Distrito	Concelho	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Lisboa	Odivelas	2	7,41%
	Amadora	3	11,11%
	Lisboa	6	22,22%
	Alvalade	1	3,70%
	Benfica	1	3,70%
	Marvila	1	3,70%
	Loures	1	3,70%
	Alenquer	3	11,11%
Setúbal	Moita	1	3,70%
	Palmela	1	3,70%
	Desconhecido	7	25,93%
	Total	27	100,00%

Relativamente ao sexo, 40,7% (11/27) dos animais eram machos e 59,3% (16/27) eram fêmeas. No grupo dos cães, 30,8% (4/13) eram machos férteis, 69,2% (9/13) eram fêmeas férteis (Gráfico 5). No grupo dos gatos, 50,0% (7/14) correspondiam a machos, sendo 35,7% (5/14) machos férteis e 14,3% (2/14) machos não férteis. Relativamente às fêmeas, 35,7% (5/14) eram fêmeas férteis e 14,3% (2/14) fêmeas não férteis (Gráfico 6) (Apêndice C).

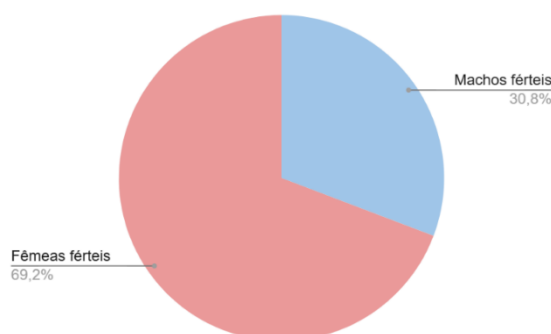


Gráfico 5 - Distribuição da amostra de cães por sexo e estado fértil ($n=13$).

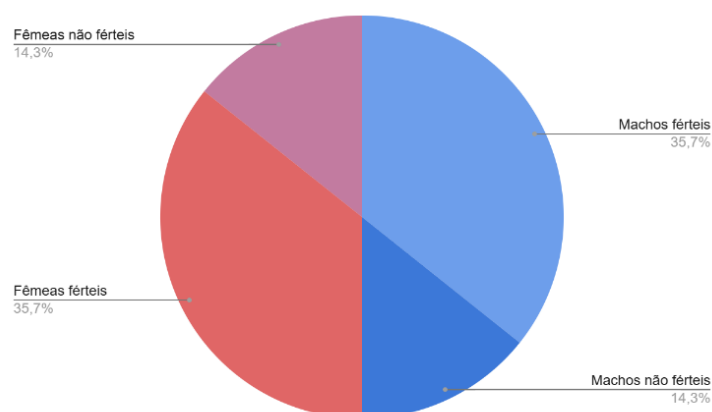


Gráfico 6 - Distribuição da amostra de gatos por sexo e estado fértil ($n=14$).

O intervalo de idades da amostra variou entre os 2 meses e os 13 anos, sendo a moda 2 meses de vida. A média de idade dos animais foi de 4 meses.

Relativamente à raça dos cães, 69,2% (9/13) eram sem raça definida (SRD); as raças *Yorkshire Terrier*, Dogue Alemão e Serra da Estrela representaram, cada, 7,7% (1/13) da amostra. De um dos cães não se obteve informação em relação à raça [7,7% (1/13)]. No grupo dos gatos, 64,3% (9/14) eram SRD, 14,0% (2/14) eram *Scottish Straight* e 14,0% (2/14) domésticos de pelo curto. De um dos gatos não foi possível determinar a raça (7,1%, 1/14) (Apêndice C).

Relativamente ao estilo de vida, 38,5% (5/13) dos cães vivia *indoor* e *outdoor*, 23,1% (3/13) era unicamente *indoor*, 15,4% (2/13) era exclusivamente *outdoor*. Em 23,1% (3/13) dos cães essa informação era desconhecida. Por outro lado 57,1% (8/14) dos gatos vivia exclusivamente *indoor* 21,4% (3/14) era exclusivamente *outdoor*, apenas 7,1% (1/14) vivia *indoor* e *outdoor* e em 14,3% (2/14) dos casos essa informação era desconhecida (Apêndice C).

Em relação ao estado de profilaxia, tendo em conta as vacinas contra o CPV-2 e FPV, 63,0% (17/27) não estavam vacinados, 11,1% (3/27) tinham o protocolo vacinal incompleto (apenas uma dose) e apenas 7,4% (2/27) tinham o protocolo vacinal completo. Contudo, para 14,8% (4/27) da população alvo, não se obteve informação relativamente ao seu estado vacinal (Gráfico 7 e 8) (Apêndice C).

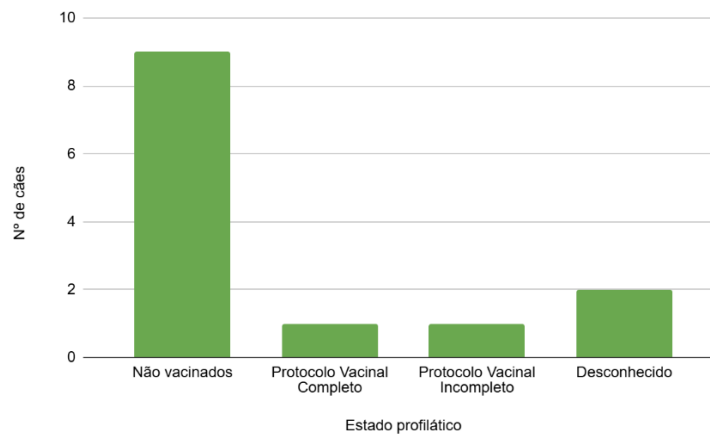


Gráfico 7 - Distribuição da amostra de cães por estado vacinal ($n = 13$).

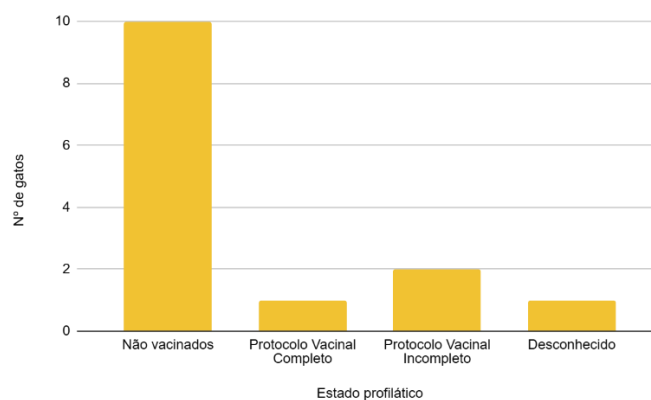


Gráfico 8 - Distribuição da amostra de gatos por estado vacinal ($n = 14$).

Com base no questionário realizado aos tutores, relativamente aos sinais clínicos que os animais apresentaram, os principais foram anorexia (69,6%; 16/23), vômitos (65,2%; 15/23), diarreia não hemorrágica (56,5%; 13/23), desidratação, (39,2%; 9/23), prostração (39,2%; 9/23) e diarreia hemorrágica (13%; 3/23). A percentagem total é superior a 100%, pois vários animais apresentavam vários sinais clínicos (Apêndice C).

2. Detecção molecular

A amplificação do gene *vp2* foi possível em todas as amostras incluídas no estudo (Figura 4).

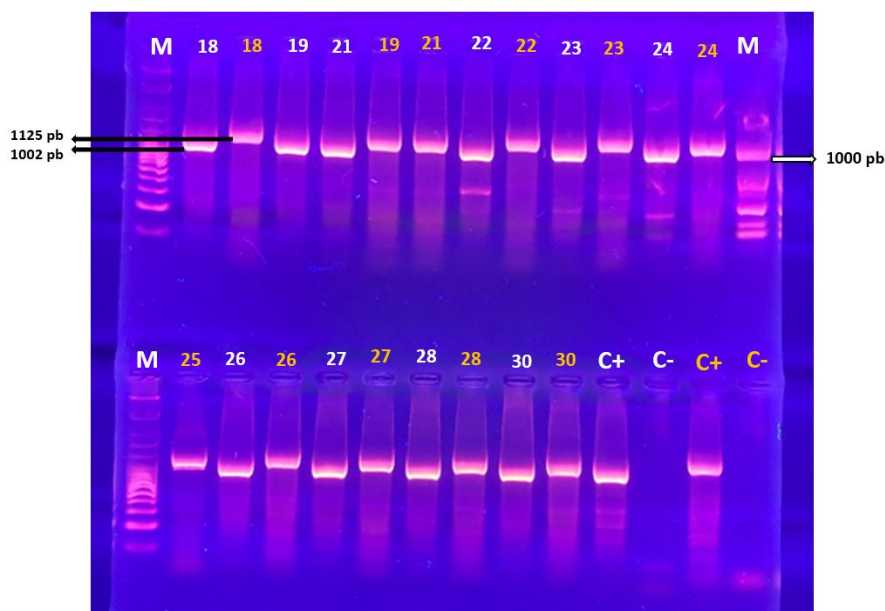


Figura 4 - Resultados da amplificação do gene *vp2* observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%. M: Marcador de peso molecular (100 bp ladder, Bioline). Linhas 18 a 30: produtos de PCR de 11 amostras do estudo. Os números e letras a branco representam a secção alfa e os números e letras a amarelo representa a secção beta. C+: Controlo positivo. C-: Controlo negativo. Fotografia original do autor.

Foi possível obter a sequência nucleotídica de todas os produtos de PCR enviados para sequenciação.

3. Subtipificação com base no perfil aminoacídico

Após a tradução das sequências nucleotídicas (Apêndice B) e análise do padrão de variação dos aminoácidos, foram detetadas alterações que permitiram classificar o vírus ao nível do subtipo no caso do CPV-2.

Entre os produtos da PCR obtidos, 48,1% (13/27) revelaram um perfil aminoacídico sugestivo de FPV, 40,7% (11/27) o subtipo CPV-2c e 11,1% (3/27) o subtipo CPV-2b (Gráfico 9).

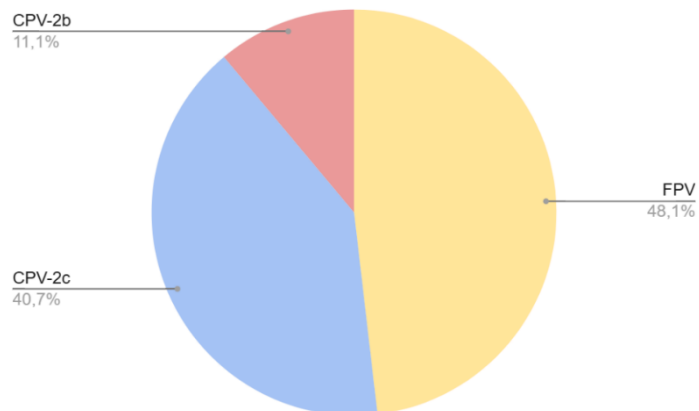


Gráfico 9 – Resultados da subtipificação com base no perfil aminoacídico obtidos da amostra total ($n = 27$).

Em cães observou-se que o subtipo CPV-2c era o predominante (76,9% (10 /13)) e o subtipo CPV-2b estava presente em 3 amostras (23,1% (3/13)). (Gráfico 10). Nos gatos, foi amplificado DNA de FPV em 13 dos 14 animais (92,9%). Num dos animais foi identificado o subtipo CPV-2c (Gráfico 11).

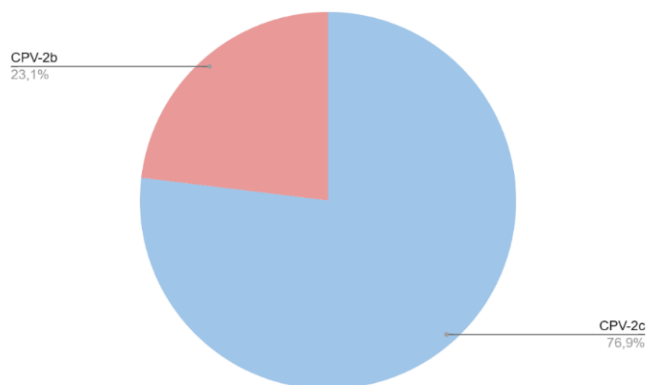


Gráfico 10 – Resultados da subtipificação com base no perfil aminoacídico nos cães ($n =13$).

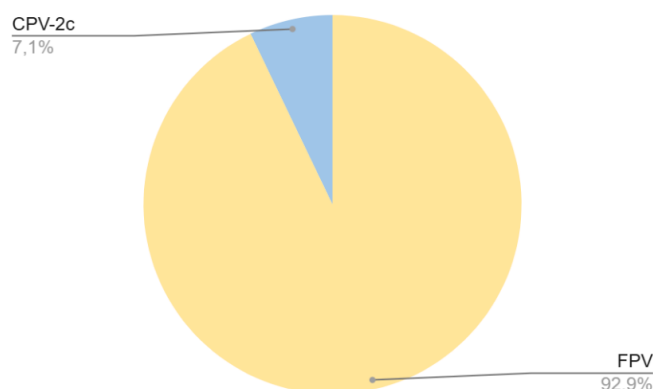


Gráfico 11 - Resultados da subtipificação com base no perfil aminoacídico nos gatos
(*n* =14)

Relativamente as amostras, que amplificaram FPV nos gatos, 28,6% (4/13) dos animais tinham mais de 6 meses de idade e 64,3% (9/13) tinha menos de 6 meses de idade. De um dos gatos não foi possível determinar a idade (7,1%, 1/13). O gato infectado por CPV-2c tinha 2 anos e tinha o protocolo vacinal incompleto. Em relação ao estado vacinal dos 13 gatos que amplificaram FPV, 76,92% (10/13) não estavam vacinados, 15,38% (2/13) tinham o protocolo vacinal incompleto e 7,69% (1/13) o estado de vacinação é desconhecido.

Para além das variações aminoacídicas compatíveis com as das estirpes de referência, foram detetadas, ainda, seis variações nas amostras sequenciadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Mutações identificadas nos resíduos aminoacídicos das amostras em estudo.

Resíduo Aminoacídico	Mutação	Fezes (nº amostra)	Sangue (nº amostra)	Animal	Subtipo viral
5	A5G	4, 28, 30	4, 28, 30	Cães	CPV-2b
14	A14T	1, 23	1, 23	Gatos	FPV
34	G34S	15		Cão	CPV-2c
192	S192F	22, 16	1, 22	Gatos	FPV
324	Y324I	Todas as amostras	Todas as amostras	Cães e Gato	CPV-2b e CPV-2c
370	Q370R	Todas as amostras	Todas as amostras	Cães e Gato	CPV-2c

Legenda: A título de exemplo, na mutação A5G a letra A representa o aminoácido da sequência original, 5 representa a localização do resíduo aminoacídico na proteína VP2 e a letra G representa o aminoácido após a mutação.

4. Análise árvore filogenética

A árvore filogenética foi realizada com base nas sequências nucleotídicas obtidas a partir das fezes dos cães e dos gatos, sequências de referência do CPV-2 e FPV e sequências da estirpe vacinal, obtidas no GenBank.

A árvore indicou a relação evolutiva entre as diferentes sequências virais, como os subtipos do CPV e do FPV. Os valores de *bootstrap* foram na maioria superiores a 0,88 (Figura 5).

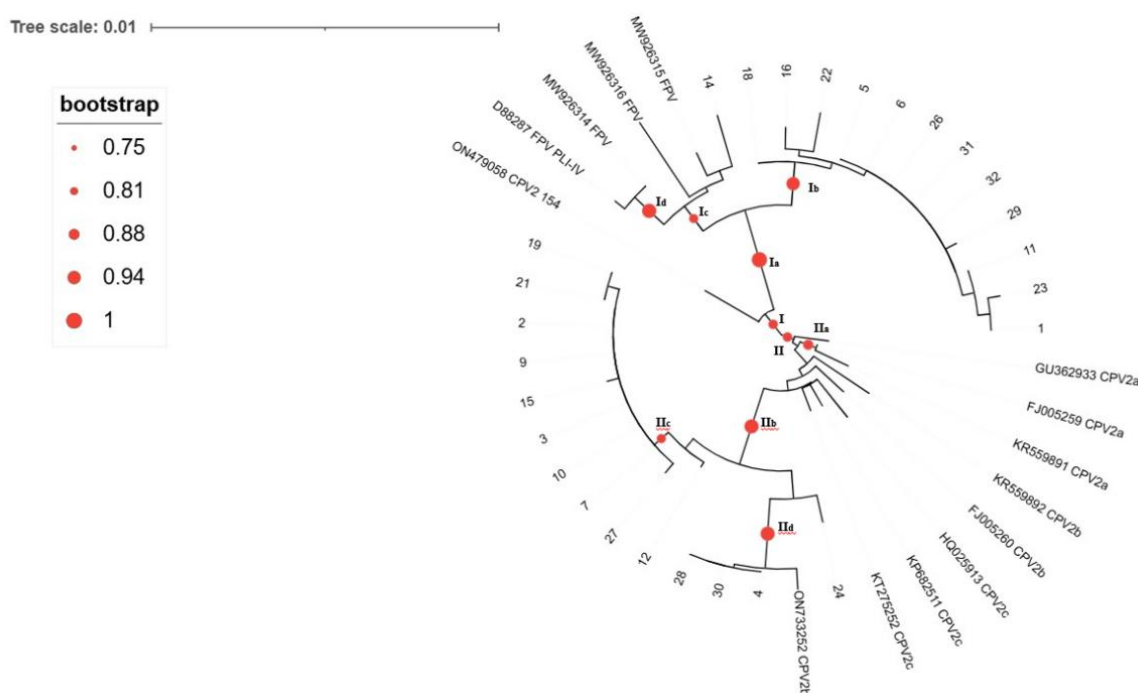


Figura 5 - Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança a partir de sequências do gene *vp2* de *Protoparvovirus* (1728 nucleótidos alinhados de forma não ambígua). Os valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 10000 réplicas e estão indicados nos nós dos respectivos ramos (apenas valores $\geq 75\%$). O tamanho dos círculos vermelhos é proporcional ao valor de *bootstrap*, conforme indicado na legenda. A escala linear representa o número de substituições nucleotídicas.

A maioria das sequências obtidas de amostras de gatos segregaram em *clusters* (I) suportados por elevado *bootstrap* juntamente com sequências de FPV de referência. Por outro lado, a totalidade das sequências obtidas de amostras de cães e um de gato (amostra 12) segregaram juntamente com sequências de referência de CPV-2 para o *cluster* (II).

Contudo, são observados intragrupos nos clusters referentes a FPV e CPV, sendo que neste último nenhum revela monofilia para subtipos virais.

5. Análise de haplótipos das amostras

5.1. Análise de haplótipos do CPV-2

A análise de haplótipos foi realizada com base nas sequências nucleotídicas obtidas das fezes dos animais infectados com CPV-2. Esta análise revelou dois haplótipos dominantes onde estão incluídas as sequências referentes a CPV-2b e CPV-2c. Na variante CPV-2c, que inclui os haplótipos “2”, “3”, “7”, “9”, “10”, “12”, “15”, “19”, “21”, “24” e “27”, observa-se uma maior concentração de indivíduos em torno de um haplótipo dominante. Os haplótipos das amostras “15”, “19”, “21”, “24” e “27” estão ligados por poucas mutações ao haplótipo dominante (Figura 6).

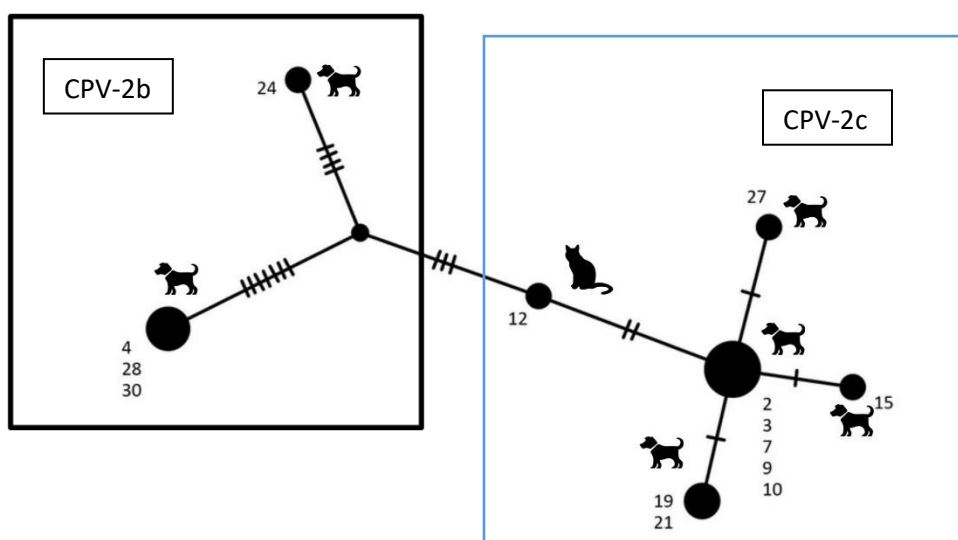


Figura 6 - Análise de haplótipos do CPV-2. Cada traço corresponde a uma alteração nucleotídica.

Por outro lado, a variante CPV-2b, representada pelo haplótipo com as amostras “4”, “28” e “30”, forma um *cluster*, com um número significativo de mutações que o diferenciam do subtipo CPV-2c.

Com esta análise, verificou-se que o haplótipo da amostra do animal “12”, que corresponde ao gato infectado com CPV-2c, apresenta diferenças a nível estrutural dos demais parvovírus amplificados nas amostras de cães. Apresentando duas divergências nucleotídicas

do haplótipo dominante CPV-2c e 10 divergências nucleotídicas do haplótipo dominante CPV-2b.

5.2. Análise de haplótipos do FPV

A Figura 7 representa a análise de haplótipos realizada para o FPV, utilizando as sequências nucleotídicas das fezes dos gatos infectados com FPV.

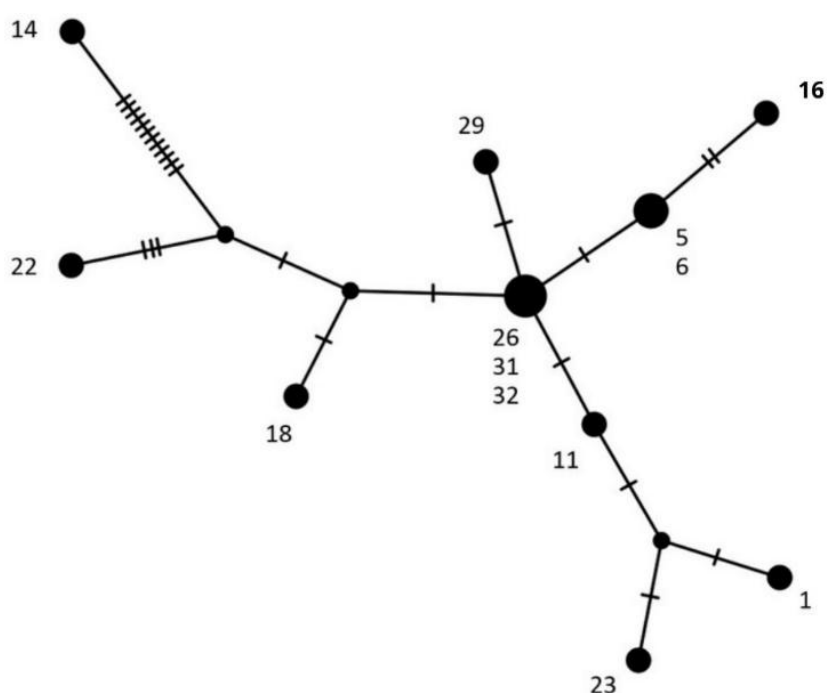


Figura 7- Análise de haplótipos do FPV. Cada traço corresponde a uma alteração nucleotídica.

A rede de haplótipos do vírus FPV apresenta um haplótipo dominante, representado pelo círculo maior (amostras “26”, “31” e “32”). A longa ramificação que liga o haplótipo dominante ao haplótipo da amostra do animal “14” reflete uma divergência em 14 posições nucleotídicas e em 17 posições relativamente aos haplótipos “1”, “16” e “23”. O haplótipo da amostra do animal “16”, que corresponde ao animal que foi vacinado, diverge de todos os outros haplótipos do FPV.

A análise revela muitas variações nucleotídicas no vírus FPV presente nas diferentes amostras.

5.3. Comparação das amostras fecais e sanguíneas

A Figura 8 mostra a análise de haplótipos com intuito de comparar as amostras fecais e sanguíneas dos mesmos animais. Foram selecionados aleatoriamente seis animais, três cães e três gatos, infectados com CPV-2, no caso dos cães, e FPV, no caso dos gatos.

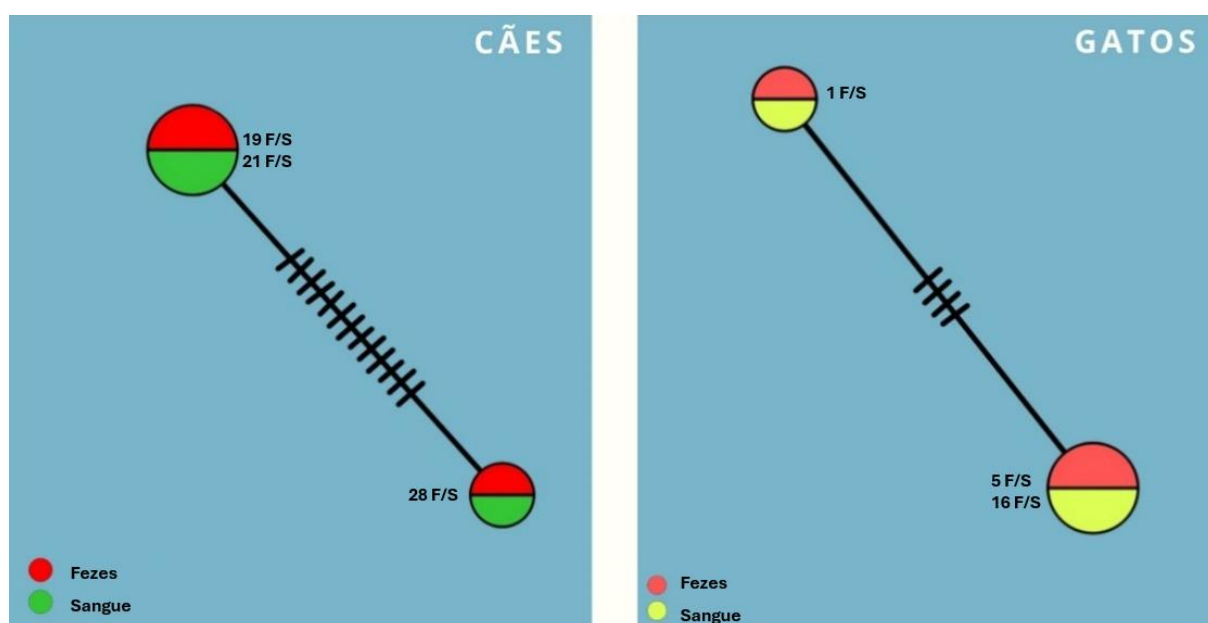


Figura 8 – Análise de haplótipos das amostras fecais e sanguíneas. Gráfico da esquerda: F - Fezes, estando representado a vermelho; S - Sangue, estando representado a verde. Gráfico da direita: F – Fezes, estando representado a vermelho; S – Sangue, estando representado a amarelo. Os números junto dos haplótipos representam o número da amostra selecionada.

No caso dos cães, os haplótipos do cão “19” e “21” estão agrupados, indicando que o vírus presente no sangue e nas fezes não evidência qualquer diferença. A amostra “28”, difere em 13 mutações nucleotídicas do haplótipo “19” e “21”.

Para os gatos, os haplótipos “1”, “5” e “16” também mostram identidade entre as amostras de sangue e fezes. O gato “1” apresenta um haplótipo mais isolado, enquanto os gatos 5 e 16 estão mais próximos geneticamente, indicando uma relação mais próxima entre esses dois indivíduos.

Em suma, foi observado que entre as sequências do gene *vp2* não foi evidenciada qualquer diferença entre as sequências obtidas das fezes e sangue do mesmo animal.

IV. Discussão

O CPV e o FPV são agentes patogénicos com elevada relevância clínica e epidemiológica. Estes vírus são responsáveis por infeções graves e altamente contagiosas (Marenzoni *et al.*, 2020), sendo ambos vírus de DNA de cadeia simples, suscetíveis à ocorrência de mutações no seu genoma (Shackleton *et al.*, 2005). Atualmente, estes vírus apresentam uma distribuição global (Voorhees *et al.*, 2019). Este estudo pretendeu caracterizar os vírus CPV e FPV em cães e gatos na Área Metropolitana de Lisboa.

Como método de deteção e caracterização foi escolhida a reação de PCR e subsequente análise de sequências, a partir de amostras de sangue e de fezes. Apesar de ser frequente a utilização de amostras de zaragatoa retais para a realização da PCR (Mochizuki *et al.*, 1993; Strottmann *et al.*, 2007), este estudo também pretendeu comparar a deteção do vírus no sangue e nas fezes de seis animais selecionados aleatoriamente. A PCR foi o método escolhido, por ser considerado o método de referência para o diagnóstico da infeção por CPV-2 (Desario *et al.*, 2005). Este método tem uma sensibilidade superior a 90,0% (Crawford & Sellon, 2010).

No presente trabalho foram seguidas todas as normas de boas práticas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Estas incluíram aferição da qualidade do DNA amplificado, a minimização de contaminações cruzadas, boas práticas de desinfeção do material e das superfícies e a utilização de controlos positivos e negativos para cada reação.

O gene *vp2* foi o foco das análises moleculares deste estudo devido ao seu papel importante na antigenicidade, tropismo viral e interação mais eficiente com o recetor Tfr (Shackleton *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2006). O gene *vp2* tem sido frequentemente utilizado para identificação e classificação de novos subtipos virais (Santana *et al.*, 2022). A análise do gene *vp2* tem sido o método de referência para a classificação do CPV (Santana *et al.*, 2022); num estudo recente, foram analisados genomas completos e sequências completas do gene *vp2* que permitiram novas propostas de classificação filogenética (Grecco *et al.*, 2018; Moon *et al.*, 2020; Nguyen Manh *et al.*, 2021).

A variante mais prevalente nos cães deste estudo foi o CPV-2c (Gráfico 10). Este achado vai ao encontro dos resultados registados na literatura por outros autores (Miranda *et al.*, 2016a; Decaro *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2008). A prevalência do CPV-2 em Portugal tem sido estudada, destacando-se a predominância do subtipo CPV-2c entre os cães. Vieira e colaboradores (2008), com uma amostra 30 cães com sinais clínicos de infeção por CPV-2, confirmaram que a variante CPV-2c era o subtipo predominante nos cães da região Centro de Portugal. Mais recentemente, Miranda e colaboradores (2016a) analisaram amostras de 260 cães em Portugal, entre 2007 e 2012, e concluíram o mesmo. Por outro lado, Decaro e colaboradores (2011), descreveram, em Portugal, os subtipos CPV-2b e CPV-2a como os mais frequentes, contrastando com a predominância do CPV-2c em Espanha, Itália e Alemanha.

Desde a sua identificação, em 2000, o subtipo CPV-2c disseminou-se rapidamente por várias regiões do mundo (Santana *et al.*, 2022), tendo vindo a substituir progressivamente os subtipos CPV-2a e CPV-2b em diversas regiões (Decaro *et al.*, 2012). Este não evidenciou ser mais virulento em relação aos subtipos CPV-2a e CPV-2b (Decaro & Buonavoglia, 2012); contudo, devido ao acumular de mutações aminoacídicas na proteína VP2, o vírus aumentou a sua patogenicidade em relação à estirpe original (Carmichael, 2005). Esta variante apresenta títulos virais mais elevados nas fezes, manifesta uma doença clínica mais grave (Decaro & Buonavoglia, 2012) em comparação com a estirpe original.

Esta disseminação global tem implicações importantes para a saúde animal e existem estudos que propõem que a dispersão viral esteja relacionada com o transporte de animais infetados ou de vetores mecânicos contaminados (Hoelzer *et al.*, 2008).

Durante a evolução, os novos subtipos do CPV-2 passaram a infetar não apenas cães, mas também gatos domésticos e selvagens (Decaro *et al.*, 2008). No entanto, o impacto da infeção pelo CPV em gatos ainda não é completamente compreendido (Clegg *et al.*, 2012). Segundo a literatura, a maioria dos casos reportados de CPV em gatos apresenta sintomatologia clínica muito semelhante à causada pelo vírus FPV (Battilani *et al.*, 2007, 2013; Hoelzer & Parrish, 2010). Segundo Miranda e colaboradores (2014) são necessários mais estudos epidemiológicos em larga escala para determinar a prevalência e o impacto da infeção por CPV em gatos a nível global, uma vez que os testes de diagnóstico de ELISA e de Imunocromatografia não diferenciam infeções por CPV e FPV e os sinais clínicos são semelhantes.

Neste estudo, foi identificada e caracterizada uma amostra de um gato infetado com CPV-2c. Tratava-se de uma fêmea inteira, sem raça definida, com dois anos de idade e não vacinada. Não havia informações disponíveis sobre o seu estilo de vida, e apresentava como sinais clínicos vômitos e perda de apetite.

Em 2014, Miranda *et al.* publicaram o primeiro caso de um gato infetado com CPV-2c em Portugal. Nesse estudo, os autores concluíram que o CPV-2c consegue infetar e causar doença em gatos, sendo transmitido principalmente por cães, embora a transmissão entre gatos também seja possível. Além disso, os gatos podem representar um fator de risco na disseminação do CPV-2 para outros animais (Decaro *et al.*, 2010). Como consequência deste potencial risco epidemiológico, diversos autores sugerem a hipótese de que as vacinas felinas que incluem FPV podem não conferir imunidade cruzada contra os subtipos de CPV-2 (Decaro *et al.*, 2010). No entanto, um estudo realizado por Gamoh *et al.* (2005) demonstrou que uma vacina de FPV foi capaz de proporcionar proteção cruzada contra o subtipo CPV-2b.

Os subtipos CPV-2 representam uma ameaça à população de gatos domésticos, sendo necessários mais estudos de vigilância epidemiológica e avaliações à eficácia das vacinas atuais (Decaro *et al.*, 2010).

A vacinação é a forma mais efetiva de controlar a disseminação da infecção e prevenir o desenvolvimento de doença clínica (Decaro *et al.*, 2020). As diretrizes da WSAVA recomendam vacinar o maior número possível de animais, em conformidade com o conceito de imunidade de grupo e, desta forma, reduzir o risco de surtos infecciosos (Day, 2017).

Embora existam programas de vacinação a nível global e de ser uma vacina *core*, a infecção por CPV permanece uma das doenças infecciosas mais comuns e uma importante causa de mortalidade em cães jovens, inclusive em países desenvolvidos (Decaro & Buonavoglia, 2012). No entanto, este fator não explica por que razão a esgana canina (CDV) e a hepatite infecciosa canina (CAV-1) estão efetivamente controladas pela vacinação, enquanto o CPV continua a representar uma ameaça significativa (Decaro *et al.*, 2020).

No estudo de Kelman *et al.*, (2019) na Austrália, com dados recolhidos em hospitais veterinários pelo país, estimou-se a incidência de 4 casos de CPV por 1000 cães. A possível explicação para que o CPV persista como uma ameaça, está relacionada com características específicas, como a duração mais prolongada de imunidade materna e na extensão da janela

de suscetibilidade, em comparação com o CDV e CAdV-1 (Griot *et al.*, 2004; Day *et al.*, 2016), e a sua persistência no ambiente por 12 meses ou mais meses em condições favoráveis (Greene & Decaro, 2012). O vírus também apresenta resistência a muitos desinfetantes de uso comum; todavia a solução de hipoclorito de sódio a 0,75% tem demonstrado eficácia na sua eliminação (Cavalli *et al.*, 2018).

A conscientização dos tutores também desempenha um papel crucial na contenção da doença. É importante educá-los sobre a relevância da vacinação, da higiene adequada e do controle da circulação dos animais em áreas de risco.

Os resultados deste estudo realçam a importância da vacinação na prevenção do desenvolvimento de doença clínica. A análise revelou que 63,0% (17/27) dos animais em estudo não estavam vacinados, enquanto apenas 7,4% (2/27) tinham o protocolo vacinal completo (Gráfico 7 e 8). Esta lacuna na cobertura vacinal representa um fator de risco significativo para a disseminação de ambos os vírus.

A elevada percentagem de animais não vacinados pode estar relacionada com diversos fatores, incluindo a falta de conhecimento dos tutores sobre a importância da vacinação e dificuldades financeiras. Muitos tutores desconhecem os riscos associados à ausência de imunização e, em alguns casos, acreditam que a vacinação não é necessária para animais que vivem dentro de casa, como é o caso dos gatos *indoor*.

Para resolver esta situação, é essencial investir em campanhas de sensibilização e de educação que informem os tutores sobre a importância da vacinação. A criação de programas de vacinação, poderia aumentar significativamente a taxa de adesão, à semelhança do que é realizado com a Raiva a nível nacional.

Como principal limitação do presente estudo, destaca-se o tamanho da amostra, que é pouco representativo e pode não ser suficiente para identificar toda a variabilidade de subtipos que circula nos cães e gatos da área metropolitana de Lisboa. Estudos futuros devem ampliar o tamanho da amostra para incluir uma população mais diversificada e mais áreas geográficas.

A Panleucopenia felina é uma doença comum, responsável por gastroenterites e leucopenias, e está associada a altas taxas de mortalidade em gatinhos (Miranda *et al.*, 2015). O FPV é endémico em muitas populações de gatos e altamente estável no ambiente (Greene

& Andie, 2006), o que contribui para a sua persistência e para a ocorrência ocasional de surtos (Böhm *et al.*, 2004).

Neste estudo, foi possível identificar sequências de FPV em 92,9% (13/14) dos gatos. Dois gatos tinham o protocolo vacinal incompleto (Gráfico 8), contudo apresentavam sinais clínicos gastrointestinais. Com uma amostra de 14 gatos doentes, este estudo confirmou a predominância de infecção por FPV nos gatos (Gráfico 11).

No estudo de Tang *et al.*, 2022, os resultados mostraram que o FPV continua a ser o vírus predominante a circular nas populações de gatos em Pequim. Também Miranda *et al.*, (2017), em Portugal, com uma amostra de 30 gatos entre os anos de 2012-2014, demonstraram que o FPV é o vírus predominante nos gatos em Portugal. O presente estudo corrobora os resultados dos autores referidos, uma vez que o vírus predominante em circulação nos gatos estudados foi o FPV (Gráfico 11).

No presente estudo, de entre os gatos infetados com FPV, 64,29% (9/14) tinham menos de seis meses (Gráfico 12) e 76,92% (10/13) não estavam vacinados (Gráfico 13), o que sugere que estes gatinhos não estavam protegidos contra a infecção por FPV no momento de contacto com o vírus (Miranda *et al.*, 2017).

Um estudo retrospectivo de Truyen & Parrish (2013) demonstrou que 37,0% (24/64) dos gatos infetados haviam sido vacinados pelo menos uma vez, o que pode ser explicado pela interferência dos anticorpos maternos ou pela existência de subtipos virais com mutações na cápside e que podem escapar à imunidade conferida pelas vacinas.

A possibilidade de coinfeção entre CPV-2 e FPV em gatos, embora não observada neste estudo, encontra-se documentada na literatura atual e pode contribuir para a emergência de novos subtipos por recombinação (Battilani *et al.* 2011).

Ambos os vírus apresentam uma taxa de mutação bastante alta comparativamente com outros tipos de vírus com genoma de DNA, assemelhando-se às taxas apresentadas por vírus com genoma de RNA (Schackelton *et al.*, 2005). No entanto, sendo um vírus com genoma de DNA, cuja replicação no ciclo viral é mediada por uma DNA polimerase de alta precisão, a rápida evolução do CPV na natureza durante a sua emergência inicial é inesperada do ponto de vista molecular (Voorhees *et al.*, 2019).

As mutações identificadas, incluindo alterações nos resíduos aminoacídicos 5, 14, 34, 192, 324 e 370, refletem a contínua evolução genética deste vírus (Tabela 4). O aparecimento destas mutações sublinha a importância de monitorizações epidemiológicas contínuas para identificar subtipos emergentes (Miranda *et al.*, 2016a).

No estudo realizado por Tang *et al.* (2022), a mutação Y324I foi identificada em estirpes de CPV-2c isoladas de gatos em Pequim, China, semelhante aos resultados obtidos neste estudo. Esta mutação altera a estrutura da cápside viral, modificando epítomos e facilitando a adaptação do vírus a diferentes hospedeiros e a condições ambientais (Li *et al.*, 2017). Esta mutação foi identificada em todos os cães e no gato infetado com CPV-2c e nas três amostras de cães infetados com CPV-2b.

Um estudo recente realizado na China por Pu *et al.* (2024), com uma amostra de 128 cães suspeitos de infeção por CPV, analisou o perfil aminoacídico das estirpes virais isoladas. Os resultados revelaram que o subtipo CPV-2c identificado era geneticamente idêntico às variantes previamente descritas na China, apresentando as mutações F267Y, Y324I, Q370R e A5G, além da mutação característica N426E (Pu *et al.*, 2024).

O resíduo de aminoácido 324 na proteína VP2, está localizado numa região altamente antigénica, essencial para a entrada viral através da ligação ao recetor da transferrina (Tsao *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2017). Uma análise recente, num estudo de Alexis *et al.* (2021), identificou uma associação entre os resíduos 267 e 324 na seleção positiva do CPV-2b, sugerindo um possível papel na evasão da resposta imune do hospedeiro.

A mutação A5G foi identificada nas três amostras do subtipo CPV-2b. Esta mutação foi descrita por Sarabandi & Pourtaghi (2023), nas amostras de CPV-2c. Embora seja mais frequentemente associada ao subtipo CPV-2c, a presença desta mutação em CPV-2b indica um possível processo de convergência adaptativa. No entanto, o papel deste aminoácido ainda não foi identificado e é necessária mais investigação para compreender o impacto na patogenicidade viral e na eficácia das vacinas (Sarabandi & Pourtaghi, 2023). O resíduo aminoacídico na posição 5 está localizado na extremidade N-terminal dentro de uma região antigénica crucial da proteína VP2 (Langeveld *et al.*, 1993). A mutação A5G é frequentemente encontrada juntamente com as mutações F267Y, Y324I e Q370R (Hao *et al.*, 2022). Neste estudo, as mutações A5G e Y324I foram identificadas juntas nas amostras de CPV-2b.

A mutação S192F no gene *vp2* do FPV foi identificada em três gatos infectados. Estudos anteriores concluíram que mutações na posição 192 se encontram associadas a alterações na antigenicidade e na capacidade de ligação a receptores celulares, o que pode influenciar a patogenicidade e a transmissibilidade do vírus (Domingues *et al.*, 2023). É necessário a realização de mais estudos no futuro para avaliar o impacto funcional da mutação S192F na replicação viral, na resposta imunológica e na eficácia das vacinas existentes.

A mutação A14T foi detetada em dois gatos infectados pelo vírus da panleucopenia felina no presente estudo. Um estudo de Garcia *et al.*, (2023) revelou que a mutação tem impacto na antigenicidade e patogenicidade do vírus. A presença desta mutação reforça a relevância de investigação a nível genético de forma mais detalhada para compreender a evolução do FPV.

A mutação G34S foi identificada num cão infectado com CPV-2c. A presença desta mutação não silenciosa não está descrita na literatura. Mais investigação deverá ser feita para confirmar a persistência desta mutação e avaliar a sua prevalência.

Por fim, a mutação Q370R que foi detetada no CPV-2c, tanto nos cães como no gato infectado, têm sido relatadas em diversos estudos. Esta mutação é considerada responsável pela especificidade de espécie (Lee *et al.*, 2019). Guo *et al.*, (2013), refere que esta alteração pode influenciar a antigenicidade do vírus, a sua capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros e, até mesmo, a sua resposta à imunidade conferida pelas vacinas.

Um estudo de Zhou *et al.* (2017), que analisou a evolução genética do gene *vp2* entre 1979 e 2016, sugere que esta mutação está relacionada com o processo contínuo de evolução viral. No entanto, mais estudos funcionais são necessários para avaliar o impacto desta mutação na patogenicidade e transmissibilidade do vírus.

O CPV-2 começou a ser classificado em diferentes tipos antigénicos desde que atingiu proporções pandémicas em 1980 (Parrish, 1990). Esta classificação é feita com base nas mutações nucleotídicas no gene *vp2* das estirpes emergentes. Este método continua a ser a ferramenta mais comum para a tipificação genética deste vírus (Santana *et al.*, 2022).

Mais recentemente, foram obtidos genomas completos (WGSs) de estirpes de CPV-2 e sequências completas do gene *vp2*, permitindo a proposta de novas classificações filogenéticas (Grecco *et al.*, 2018; Moon *et al.*, 2020; Nguyen Manh *et al.*, 2021).

A análise filogenética constitui um método fundamental para o estudo da evolução dos vírus. Diversos estudos têm sido realizados para elucidar a classificação do CPV-2 (Geng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016a; Wang *et al.*, 2016b). Neste estudo, verificou-se através da árvore filogenética que os *clusters* formados não evidenciaram monofilia para os vários subtipos (Figura 5). A classificação filogenética do CPV-2 tem sido tema de vasta discussão científica, devido à sua alta taxa de mutação e ampla disseminação global.

Os resultados deste estudo, são consistentes com os achados do estudo de Santana *et al.*, (2022), realizado no Brasil, onde foram analisados 284 genomas completos e 684 sequências completas do gene *vp2* de CPV-2. A análise filogenética realizada neste estudo revelou a existência de dois *clusters* principais disseminados mundialmente. Para além disso, a árvore filogenética do gene *vp2* identificou quatro *clusters* bem definidos. Esses *clusters* não correspondem diretamente às classificações anteriores em CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, embora alguns apresentem predominância de um ou mais tipos antigénicos. O mesmo ocorre no presente estudo, onde os *clusters* não evidenciariam monofilia para os subtipos de CPV, ou seja, a formação dos *clusters* não reuniu as sequências das amostras às respectivas sequências de referência dos subtipos virais.

Por outro lado, um estudo realizado por Qui *et al.* (2020) avaliou 204 amostras de CPV provenientes da China, utilizando apenas o gene *vp2* para a análise filogenética, e constatou que todas se agruparam conforme os respetivos subtipos antigénicos.

Estudos recentes propuseram diferentes abordagens de classificação, frequentemente baseadas em critérios regionais, temporais ou mutações específicas no gene *vp2*. No entanto, a falta de consenso entre essas classificações tem dificultado a padronização das nomenclaturas (Li *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017).

Grecco *et al.* (2018) identificaram duas linhagens principais de CPV-2a e CPV-2c na América do Sul, particularmente no Uruguai, associando estas linhagens a eventos de introdução e disseminação regional. Esta abordagem limita-se ao contexto sul-americano, dificultando sua aplicação numa escala global.

De forma semelhante, Moon *et al.* (2020) analisaram subtipos de CPV-2 na Coreia e propuseram uma classificação baseada em substituições de aminoácidos específicas no gene

vp2, associadas à adaptação local. No entanto, essa nomenclatura é restrita ao contexto asiático, limitando sua utilidade para compreender a diversidade genética global do vírus.

Por outro lado, Nguyen Manh *et al.* (2021), ao estudarem subtipos do CPV-2 no Vietname, propuseram uma classificação que relaciona linhagens com fatores temporais e geográficos, destacando a evolução dos subtipos CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c e o seu impacto na disseminação local. Apesar de ser uma abordagem valiosa, a nomenclatura utilizada também apresenta inconsistências quando aplicada a contextos globais.

Em contraste, o estudo de Santana *et al.* (2022) representa um avanço significativo ao propor uma abordagem filogenética mais abrangente e global. Analisando genomas completos e sequências do gene *vp2*, estes autores identificaram quatro *clusters* principais que não correspondem estritamente às classificações convencionais. Este estudo introduziu uma nomenclatura baseada em *clusters* [O (original), I e II (dois clusters principais atualmente disseminados pelo mundo)], evitando o uso de nomes regionais ou antigênicos, como os sugeridos em estudos anteriores (Grecco *et al.*, 2018; Moon *et al.*, 2020; Nguyen Manh *et al.*, 2021), o que facilita a padronização e a interpretação global. Todos os clusters contêm amostras de diferentes continentes e não estão restritos a regiões geográficas específicas (Santana *et al.*, 2022). A árvore do presente estudo revela-se similar com a árvore do estudo destes autores.

A abordagem de Santana *et al.* (2022) destaca a importância de um sistema de classificação uniforme que permita integrar dados regionais e globais. Esta padronização é essencial para compreender melhor as rotas de disseminação do CPV-2, as falhas vacinais e outros aspetos epidemiológicos que são cruciais para o controlo desta importante doença infecciosa.

Melhorar a classificação e identificação do CPV-2 contribuirá para aumentar a compreensão das vias de disseminação do vírus em diferentes regiões geográficas, das falhas vacinais, bem como de outros aspetos epidemiológicos relacionados com a gestão e controlo desta doença (Santana *et al.*, 2022). É necessário utilizar metodologias de reconstrução filogenética com base em algoritmos matemáticos complexos que tenham em conta várias variáveis e os estudos mais atuais, de modo a obter uma ferramenta consensual.

A estrutura da árvore filogenética sugere a presença de intragrupos, evidenciando a diversidade genética dentro dos subtipos do CPV-2 e FPV (Figura 5). Além disso, os valores elevados de *bootstrap* reforçam a confiança na robustez destes agrupamentos. Com base nesta informação a autora deste estudo, decidiu realizar uma análise de haplótipos para o CPV- 2 e outra para o FPV, por ser uma ferramenta essencial para compreender a diversidade genética.

Na análise dos haplótipos do CPV-2 verificou-se uma separação dos haplótipos de CPV-2c dos cães e do gato (haplótipo 12) e do subtipo CPV-2b (Figura 6). A separação do haplótipo “12” demonstra que não ocorreram erros laboratoriais ou de contaminação cruzada, uma vez que o haplótipo CPV-2c do gato apresenta divergências na sequência nucleotídica de todas as sequências remanescentes amplificadas do CPV.

Esta elevada diversidade nucleotídica está de acordo com a literatura, uma vez que o CPV-2 apresenta uma alta taxa de mutação, associada a uma rápida disseminação global e à emergência de subtipos com diferentes propriedades antigénicas (Hoelzer *et al.*,2008).

A análise dos haplótipos de FPV evidencia diversidade genética dentro do vírus, revelando a presença de um haplótipo dominante, a partir do qual surgem várias ramificações (Figura 7). No entanto, a existência de ramificações mais longas, como as que levam aos haplótipos “1” e “14”, indica a capacidade do vírus de acumular mutações, possivelmente em resposta a pressões evolutivas. Essas pressões podem incluir resistência imunológica desenvolvida pelos gatos, devido a infeções anteriores ou vacinação. As conexões entre os diferentes haplótipos, representada pelas linhas e traços indicam mutações, apontam para a evolução contínua do FPV, sendo que alguns haplótipos mais periféricos podem corresponder a subtipos menos frequentes ou recentemente emergentes. A diversidade genética pode estar associada aos fatores predisponentes, à gravidade da doença e à taxa de sobrevivência.

Uma limitação do estudo, é a ausência de informação sobre o *outcome* dos animais hospitalizados o que poderia ser uma variável interessante na comparação dos vírus e da sua virulência, assim como na correlação com outros fatores extrínsecos.

No estudo de Miranda *et al.* (2015), foi analisada a diversidade genética do FPV em gatos domésticos em Portugal durante dois períodos: 2006–2008 e 2012–2014. Os autores concluíram que a diversidade global das amostras foi relativamente baixa. Estudos anteriores,

havia demonstrado um alto grau de conservação de nucleótidos no gene *vp2* de FPV (Addie, 2006), o que não está de acordo com este estudo.

No estudo foi observada uma elevada diversidade genética do vírus FPV entre as várias amostras. Como mencionado anteriormente, existem estudos recentes que descrevem a detecção do vírus FPV em cães, sugerindo uma possível adaptação do vírus a hospedeiros caninos ou eventos ocasionais de infecção cruzada (Ahmed *et al.*, 2018; Charoenkul *et al.*, 2019). O FPV é um vírus altamente contagioso entre gatos e apresenta uma mortalidade elevada nesta espécie (Greene & Decaro, 2023), este vírus está a evoluir e a sofrer pressão seletiva; desta forma, são necessários mais estudos de caracterização molecular para compreender a sua epidemiologia.

De modo a compreender a relação entre os subtipos virais presentes em diferentes amostras biológicas, foi realizada uma análise de haplótipos. O objetivo deste estudo foi avaliar a correspondência genética entre o vírus presente no sangue e nas fezes dos animais.

A análise dos haplótipos obtidos a partir das fezes e do sangue dos mesmos hospedeiros confirmou que, nos animais analisados, o gene *vp2* do vírus não sofreu mutações significativas ao transitar entre diferentes sistemas ou tecidos do organismo (Figura 8). Essa estabilidade genética facilita o diagnóstico, pois amostras de fezes podem ser utilizadas de forma confiável para representar o vírus presente no organismo como um todo. Estes achados corroboram estudos anteriores que indicam uma elevada estabilidade genética do CPV-2 dentro do mesmo hospedeiro (Hao *et al.*, 2022; Mira *et al.*, 2019). A ausência de variações significativas sugere que as mutações observadas em estudos populacionais são mais frequentemente associadas a pressões seletivas externas, como a transmissão entre hospedeiros e a adaptação a diferentes contextos ambientais (Giraldo-Ramirez *et al.*, 2020).

O presente estudo contribuiu para o debate sobre a classificação dos subtipos virais do CPV-2, alertando para a necessidade de uma nova classificação e para a importância da vigilância epidemiológica não só do CPV-2, mas também do FPV.

V. Conclusão

Com o presente trabalho pretendeu-se realizar uma caracterização molecular da infecção por CPV-2 e por FPV em cães e gatos da AML e avaliar vários métodos de diagnóstico.

Os objetivos estabelecidos para esta dissertação foram alcançados, uma vez que foi possível identificar a presença de CPV-2 e de FPV. Entre os 27 animais em estudo, o FPV foi detetado em 48,1%, o subtipo CPV-2c em 40,7% e o subtipo CPV-2b em 11,1%. Ainda, foi identificado um gato infectado com CPV-2c.

Os resultados obtidos permitem concluir ser de extrema importância a identificação e monitorização dos subtipos de CPV-2 e do FPV em circulação nos cães e nos gatos para a compreensão da evolução do vírus, da sua epidemiologia e do seu impacto na saúde dos hospedeiros. Estes destacam a necessidade urgente de melhorar as medidas de prevenção, como vacinar segundo as *guidelines* mais recentes, educar os tutores sobre a importância da vacinação e implementar medidas de biossegurança mais rigorosas, nomeadamente a separação de cães e gatos em regime de internamento infectocontagioso.

Relativamente aos resultados filogenéticos, a ausência de monofilia na árvore filogenética evidencia a necessidade de vigilância contínua e estes achados apoiam a necessidade de análises moleculares regulares e de uma revisão da classificação baseada na sequência completa do subtipo viral e não restringindo o estudo apenas ao gene *vp2*.

Como perspectivas futuras, seria relevante analisar uma população maior de cães e gatos, com o intuito de melhor compreender a distribuição dos subtipos de CPV-2 e do FPV. A sequenciação completa do genoma das amostras será fundamental para melhorar classificação do vírus. Além disso, a aplicação de técnicas de filogeografia, em concordância com as pesquisas globais atuais, poderia fornecer informações mais detalhadas sobre a disseminação e evolução destes vírus.

VI - Referências bibliográficas

1. Acciaccia, R. A., Sullivan, L. A., Webb, T. L., Johnson, V., & Dow, S. W. (2020). Clinical evaluation of hyperimmune plasma for treatment of dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)*, 30(5), 525–533. <https://doi.org/10.1111/vec.12987>
2. Addie, D. D. (2006). Feline Parvovirus Infections. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3^a ed., pp. 78–88). St. Louis, MO: Elsevier Inc.
3. Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M. G., Strassheim, M. L., & Parrish, C. R. (1993). Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins*, 16(2), 155–171. <https://doi.org/10.1002/prot.340160204>
4. Ahmed, N., Riaz, A., Zubair, Z., Saqib, M., Ijaz, S., Nawaz-Ul-Rehman, M. S., Al-Qahtani, A., & Mubin, M. (2018). Molecular analysis of partial VP-2 gene amplified from rectal swab samples of diarrheic dogs in Pakistan confirms the circulation of canine parvovirus genetic variant CPV-2a and detects sequences of feline panleukopenia virus (FPV). *Virology journal*, 15(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0958-y>
5. Allison, A. B., Harbison, C. E., Pagan, I., Stucker, K. M., Kaelber, J. T., Brown, J. D., Ruder, M. G., Keel, M. K., Dubovi, E. J., Holmes, E. C., & Parrish, C. R. (2012). Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. *Journal of virology*, 86(2), 865–872. <https://doi.org/10.1128/JVI.06187-11>
6. Allison, A. B., Kohler, D. J., Fox, K. A., Brown, J. D., Gerhold, R. W., Shearn-Bochsler, V. I., Dubovi, E. J., Parrish, C. R., & Holmes, E. C. (2013). Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. *Journal of virology*, 87(4), 2342–2347. <https://doi.org/10.1128/JVI.02428-12>
7. Alexis, V. A., Sonia, V., Daniela, S., Miguel, G., Timothy, H., Valentina, F., Lisette, L., & Leonardo, S. (2021). Molecular Analysis of Full-Length VP2 of Canine Parvovirus Reveals Antigenic Drift in CPV-2b and CPV-2c Variants in Central Chile. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(8), 2387. <https://doi.org/10.3390/ani11082387>
8. Appel, M.J., Cooper, B.J., Greisen, H., & Carmichael, L.E. (1978). blacks. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173, 1516.
9. Arora, R., Malla, W. A., Tyagi, A., Mahajan, S., Sajjanar, B., & Tiwari, A. K. (2021). Canine Parvovirus and Its Non-Structural Gene 1 as Oncolytic Agents: Mechanism of Action and Induction of Anti-Tumor Immune Response. *Frontiers in oncology*, 11, 648873. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.648873>
10. Battilani, M., Scagliarini, A., Ciulli, S., Morganti, L., & Prosperi, S. (2006). High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology*, 352(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.002>

11. Battilani, M., Gallina, L., Vaccari, F., & Morganti, L. (2007). Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Veterinary research communications*, 31 Suppl 1, 209–212. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0007-6>
12. Battilani, M., Balboni, A., Ustulin, M., Giunti, M., Scagliarini, A., & Prosperi, S. (2011). Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Veterinary research*, 42(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-43>
13. Battilani, M., Balboni, A., Giunti, M., & Prosperi, S. (2013). Co-infection with feline and canine parvovirus in a cat. *Veterinaria italiana*, 49(1), 127–129.
14. Barrs V. R. (2019). Feline Panleukopenia: A Re-emergent Disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 49(4), 651–670. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.006>
15. Bird, L., & Tappin, S. (2013). Canine parvovirus: where are we in the 21st Century?. *UK Vet Companion Animal*, 18(4), 142-146.
16. Böhm, M., Thompson, H., Weir, A., Hasted, A. M., Maxwell, N. S., & Herrtage, M. E. (2004). Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *The Veterinary record*, 154(15), 457–463. <https://doi.org/10.1136/vr.154.15.457>
17. Brunner, C. J., & Swango, L. J. (1985). Canine parvovirus infection: Effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 7(12), 979–988
18. Bui, T. T. N., Hoang, M., Nguyen, V. D., Nam Nguyen, M., & Than, V. T. (2023). Molecular characterisation of the current high prevalence of the new CPV-2c variants in the Southern Vietnamese dogs signifies a widespread in the worldwide dog population. *Veterinary medicine and science*, 9(4), 1553–1563. <https://doi.org/10.1002/vms3.1163>
19. Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., & Carmichael, L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *The Journal of general virology*, 82(Pt 12), 3021–3025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>
20. Carmichael L. E. (2005). An annotated historical account of canine parvovirus. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 52(7-8), 303–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00868.x>
21. Cavalli, A., Marinaro, M., Desario, C., Corrente, M., Camero, M., & Buonavoglia, C. (2018). Atividade virucida in vitro do hipoclorito de sódio contra o parvovírus canino tipo 2. *Epidemiology & Infection*, 146(15), 2010-2013.
22. Chang, S. F., Sgro, J. Y., & Parrish, C. R. (1992). Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and

- hemagglutination properties. *Journal of virology*, 66(12), 6858–6867. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.12.6858-6867.1992>
23. Charoenkul, K., Tangwangvivat, R., Janetanakit, T., Boonyapisitsopa, S., Bunpapong, N., Chaiyawong, S., & Amonsin, A. (2019). Emergence of canine parvovirus type 2c in domestic dogs and cats from Thailand. *Transboundary and emerging diseases*, 66(4), 1518–1528. <https://doi.org/10.1111/tbed.13177>
 24. Chen, B., Zhang, X., Zhu, J., Liao, L., & Bao, E. (2021). Molecular Epidemiological Survey of Canine Parvovirus Circulating in China from 2014 to 2019. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(5), 588. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050588>
 25. Cho, H. S., Kang, J. I., & Park, N. Y. (2006). Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 18(1), 81–84. <https://doi.org/10.1177/104063870601800111>
 26. Clegg, S. R., Coyne, K. P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R. M., & Radford, A. D. (2012). Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Veterinary microbiology*, 157(1-2), 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.024>
 27. Crawford, P. C., & Sellon, R. K. (2010). Canine viral diseases. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine* (7th ed., Vol. 1, pp. 646–652). Elsevier Saunders.
 28. Crawford, P. C., Hanel, R. M., & Levy, J. K. (2003). Evaluation of treatment of colostrum-deprived kittens with equine IgG. *American journal of veterinary research*, 64(8), 969–975. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.969>
 29. Cotmore, S. F., & Tattersall, P. (2013). Parvovirus diversity and DNA damage responses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a012989. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012989>
 30. Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., & Davison, A. J. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of virology*, 159(5), 1239–1247. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>
 31. Cotmore, S. F., & Tattersall, P. (2014). Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annual review of virology*, 1(1), 517–537. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085444>
 32. Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., & Squires, R. A. (2016). WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.*, 57(E1), E1–E45. <https://doi.org/10.1111/jsap.212431>

33. Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., & Squires, R. A. (2017). *WSAVA Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats*. *Journal of Small Animal Practice*, 58(1), 1–45. doi:10.1111/jsap.2_12575
34. De la Torre, D., Mafla, E., Puga, B., Erazo, L., Astolfi-Ferreira, C., & Ferreira, A. P. (2018). Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador. *Veterinary world*, 11(4), 480–487. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.480-487>
35. Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., & Buonavoglia, C. (2005a). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 17(2), 133–138. <https://doi.org/10.1177/104063870501700206>
36. Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L. D., Tarsitano, E., Tempesta, M., & Buonavoglia, C. (2005b). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary microbiology*, 105(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.018>
37. Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M. S., Narcisi, D., Scalia, P., & Buonavoglia, C. (2006). Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *Journal of virological methods*, 133(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.026>
38. Decaro, N., Desario, C., Addie, D. D., Martella, V., Vieira, M. J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., & Buonavoglia, C. (2007). The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging infectious diseases*, 13(8), 1222–1224. <https://doi.org/10.3201/eid1308.070505>
39. Decaro, N., Desario, C., Miccolupo, A., Campolo, M., Parisi, A., Martella, V., Amorisco, F., Lucente, M. S., Lavazza, A., & Buonavoglia, C. (2008). Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *The Journal of general virology*, 89(Pt 9), 2290–2298. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001503-0>
40. Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaïanni, M. L., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2009). Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *The Veterinary record*, 164(19), 593–595. <https://doi.org/10.1136/vr.164.19.593>
41. Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Mari, V., Elia, G., Cavalli, A., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2011). Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 187(2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.027>

42. Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary microbiology*, 155(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>
43. Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2017). Canine parvovirus post-vaccination shedding: Interference with diagnostic assays and correlation with host immune status. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 221, 23–24. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.020>
44. Decaro, N., Buonavoglia, C., & Barrs, V. R. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication?. *Veterinary microbiology*, 247, 108760. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760>
45. Demeter, Z., Palade, E. A., Soós, T., Farsang, A., Jakab, C., & Rusvai, M. (2010). Misleading results of the MboII-based identification of type 2a canine parvovirus strains from Hungary reacting as type 2c strains. *Virus genes*, 41(1), 37–42. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0478-3>
46. Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., & Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus?. *Journal of virological methods*, 126(1-2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006>
47. Diakoudi, G., Desario, C., Lanave, G., Salucci, S., Ndiana, L. A., Zarea, A. A. K., Fouad, E. A., Lorusso, A., Alfano, F., Cavalli, A., Buonavoglia, C., Martella, V., & Decaro, N. (2022). Feline Panleukopenia Virus in Dogs from Italy and Egypt. *Emerging infectious diseases*, 28(9), 1933–1935. <https://doi.org/10.3201/eid2809.220388>
48. Domingues, C. F., de Castro, T. X., do Lago, B. V., & Garcia, R. C. N. C. (2024). Genetic characterization of the parvovirus full-length VP2 gene in domestic cats in Brazil. *Research in veterinary science*, 170, 105186. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105186>
49. Esfandiari, J., & Klingeborn, B. (2000). A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 47(2), 145–153. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00328.x>
50. Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
51. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution; international journal of organic evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
52. Felsenstein, J. (2004). Inferring phylogenies Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.

53. Fenner, F., MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2017). Fenner's Veterinary Virology (5th ed.). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
54. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., & Skalka, A. M. (2020). Principles of Virology, 5th Edition. ASM Press.
55. Ford, R. B., Larson, L. J., McClure, K. D., Schultz, R. D., & Welborn, L. V. (2017). 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 53(5), 243–251. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6741>
56. Gamoh, K., Shimazaki, Y., Makie, H., Senda, M., Itoh, O., & Inoue, Y. (2003). The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. *The Journal of veterinary medical science*, 65(9), 1027–1029. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.1027>
57. Garcia, E., Wright, D., Gatins, R., Roberts, M. B., Pinheiro, H. T., Salas, E., Chen, J. Y., Winnikoff, J. R., & Bernardi, G. (2021). Haplotype network branch diversity, a new metric combining genetic and topological diversity to compare the complexity of haplotype networks. *PloS one*, 16(6), e0251878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251878>
58. Geng, Y., Guo, D., Li, C., Wang, E., Wei, S., Wang, Z., Yao, S., Zhao, X., Su, M., Wang, X., Wang, J., Wu, R., Feng, L., & Sun, D. (2015). Co-Circulation of the Rare CPV-2c with Unique Gln370Arg Substitution, New CPV-2b with Unique Thr440Ala Substitution, and New CPV-2a with High Prevalence and Variation in Heilongjiang Province, Northeast China. *PloS one*, 10(9), e0137288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137288>
59. Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., & Ruiz-Saenz, J. (2020). Phylogenetic, Evolutionary and Structural Analysis of Canine Parvovirus (CPV-2) Antigenic Variants Circulating in Colombia. *Viruses*, 12(5), 500. <https://doi.org/10.3390/v12050500>
60. Goto, H., Yachida, S., Shirahata, T., & Shimizu, K. (1974). Feline panleukopenia in Japan. I. Isolation and characterization of the virus. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, 36(3), 203–211. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.36.203>
61. Goddard, A., & Leisewitz, A. L. (2010). Canine parvovirus. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 40(6), 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>
62. Goodman, L. B., Lyi, S. M., Johnson, N. C., Cifuentes, J. O., Hafenstein, S. L., & Parrish, C. R. (2010). Binding site on the transferrin receptor for the parvovirus capsid and effects of altered affinity on cell uptake and infection. *Journal of virology*, 84(10), 4969–4978. <https://doi.org/10.1128/JVI.02623-09>
63. Grecco, S., Iraola, G., Decaro, N., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F., & Panzera, Y. (2018). Phylogenetic analysis of canine parvovirus sequences from Uruguay reveals the presence of two main lineages of CPV-2a and CPV-2c in South America. *Infect. Genet. Evol.*, 61, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.005>

64. Greene, C. E., & Decaro, N. (2012). Canine enteric viral infections. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 63–73). St. Louis, MO: Elsevier Saunders.
65. Guo, L., Yang, S. L., Chen, S. J., Zhang, Z., Wang, C., Hou, R., ... & Yan, Q. G. (2013). Identification of canine parvovirus with the Q370R point mutation in the VP2 gene from a giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Virology Journal*, 10, 1-7.
66. Hall, E.J. & German, A.J. (2005). Diseases of the Small Intestine. In: S.J.Ettinger & E.C.Feldman (Eds), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th ed.). (pp.1333-1378). Philadelphia, U.S.A.: W.B. Saunders Company.
67. Hao, X., Li, Y., Xiao, X., Chen, B., Zhou, P., & Li, S. (2022). The Changes in Canine Parvovirus Variants over the Years. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11540. <https://doi.org/10.3390/ijms231911540>
68. Hirasawa, T., Kaneshige, T., & Mikazuki, K. (1994). Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology*, 41(1-2), 135–145. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90143-0)
69. Hoang, M., Wu, C. N., Lin, C. F., Nguyen, H. T. T., Le, V. P., Chiou, M. T., & Lin, C. N. (2020). Genetic characterization of feline panleukopenia virus from dogs in Vietnam reveals a unique Thr101 mutation in VP2. *PeerJ*, 8, e9752. <https://doi.org/10.7717/peerj.9752>
70. Hueffer, K., & Parrish, C. R. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current opinion in microbiology*, 6(4), 392–398. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00083-3)
71. Hueffer, K., Parker, J. S., Weichert, W. S., Geisel, R. E., Sgro, J. Y., & Parrish, C. R. (2003). The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *Journal of virology*, 77(3), 1718–1726. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1718-1726.2003>
72. Hoelzer, K., Shackelton, L. A., Parrish, C. R., & Holmes, E. C. (2008). Host adaptation and virulence in canine and feline parvoviruses. *Virology*, 377(2), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.043>
73. Hoelzer, K., & Parrish, C. R. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Veterinary research*, 41(6), 39. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010011>
74. Houston, D. M., Ribble, C. S., & Head, L. L. (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(4), 542–546.
75. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2022). Relatório do ICTV: Gênero Protoparvovirus..Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/parvoviridae/parvoviridae/protoparvovirus>
76. Idexx Laboratories, Inc. (n.d.). *SNAP Parvo package insert*. <https://www.idexx.com/files/snap-parvo-pkg-insert-en.pdf>

77. Ikeda, Y., Mochizuki, M., Naito, R., Nakamura, K., Miyazawa, T., Mikami, T., & Takahashi, E. (2000). Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology*, 278(1), 13–19. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0653>
78. Kaelber, J. T., Demogines, A., Harbison, C. E., Allison, A. B., Goodman, L. B., Ortega, A. N., Sawyer, S. L., & Parrish, C. R. (2012). Evolutionary reconstructions of the transferrin receptor of Caniforms supports canine parvovirus being a re-emerged and not a novel pathogen in dogs. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002666. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002666>
79. Kilian, E., Suchodolski, J. S., Hartmann, K., Mueller, R. S., Wess, G., & Unterer, S. (2018). Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. *PloS one*, 13(3), e0192198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192198>
80. Kim, Y. J., Kim, Y. S., & Kim, K. S. (2020). Development of a rapid point-of-care diagnostic test for canine parvovirus. *J. Vet. Sci.*, 21(6), e73. <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e73>
81. Kumar, M., & Nandi, S. (2010). Molecular typing of canine parvovirus variants by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Transboundary and emerging diseases*, 57(6), 458–463. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01167.x>
82. Kruse, B. D., Unterer, S., Horlacher, K., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2010). Canine parvovirus infection: A clinical update. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 40(6), 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>
83. Langeveld, J. P., Casal, J. I., Vela, C., Dalsgaard, K., Smale, S. H., Puijk, W. C., & Meloen, R. H. (1993). B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface. *Journal of virology*, 67(2), 765–772. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.2.765-772.1993>
84. Lee, H., Callaway, H. M., Cifuentes, J. O., Bator, C. M., Parrish, C. R., & Hafenstein, S. L. (2019). Transferrin receptor binds virus capsid with dynamic motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(41), 20462–20471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904918116>
85. Li, G., Ji, S., Zhai, X., Zhang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhou, J., & Su, S. (2017). Evolutionary and genetic analysis of the VP2 gene of canine parvovirus. *BMC genomics*, 18(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3935-8>
86. Li, S., Chen, X., Hao, Y., Zhang, G., Lyu, Y., Wang, J., Liu, W., & Qin, T. (2022). Characterization of the VP2 and NS1 genes from canine parvovirus type 2 (CPV-2) and feline panleukopenia virus (FPV) in Northern China. *Frontiers in veterinary science*, 9, 934849. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.934849>

87. Litster, A., & Benjanirut, C. (2014). Case series of feline panleukopenia virus in an animal shelter. *Journal of feline medicine and surgery*, 16(4), 346–353. <https://doi.org/10.1177/1098612X13497738>
88. Liu, H., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., Li, G., Peng, Y., Yi, X., & Jiang, D. (2011). Widespread endogenization of densoviruses and parvoviruses in animal and human genomes. *Journal of virology*, 85(19), 9863–9876. <https://doi.org/10.1128/JVI.00828-11>
89. Markovich, J. E., Stucker, K. M., Carr, A. H., Harbison, C. E., Scarlett, J. M., & Parrish, C. R. (2012). Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(1), 66–72. <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.66>
90. Maya, L., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Iraola, G., Panzera, Y., Sosa, K., & Pérez, R. (2013). Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Archives of virology*, 158(6), 1133–1141. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1591-5>
91. Marenzoni, M. L., Momesso, M., Marchesi, M. C., Manuali, E., Pavone, S., Sgariglia, E., Tordo, E., Vescera, F., De Nicola, G., Stefanetti, V., & Brachelente, C. (2020). When the diagnosis of parvovirus in dogs and cats becomes challenging. *Veterinaria italiana*, 56(67-76), 10.12834/VetIt.1415.7682.1. <https://doi.org/10.12834/VetIt.1415.7682.1>
92. Mazzaferro E. M. (2020). Update on Canine Parvoviral Enteritis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 50(6), 1307–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>
93. Meason-Smith, C., Diesel, A., & Suchodolski, J. S. (2016). Bacteriome and mycobiome of the healthy canine conjunctiva and effect of topical administration of artificial tears. *PLOS ONE*, 11(8), e0158936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158936>
94. Meunier, P. C., Cooper, B. J., Appel, M. J., & Slauson, D. O. (1984). Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups. *Veterinary pathology*, 21(5), 509–515. <https://doi.org/10.1177/030098588402100510>
95. Miao, B., Chen, S., Zhang, X., Ma, P., Ma, M., Chen, C., Zhang, X., Chang, L., Du, Q., Huang, Y., & Tong, D. (2022). T598 and T601 phosphorylation sites of canine parvovirus NS1 are crucial for viral replication and pathogenicity. *Veterinary microbiology*, 264, 109301. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109301>
96. Miller L, Janeczko S, Hurley K,(2021) editors. Infectious disease management in animal shelters. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2021. p. 321–367.
97. Mira, F., Dowgier, G., Purpari, G., Vicari, D., Di Bella, S., Macaluso, G., Gucciardi, F., Randazzo, V., Decaro, N., & Guercio, A. (2018). Molecular typing of a novel canine parvovirus type 2a mutant circulating in Italy. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular*

- epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 61, 67–73.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.010>
98. Mira, F., Purpari, G., Lorusso, E., Di Bella, S., Gucciardi, F., Desario, C., & Decaro, N. (2019). Molecular typing of a variant of canine parvovirus circulating in Italy. *Veterinary Microbiology*, 234, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.003>
 99. Miranda, C., Parrish, C. R., & Thompson, G. (2014). Canine parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 26(3), 462–464.
<https://doi.org/10.1177/1040638714528502>
 100. Miranda, C. I. S. (2016a). *Canine parvovirus: The characterization of field infections in Portugal* [Tese de Doutoramento, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto]. Repositório da Universidade do Porto.
 101. Miranda, C., Parrish, C. R., & Thompson, G. (2016b). Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. *Veterinary microbiology*, 183, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.037>
 102. Miranda, C., & Thompson, G. (2016c). Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *The Journal of general virology*, 97(9), 2043–2057.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
 103. Miranda, C., Vieira, M. J., Silva, E., Carvalheira, J., Parrish, C. R., & Thompson, G. (2017). Genetic Analysis of Feline Panleukopenia Virus Full-length VP2 Gene in Domestic Cats Between 2006–2008 and 2012–2014, Portugal. *Transboundary and emerging diseases*, 64(4), 1178–1183. <https://doi.org/10.1111/tbed.12483>
 104. Moon B-Y, Jang J, Kim S-H, et al. (2020) Genetic characterization of canine parvovirus type 2c from domestic dogs in Korea. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67:1645–1653.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13501>
 105. Mochizuki, M., San Gabriel, M. C., Nakatani, H., Yoshida, M., & Harasawa, R. (1993). Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Research in veterinary science*, 55(1), 60–63. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90035-e](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90035-e)
 106. Moschidou, P., Martella, V., Lorusso, E., Desario, C., Pinto, P., Losurdo, M., Catella, C., Parisi, A., Bányai, K., & Buonavoglia, C. (2011). Mixed infection by Feline astrovirus and Feline panleukopenia virus in a domestic cat with gastroenteritis and panleukopenia. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 23(3), 581–584.
<https://doi.org/10.1177/1040638711404149>

107. Mukhopadhyay, H. K., Amsaveni, S., Matta, S. L., Antony, P. X., Thanislass, J., & Pillai, R. M. (2012). Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus DNA directly in faecal specimens. *Letters in applied microbiology*, 55(3), 202–209. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03284.x>
108. Mylonakis, M. E., Kalli, I., & Rallis, T. S. (2016). Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, 7, 91–100. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S80971>
109. Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195135855.001.0001>
110. Nguyen Manh, T., Piewbang, C., Rungsipipat, A., & Techangamsuwan, S. (2021). Molecular and phylogenetic analysis of Vietnamese canine parvovirus 2C originated from dogs reveals a new Asia-IV clade. *Transboundary and emerging diseases*, 68(3), 1445–1453. <https://doi.org/10.1111/tbed.13811>
111. Ohshima, T., Hisaka, M., Kawakami, K., Kishi, M., Tohya, Y., & Mochizuki, M. (2008). Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, 70(8), 769–775. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.769>
112. Ohshima, T., & Mochizuki, M. (2009). Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2. *The Journal of veterinary medical science*, 71(4), 403–408. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.403>
113. Organtini, L. J., Allison, A. B., Lukk, T., Parrish, C. R., & Hafenstein, S. (2015). Global displacement of canine parvovirus by a host-adapted variant: structural comparison between pandemic viruses with distinct host ranges. *Journal of virology*, 89(3), 1909–1912. <https://doi.org/10.1128/JVI.02611-14>
114. Parrish, C. R., Have, P., Foreyt, W. J., Evermann, J. F., Senda, M., & Carmichael, L. E. (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *The Journal of general virology*, 69 (Pt 5), 1111–1116. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-5-1111>
115. Parrish C. R. (1990). Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Advances in virus research*, 38, 403–450. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60867-2](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60867-2)
116. Parrish C. R. (1991a). Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology*, 183(1), 195–205. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90132-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90132-u)
117. Parrish, C. R., Aquadro, C. F., Strassheim, M. L., Evermann, J. F., Sgro, J. Y., & Mohammed, H. O. (1991b). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of

- canine parvovirus. *Journal of virology*, 65(12), 6544–6552. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6544-6552.1991>
118. Parrish C. R. (1995). Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Bailliere's clinical haematology*, 8(1), 57–71. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(05\)80232-x](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(05)80232-x)
 119. Parrish C. R. (1999). Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary microbiology*, 69(1-2), 29–40. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00084-x)
 120. Pinto, L. D., Streck, A. F., Gonçalves, K. R., Souza, C. K., Corbellini, Â. O., Corbellini, L. G., & Canal, C. W. (2012). Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus research*, 165(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.001>
 121. Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 14(3), 167–176. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2004.04004>
 122. Pollock R. V. (1982). Experimental canine parvovirus infection in dogs. *The Cornell veterinarian*, 72(2), 103–119.
 123. Pollock, R. V. H. (1984). The parvoviruses. II. Canine parvovirus.
 124. Pu, J., Zhang, Y., Zhong, D., & Chen, Q. (2024). Detection and genetic characterization of circulating canine parvovirus from stray dogs in Shanghai, China. *Virology*, 595, 110041. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110041>
 125. Qi, S., Zhao, J., Guo, D., & Sun, D. (2020). A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China. *Frontiers in veterinary science*, 7, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00005>
 126. Ramilo, D. W. R. (2008). *Subtipificação do parvovírus canino e felino* [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa]. Repositório da Universidade de Lisboa. [cite turn0search1](https://repositorio.biblioteca.utl.pt/handle/10400122/10400122)
 127. Reed, A. P., Jones, E. V., & Miller, T. J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of virology*, 62(1), 266–276. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.1.266-276.1988>
 128. Rewarts, J. M., & Cohn, L. A. (2000). CVT update: diagnosis and treatment of parvovirus.
 129. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
 130. Santana, W. O., Silveira, V. P., Wolf, J. M., Kipper, D., Echeverrigaray, S., Canal, C. W., Truyen, U., Lunge, V. R., & Streck, A. F. (2022). Molecular phylogenetic assessment of

- the canine parvovirus 2 worldwide and analysis of the genetic diversity and temporal spreading in Brazil. *Vet. Microbiol.*, 263, 109281. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109281>
131. Sarabandi, S., & Pourtaghi, H. (2023). Whole genome sequence analysis of CPV-2 isolates from 1998 to 2020. *Virology journal*, 20(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02102-2>
 132. Schultz R. D. (2006). Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Veterinary microbiology*, 117(1), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.013>
 133. Schoeman, J. P., Goddard, A., & Leisewitz, A. L. (2013). Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *New Zealand veterinary journal*, 61(4), 217–222. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.776451>
 134. Schönherr, S., Weissensteiner, H., Kronenberg, F., & Forer, L. (2023). Haplogrep 3 - an interactive haplogroup classification and analysis platform. *Nucleic acids research*, 51(W1), W263–W268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad284>
 135. Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., & Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 379–384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406765102>
 136. Sharp, N. J., Davis, B. J., Guy, J. S., Cullen, J. M., Steingold, S. F., & Kornegay, J. N. (1999). Hydranencephaly and cerebellar hypoplasia in two kittens attributed to intrauterine parvovirus infection. *Journal of comparative pathology*, 121(1), 39–53. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0298>
 137. Sime, T. A., Powell, L. L., Schildt, J. C., & Olson, E. J. (2015). Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)*, 25(6), 765–769. <https://doi.org/10.1111/vec.12347>
 138. Squires, R. A., Day, M. J., Horzinek, M. C., & Schultz, R. D. (2024). WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. World Small Animal Veterinary Association. Disponível em: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2024/04/WSAVA-Vaccination-guidelines-2024.pdf>
 139. Steinell, A., Munson, L., van Vuuren, M., & Truyen, U. (2000). Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *The Journal of general virology*, 81(Pt 2), 345–350. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-345>
 140. Sykes, J. E. (2013). *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Health Sciences. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66245-3>
 141. Sykes, J. E. (Ed.). (2023). *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat* (5th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.

142. Tang, Y., Tang, N., Zhu, J., Wang, M., Liu, Y., & Lyu, Y. (2022). Molecular characteristics and genetic evolutionary analyses of circulating parvoviruses derived from cats in Beijing. *BMC veterinary research*, 18(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03281-w>
143. Truyen, U., & Parrish, C. R. (1992). Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *Journal of virology*, 66(9), 5399–5408. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.9.5399-5408.1992>
144. Truyen, U., Agbandje, M., & Parrish, C. R. (1994). Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology*, 200(2), 494–503. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1212>
145. Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S. F., Obermaier, B., Veijalainen, P., & Parrish, C. R. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of virology*, 69(8), 4702–4710. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.8.4702-4710.1995>
146. Truyen, U., Evermann, J. F., Vieler, E., & Parrish, C. R. (1996). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*, 215(2), 186–189. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0021>
147. Truyen U. (2006). Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines?. *Veterinary microbiology*, 117(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.003>
148. Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., & Horzinek, M. C. (2009). Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 11(7), 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.002>
149. Truyen, U., & Parrish, C. R. (2013). Feline panleukopenia virus: its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Veterinary microbiology*, 165(1-2), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.005>
150. Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., & Compans, R. W. (1991). The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science (New York, N.Y.)*, 251(5000), 1456–1464. <https://doi.org/10.1126/science.2006420>
151. Url, A., Truyen, U., Rebel-Bauder, B., Weissenböck, H., & Schmidt, P. (2003). Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3801–3805. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3801-3805.2003>
152. Vieira, M. J., Silva, E., Oliveira, J., Luísa Vieira, A., Decaro, N., Desario, C., Muller, A., Carvalheira, J., Buonavoglia, C., & Thompson, G. (2008). Canine parvovirus 2c infection

- in central Portugal. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 20(4), 488–491. <https://doi.org/10.1177/104063870802000412>
153. Vieira, M. J. N. M. P. (2011). Parvovirose Canina (Tese de doutoramento). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. Disponível em <https://hdl.handle.net/10216/57386>
 154. Voorhees, I. E. H., Lee, H., Allison, A. B., Lopez-Astacio, R., Goodman, L. B., Oyesola, O. O., Omobowale, O., Fagbohun, O., Dubovi, E. J., Hafenstein, S. L., Holmes, E. C., & Parrish, C. R. (2019). Limited Intrahost Diversity and Background Evolution Accompany 40 Years of Canine Parvovirus Host Adaptation and Spread. *Journal of virology*, 94(1), e01162-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01162-19>
 155. Wang, H., Jin, H., Li, Q., Zhao, G., Cheng, N., Feng, N., Zheng, X., Wang, J., Zhao, Y., Li, L., Cao, Z., Yan, F., Wang, L., Wang, T., Gao, Y., Yang, S., & Xia, X. (2016a). Isolation and sequence analysis of the complete NS1 and VP2 genes of canine parvovirus from domestic dogs in 2013 and 2014 in China. *Archives of virology*, 161(2), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2620-y>
 156. Wang, J., Lin, P., Zhao, H., Cheng, Y., Jiang, Z., Zhu, H., Wu, H., & Cheng, S. (2016b). Continuing evolution of canine parvovirus in China: Isolation of novel variants with an Ala5Gly mutation in the VP2 protein. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 38, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.009>
 157. Welborn, L. V., DeVries, J. G., Ford, R., Franklin, R. T., Hurley, K. F., McClure, K. D., Paul, M. A., & Schultz, R. D. (2011). 2011 AAHA canine vaccination guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(5), 1–42. <https://doi.org/10.5326/jaaha-ms-4000>
 158. World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). (2020). Vaccination guidelines for owners and breeders. Recuperado de <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/04/WSAVA-Vaccination-Guidelines-for-Owners-and-Breeders-Portuguese.pdf>
 159. Zhao, H., Wang, J., Jiang, Y., Cheng, Y., Lin, P., Zhu, H., Han, G., Yi, L., Zhang, S., Guo, L., & Cheng, S. (2017). Typing of Canine Parvovirus Strains Circulating in North-East China. *Transboundary and emerging diseases*, 64(2), 495–503. <https://doi.org/10.1111/tbed.12390>
 160. Zhao, J., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, Q., Zhou, N., Du, T., Zhao, Q., Zhou, E.-M., Du, Y., & Sun, Y. (2022). Isolation and genetic characterization of parvoviruses from dogs, cats, minks, and raccoon dogs in the eastern region of Shandong Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 862352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.862352>

161. Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., & Li, S. (2017). The genetic evolution of canine parvovirus—A new perspective. PLoS One, 12(4), e0175035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175035>

Apêndices

Apêndice A

Questionário relativo ao estudo “Caracterização molecular da infeção por Parvovírus Canino e pelo Vírus da Panleucopenia Felina em cães e gatos da Área Metropolitana de Lisboa – Acrónimo: Parvoviridae”

O presente questionário foi desenvolvido no âmbito do projeto “Parvoviridae” e visa a recolha de informação sobre os dados epidemiológicos do animal doente. Todos os dados recolhidos serão confidenciais e usados apenas para investigação científica.

1. Identificação do animal: _____
2. Espécie
 - ☐ Gato
 - ☐ Cão
3. Sexo
 - ☐ Macho inteiro
 - ☐ Macho castrado
 - ☐ Fêmea inteira
 - ☐ Fêmea esterilizada
4. Raça _____
5. Idade (indicar semanas ou meses ou anos) _____
6. Vacinação:
 - ☐ Não vacinado
 - ☐ Vacinação incompleta
 - ☐ Vacinação completa
7. Estilo de vida:
 - ☐ *Indoor*
 - ☐ *Indoor / outdoor*
 - ☐ *Outdoor*
8. Temperatura retal (°C): _____
9. Sinais clínicos:
 - ☐ Diarreia não hemorrágica
 - ☐ Diarreia hemorrágica
 - ☐ Vómitos
 - ☐ Depressão
 - ☐ Perda de apetite

- ☐ Desidratação
- ☐ Alterações cardíacas
- ☐ Outros:

9.1 Se respondeu outros na pergunta anterior, quais? _____

10. Tutor: Freguesia, concelho e distrito: _____

Apêndice B

Tabela A1- Sequências de referência das estirpes utilizadas para caracterizar as amostras, com base nas estirpes de referência e os resíduos aminoacídicos. (Ver Anexo 2). O amarelo significa as alterações entre os resíduos aminoacídico dos diferentes tipos de vírus e subtipos virais.

	Resíduos aminoacídicos												
	80	87	93	103	232	292	300	323	375	426	555	564	568
FPV	K	M	K	V	V	S	A	D	D	N	V	N	A
CPV-2A	R	L	N	A	I	S	G	N	D	N	I	S	G
CPV-2B	R	L	N	A	I	A	G	N	D	D	V	S	G
CPV-2C	R	L	N	A	I	A	G	N	D	E	V	S	G

Tabela A2 - Sequências aminoacídicas obtidas nas amostras de fezes

Resíduos aminoacídicos																
Amostras	80	87	93	103	232	267	297	300	305	323	375	426	555	564	568	SUBTIPO VIRAL
FELINO_1	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_2	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
CANINO_3	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
CANINO_4	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	D	V	S	G	CPV - 2b
FELINO_5	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
FELINO_6	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_7	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
CANINO_9	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
CANINO_10	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
FELINO_11	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
FELINO_12	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
FELINO_14	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_15	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
FELINO_16	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV

FELINO_18	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_19	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
CANINO_21	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
FELINO_22	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
FELINO_23	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_24	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
FELINO_26	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_27	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	E	V	S	G	CPV - 2c
CANINO_28	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	D	V	S	G	CPV - 2b
FELINO_29	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
CANINO_30	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	D	V	S	G	CPV - 2b
FELINO_31	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV
FELINO_32	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	D	N	V	N	A	FPV

Tabela A3 - Sequências aminoácidas das amostras de sangue

Resíduos aminoácídicos															
Amostras	80	87	93	103	232	267	297	300	305	323	426	564	568	SUBTIPO VIRAL	
FELINO_1	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	N	N	A	FPV	
FELINO_5	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	N	N	A	FPV	
FELINO_16	K	M	K	V	V	F	S	A	D	D	N	N	A	FPV	
CANINO_21	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	E	S	G	CPV - 2c	
CANINO_19	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	E	S	G	CPV - 2c	
CANINO_28	R	L	N	A	I	Y	A	G	Y	N	D	S	G	CPV - 2b	

Apêndice C

Tabela A4 – Resultados obtidos no questionário realizado aos tutores. A ordem corresponde ao número da amostra (1 a 27).

Espécie	Sexo	Raça	Idade	Vacinação	Estilo de vida	Sinais clínicos
Gato	Macho fértil	Europeu Comum	0,4	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos, Perda de apetite
Cão	Macho fértil	indeterminada	0,4	Não vacinado	<i>Indoor/Outdoor</i>	Diarreia hemorrágica, Vômitos, Perda de apetite, Desidratação
Cão	Macho fértil	Yorkshire	0,2	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica
Cão	Fêmea fértil	Indeterminada	0,2	Não vacinado	<i>Indoor/Outdoor</i>	Diarreia não hemorrágica
Gato	Fêmea fértil	Indeterminada	0,2	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos
Gato	Macho fértil	Scotish Straight	0,2	Vacinação incompleta	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos, Perda de apetite
Cão	Fêmea fértil	Indeterminada	0,3	Não vacinado	<i>Outdoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos, Perda de apetite, Desidratação
Cão	Fêmea fértil	Indeterminada	3	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
Cão	Fêmea fértil	Indeterminada	3	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
Gato	Macho não fértil	Europeu Comum	3	Não vacinado	<i>Outdoor</i>	Perda de apetite, Desidratação
Gato	Fêmea fértil	Indeterminada	2	Vacinação incompleta	Sem informação	perda de apetite e vômitos
Gato	Fêmea não fértil	Indeterminada	0,7	Não vacinado	<i>Indoor/Outdoor</i>	Depressão, Perda de apetite
Cão	Macho fértil	Indeterminada	13	Não vacinado	<i>Indoor/Outdoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos, Perda de apetite, Desidratação
Gato	Fêmea fértil	Scotish	0,3	Vacinação incompleta	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos, Depressão
Gato	Fêmea não fértil	Indeterminada	0,7	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Depressão, Desidratação
Cão	Fêmea fértil	Indeterminado	0,6	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Depressão, Perda de apetite, Desidratação
Cão	Fêmea fértil	Indeterminado	0,3	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Vômitos, Depressão, Desidratação
Gato	Macho fértil	Indeterminado	0,2	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Vômitos, Depressão, Perda de apetite
Gato	Fêmea fértil	Indeterminado	0,6	Não vacinado	<i>Outdoor</i>	Vômitos
Cão	Fêmea fértil	Indeterminado	0,6	Não vacinado	<i>Indoor/Outdoor</i>	Diarreia hemorrágica, Vômitos, Depressão, Perda de apetite
Gato	Macho não fértil	Desconhecido	3	Desconhecido	Desconhecido	
Cão	Macho fértil	Dogue alemão	0,4	Vacinação completa	<i>Outdoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Vômitos, Depressão, Perda de apetite, Desidratação
Cão	Fêmea fértil	Serra da Estrela	0,2	Vacinação incompleta	<i>Indoor/Outdoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Diarreia hemorrágica, Perda de apetite
Gato	Fêmea fértil	Indeterminado	0,2	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Vômitos, Depressão, Perda de apetite, Desidratação
Cão	Fêmea fértil	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
Gato	Macho fértil	Indeterminado	0,2	Não vacinado	<i>Outdoor</i>	Diarreia não hemorrágica, Perda de apetite
Gato	Macho fértil	Indeterminado	0,3	Não vacinado	<i>Indoor</i>	Vômitos, Perda de apetite

Anexos

Anexo 1

Tabela A5 - Aminoácidos agrupados segundo as características bioquímicas e o respetivo código de uma letra (Ramilo, 2008)

Código de Letras	Denominação	Aminoácidos (AA)
E	Glutamato	AA ácidos
D	Aspartato	
G	Glicina	AA polares neutros
S	Serina	
T	Treonina	
Q	Glutamina	
N	Asparagina	
C	Cisteína	
A	Alanina	AA hidrofóbicos alifáticos
V	Valina	
L	Leucina	
P	Prolina	
I	Isoleucina	
M	Metionina	
R	Arginina	AA básicos
K	Lisina	

H	Histidina	
W	Triptofano	AA hidrofóbicos aromáticos
Y	Tirosina	
F	Fenilalanina	
B	Asparagina / Aspartato	
Z	Glutamina / Glutamato	
J	Leucina / Isoleucina	
X	Aminoácido Desconhecido	